

Barbara Šoba Šparl¹

Mikrobiološka diagnostika okužb s paraziti pri popotnikih

Microbiological Diagnosis of Parasitic Infections in Travelers

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: paraziti, mikrobiološka diagnostika, popotniki, neposredne metode, posredne metode

Popotniki, ki po vrnitvi iz držav tropskega pasu in držav v razvoju poiščejo medicinsko pomoč, so pogosto okuženi s paraziti. Napredek v laboratorijskih tehnikah v zadnjih nekaj desetletjih je močno prispeval k izboljšanju in deloma tudi predrugačenju diagnostike parazitskih bolezni. Uporaba hitrih antigenskih testov tako omogoča zanesljivo diagnostiko malarije tudi na endemičnih področjih, kjer pogosto ni dostopa do elektrike, laboratorijske opreme in ustrezno izobraženega laboratorijskega osebja, molekularne metode pa zagotavljajo občutljivo in specifično zaznavo parazitskih nukleinskih kislin, sočasno pa tudi virusnih, bakterijskih in glivnih povzročiteljev okužb. Žal se je zaradi prednosti, ki jih ponujajo sodobnejši diagnostični testi, začelo izgubljati znanje o morfologiji parazitov, kar lahko vodi v napačno diagnozo in posledično negativno vpliva na oskrbo bolnikov in javno zdravje. Nove diagnostične metode niso na voljo za vse parazitske povzročitelje okužb in morda niso primerne za vse kužnine, zato je zelo pomembno, da tudi nova generacija parazitologov pridobi in neguje znanje o morfoloških značilnostih parazitov. Zgolj kombinacija klasičnih in sodobnih parazitoloških tehnik zagotovi optimalno diagnostiko parazitskih okužb.

ABSTRACT

KEY WORDS: parasites, microbiological diagnosis, travelers, direct methods, indirect methods

Travelers who seek medical attention after returning from the tropics and developing countries are often infected with parasites. Advances in laboratory techniques in recent decades have contributed significantly to improving and, to some extent, modifying the diagnosis of parasitic diseases. The use of rapid antigen tests allows reliable diagnosis of malaria even in endemic areas, where there is often no access to electricity, no laboratory equipment, and no appropriately trained laboratory personnel, while molecular methods ensure sensitive and specific detection of parasitic nucleic acids, which can be detected simultaneously with viral, bacterial, and fungal pathogens. Unfortunately, due to the advantages of modern diagnostic tests, knowledge of parasite morphology has gradually been lost, which can lead to misdiagnosis and consequently has a negative impact on patient care and public health. New diagnostic methods are not available for all

¹ Doc. znan. sod. dr. Barbara Šoba Šparl, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; barbara.soba@mf.uni-lj.si

parasitic pathogens and may not be suitable for all diagnostic specimens. Therefore, it is very important that the new generation of parasitologists acquires and maintains knowledge of the morphological characteristics of parasites. Only the combination of classical and modern parasitological techniques ensures an optimal diagnosis of parasitic infections.

UVOD

Parazitske okužbe so pomemben vzrok obolevnosti pri popotnikih. Do 30 % popotnikov, ki po vrnitvi iz držav tropskega pasu in držav v razvoju poiščejo medicinsko pomoč, je diagnosticiranih z okužbo s praživalmi, helminti ali členonožci (1, 2). Zaradi izredne vrstne raznolikosti parazitov in njihovih zapletenih življenjskih krogov ter zemljepisnih posebnosti lahko diagnostika parazitskih okužb v neendemičnih področjih, kamor se ljudje vrnejo s potovanj, predstavlja precejšen izziv. Nekatere parazitske okužbe se lahko klinično izrazijo šele mesece po vrnitvi, tako da je simptome in znake okužbe včasih težko povezati z okužbo na potovanju. Za ustrezno obvladovanje parazitskih okužb je pomembno poznavanje življenjskih krogov parazitov, ustrezen odvzem in prenos vzorcev, ustrezna diagnostika, poznavanje odpornosti na zdravila in upoštevanje dejstva, da je klinična slika parazitskih okužb pri imunsko naivnih popotnikih lahko drugačna kot pri prebivalcih endemičnih področij (3).

V mikrobiološki diagnostiki parazitskih okužb uporabljamo tako neposredne kot posredne diagnostične metode. V nadaljevanju prispevka jih bomo opisali in navedli njihove prednosti ter pomanjkljivosti. Opredelili bomo vzorce, primerne za parazitološko preiskavo, in predstavili njihov pravilen odvzem ter prenos v mikrobiološki laboratorij. V tabeli 1 so predstavljeni pogosti povzročitelji parazitskih okužb pri popotnikih, primerni diagnostični vzorci in diagnostične metode, ki jih uporabljamo v Laboratoriju za parazitologijo

Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo (LAB PRZ IMI) Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

ODVZEM IN PRENOS VZORCEV

Uspešna laboratorijska diagnostika parazitskih povzročiteljev okužb se začne z ustreznim odvzemom kliničnih vzorcev in njihovim prenosom v laboratorij. Če vzorec ni pravilno odvzet in prenešen, ni zagotovljeno, da bomo prisotno okužbo potrdili. Pri tem je izredno pomembna komunikacija med naročnikom preiskave in diagnostičnim laboratorijem. Še posebej je to pomembno za tiste preiskave, pri katerih odvzem, prenos in diagnostični postopki niso običajni in je zato nujno, da je naročnik obveščen o pravilnem odvzemu in prenosu kužnine, laboratorij pa na naročeno preiskavo pripravljen (npr. priprava ustreznih gojišč). Za usmeritev laboratorijske diagnostike v parazitološkem laboratoriju so poleg zahtevane preiskave in osnovnih podatkov o kužnini (vrsta kužnine, datum in čas odvzema) ter bolniku pomembni tudi podatki o bolnikovih kliničnih znakih in simptomih, morebitnih zdravilih, domnevni diagnozi, njegovem imunskem stanju in o zgodovini njegovih potovanj ter bivanj (4).

Kužnino odvezamo v natančno označeno čisto embalažo z zamaškom, ki dobro tesni, da vsebina ne izteče oz. se ne izsuši. Z vsako kužnino delamo previdno, saj je prav vsaka lahko vir okužbe, večina kužnin pa je tudi neponovljivih (npr. pri kirurških posegih ali pa je njihov pomen drugačen ob različnih časih odvzema) (5, 6).

NEPOSREDNE DIAGNOSTIČNE METODE

Med neposredne diagnostične metode sodijo pregled kužnin in ugotavljanje prisotnosti parazitov s svetlobnim mikroskopom, kar še vedno ostaja temelj parazitološke diagnostike, dokazovanje prisotnosti parazitskih antigenov z antigenskiimi testi in molekularne metode za dokazovanje parazitskih nukleinskih kislin. V nekaterih primerih lahko parazite v kužnini opazujemo in prepoznamo že s prostim očesom ali s povečevalnim steklom (4, 7, 8).

Z mikroskopskim pregledom nativnih preparatov kužnine ali preparatov kužnine, obarvanih z različnimi barvili, lahko najdemo vegetativne oblike praživali, njihove ciste ali oociste, odrasle helminte, njihova jajčeca ali ličinke ter različne razvojne oblike členonožcev (5, 7).

Prednost mikroskopskega pregleda nativnih preparatov kužnine ali pregleda preparata z dodatkom Lugolove raztopine joda, ki jo v parazitološkem laboratoriju uporabljamo pri pregledu blata, je predvsem v tem, da na ta način v kužnini opazimo skoraj vse prisotne parazite. Govorimo o t. i. *catch-all* diagnostični metodi. Mikroskopski pregled lahko izvede le zelo izkušeno in usposobljeno laboratorijsko osebje. Slabost mikroskopskega pregleda je nekoliko slabša občutljivost, ki jo lahko do neke mere izboljšamo s pregledom več kužnin istega bolnika, s postopki koncentriranja morebitnih parazitov v kužnini, s trajnim barvanjem razmazov kužnine ali materiala, ki ga dobimo po koncentriranju, ali z namnožitvijo parazitov v/na gojišču pred mikroskopskim pregledom. (7).

Prednost antigenskih testov, s katerimi v kužnini z uporabo monoklonskih protiteles dokazujemo parazitske antigene, je enostavna in hitra izvedba, enostavno vrednotenje njihovih rezultatov in sprejemljiva cena. Antigene dokazujemo s hitrimi imunokromatografskimi testi, z neposrednimi imunofluorescenčnimi testi ali z encimsko-

-imunskimi testi. Antigenski testi imajo običajno višjo občutljivost kot običajni mikroskopski pregled. Glavna slabost antigenskih testov je predvsem v tem, da lahko z njimi v kužnini sočasno ugotovimo prisotnost le enega ali največ dveh parazitov. Če je to edina metoda, ki jo uporabljamo, lahko pravega povzročitelja spregledamo (4).

Prisotnost parazitov v kužnini lahko neposredno dokazujemo tudi z molekularnimi metodami. Te imajo visoko specifičnost in omogočajo ločevanje med morfološko podobnimi vrstami parazitov, ki jih na osnovi mikroskopskega pregleda ne moremo razlikovati med seboj ali pa je razlikovanje oteženo (npr. razlikovanje med nepatogeno *Entamoeba dispar* in patogeno *Entamoeba histolytica*, razlikovanje med jajčeci *Taenia saginata* in *Taenia solium*). Poleg tega je prednost molekularnih metod v tem, da jih lahko uporabimo tudi takrat, ko kužnina ni bila pravilno shranjena in prenešena, saj je DNA obstojna. Njihova občutljivost je visoka in zato omogoča dokazovanje parazitov, tudi če jih je v kužnini malo (npr. pri asimptomatskih posameznikih). Enega izmed ključnih korakov molekularnih preiskav predstavlja osamitev DNA, predvsem iz kužnin z odpornimi oblikami parazita (ciste, oociste, jajčeca). Te so izredno trpežne, zato je sprostitev nukleinske kisline iz njih težavna, kar lahko močno vpliva na občutljivost molekularne preiskave. Žal postopki osamitve DNA predvsem v takšnih primerih še niso standardizirani. Molekularne preiskave imajo za zdaj še vedno visoko ceno. Njihova uporaba je smiselna v sindromski diagnostiki, ko s hkratno verižno reakcijo s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) poleg parazitskih prepoznavamo tudi virusne, bakterijske in glivne povzročitelje okužb osrednjega živčnega sistema, dihal, črevesa in spolno prenosljivih okužb (4, 6, 9).

Za zdaj še nobena od novejših diagnostičnih metod ne more nadomestiti mikroskopskega pregleda. Kakovost mikroskopskega pregleda. Kakovost mikroskopskega pregleda.

Tabela 1. Pogosti povzročitelji parazitskih okužb pri popotnikih, primerni diagnostični vzorci in diagnostične metode, ki jih uporabljamo v Laboratoriju za parazitologijo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo (LAB PRZ IMI) za prepoznavo okužb. DIF – neposredni imunofluorescenčni test (angl. *direct immunofluorescence test*), PCR – verižna reakcija s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*), UV – ultravijoličen, ELISA – encimsko-immunski test (angl. *enzyme linked immunosorbent assay*), IgG – imunoglobulini G, WB – prenos western (angl. *western blot*), CLIA – kemiluminiscenčni test (angl. *chemiluminescent immunoassay*), IgM – imunoglobulini M, IHA – posredni hemaglutinacijski test (angl. *indirect hemagglutination test*).

| Paraziti | Primeren diagnostični vzorec | Diagnostična metoda LAB PRZ IMI |
|--------------------------------|---|---|
| Praživali | | |
| <i>Balantidium coli</i> | blato (trikrat) | pregled s svetlobnim mikroskopom |
| <i>Cryptosporidium</i> spp. | blato (trikrat) | DIF, PCR v realnem času |
| <i>Cyclospora cayetanensis</i> | blato (trikrat ali več) | pregled s svetlobnim mikroskopom po barvanju s safraninom in metilenskim modrilom, pregled z UV-mikroskopom |
| <i>Cystoisospora belli</i> | blato (trikrat) | pregled s svetlobnim mikroskopom, pregled s svetlobnim mikroskopom po barvanju s safraninom in metilenskim modrilom, pregled z UV-mikroskopom |
| <i>Entamoeba histolytica</i> | blato (trikrat ali več) (črevesna ameboza) | pregled s svetlobnim mikroskopom, PCR v realnem času |
| | punktat abscesa (zunajčrevesna ameboza) | PCR v realnem času |
| | serum (zunajčrevesna ameboza) | ELISA IgG |
| <i>Giardia duodenalis</i> | blato (trikrat) | pregled s svetlobnim mikroskopom, DIF, PCR v realnem času |
| | sok dvanajstnika | pregled s svetlobnim mikroskopom, PCR v realnem času |
| <i>Leishmania</i> spp. | biopt kožne razjede (kožna lišmanioza) | pregled s svetlobnim mikroskopom po barvanju z barvilom po Giemsi, PCR v realnem času |
| | punktat kostnega mozga, aspirat vranice (visceralna lišmanioza) | pregled s svetlobnim mikroskopom po barvanju z barvilom po Giemsi, PCR v realnem času |
| | serum (visceralna lišmanioza) | WB IgG |
| <i>Plasmodium</i> spp. | polna kri | pregled goste kaplje krvi in tankega krvnega razmaza s svetlobnim mikroskopom po barvanju z barvilom po Giemsi, PCR v realnem času, (hitri antigeni test) |
| <i>Toxoplasma gondii</i> | serum | CLIA IgG, IgM |
| | punktat bezgavke | PCR v realnem času |
| <i>Trypanosoma brucei</i> | polna kri | pregled goste kaplje krvi in tankega krvnega razmaza s svetlobnim mikroskopom po barvanju z barvilom po Giemsi |
| | možgansko-hrbtnjačna tekočina | pregled s svetlobnim mikroskopom |
| <i>Trypanosoma cruzi</i> | polna kri | pregled goste kaplje krvi in tankega krvnega razmaza s svetlobnim mikroskopom po barvanju z barvilom po Giemsi |
| | serum | ELISA IgG |

| Paraziti | Primeren diagnostični vzorec | Diagnostična metoda LAB PRZ IMI |
|--|--|--|
| Helminti | | |
| <i>Ancylostoma brasiliense</i> in druge živalske kavljaste gliste | / (klinična diagnostika) | / |
| Črevesni helminti (<i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Capillaria philippinensis</i> , <i>Clonorchis sinensis</i> , <i>Dibothriocephalus latus</i> , <i>Dipylidium caninum</i> , <i>Echinostoma</i> spp., <i>Fasciolopsis buski</i> , <i>Heterophyes heterophyes</i> , <i>Hymenolepis</i> spp., kavljaste gliste, <i>Metagonimus yokogawai</i> , <i>Opisthorchis viverrini</i> , <i>Paragonimus westermani</i> , <i>Taenia saginata</i> , <i>Trichostrongylus</i> spp., <i>Trichuris trichiura</i>) | blato (trikrat) | pregled s svetlobnim mikroskopom |
| <i>Echinococcus</i> spp. | serum aspirat ciste | ELISA IgG pregled s svetlobnim mikroskopom, (PCR) |
| <i>Fasciola hepatica</i> | blato (trikrat) serum | pregled s svetlobnim mikroskopom WB IgG |
| Filarije (<i>Loa loa</i> , <i>Wuchereria bancrofti</i> , <i>Onchocerca volvulus</i>) | polna kri (<i>Loa loa</i> , <i>Wuchereria bancrofti</i>) biopt kože/kožnega nodula (<i>Onchocerca volvulus</i>) | pregled goste kaplje krvi in tankega krvnega razmaza s svetlobnim mikroskopom po barvanju z barvilom po Giemsi, (PCR v realnem času) mikroskopski pregled, (PCR v realnem času) |
| <i>Schistosoma</i> spp. | blato (trikrat) urin serum | pregled s svetlobnim mikroskopom IHA, WB IgG |
| <i>Strongyloides stercoralis</i> | blato (trikrat ali več) sputum serum | pregled s svetlobnim mikroskopom, kultivacija, PCR v realnem času pregled s svetlobnim mikroskopom, PCR v realnem času ELISA IgG |
| <i>Taenia solium</i> | blato (trikrat) (tenioza) serum (cisticerkoza) | pregled s svetlobnim mikroskopom WB IgG |
| <i>Toxocara</i> spp. | serum | ELISA, WB IgG |
| <i>Trichinella spiralis</i> | serum biopt mišice | ELISA, WB IgG pregled s svetlobnim mikroskopom |
| Členonožci | | |
| Muhe (<i>Dermatobia hominis</i> , <i>Cordylobia anthropophaga</i>) | biopt kože | makroskopski pregled, pregled s svetlobnim mikroskopom |
| <i>Sarcoptes scabiei</i> | skarifikat kože | pregled s svetlobnim mikroskopom |
| <i>Tunga penetrans</i> | biopt kože | pregled s svetlobnim mikroskopom |

diagnostike morajo na visoki ravni vzdrževati predvsem referenčni parazitološki laboratoriji, ki v diagnostično obravnavo prejemajo kužnine, odvzete popotnikom, priseljencem, pribežnikom in bolnikom z imunsko pomanjkljivostjo, ki lahko obolevajo za nekaterimi redkimi parazitozami in okužbami, ki pri nas niso endemične (8, 10).

Blato

Za mikroskopski pregled blata na prisotnost parazitov (praživali, helminti) je priporočljiv pregled vsaj treh vzorcev, odvzetih v različnih dneh, najbolje vsak drugi dan. Paraziti oz. njihove razvojne oblike se v blatu namreč ne izločajo stalno, zato z večkratnim odvzemom blata v različnih dneh povečamo občutljivost preiskave. Npr. pri več kot dveh tretjinah asimptomatskih bolnikov s kronično okužbo z glisto *Strongyloides stercoralis* je v gramu iztrebka manj kot 25 ličink parazita (11). Pri mikroskopskem pregledu enega samega vzorca blata zgrešimo do 70 % takšnih primerov; diagnostična občutljivost mikroskopskega pregleda se približa 100 % šele ob pregledu sedmih zaporednih vzorcev blata (12).

Če ima bolnik drisko in je blato tekoče, je od parazitskih okužb najbolj verjetna okužba s praživalmi. Ob hudih driskah so le-te lahko v blatu prisotne le v obliki trofozoitov (npr. pri okužbi z *Entamoeba histolytica*), ki zunaj gostitelja hitro propadejo, zato je pomembno, da mikroskopski pregled izvedemo čim prej, najkasneje v 30 minutah po odvzemu. V tem primeru blato do pregleda hranimo pri sobni temperaturi; shranjevanje v hladilniku trofozoite uniči. Kadar prenos vzorcev blata v parazitološki laboratorij v tem času ni mogoč, blato odvezamemo v posodice, ki so polnjene s konzervansom. Konzervans vzdržuje parazite v blatu (omogoči ohranitev njihove morfologije in prepreči nadaljnji razvoj jajčec ter ličink helmintov). Blato lahko v posodici s konzervansom hranimo pri 2–8 °C ali

na sobni temperaturi še en do dva dneva po zadnjem odvzemu (4).

Pred pripravo preparata za mikroskopiranje vzorec blata pregledamo makroskopsko na morebitno prisotnost nekaterih odraslih glist in odrivkov trakulj ter preverimo njegovo konsistenco, barvo, prisotnost krvi in sluzi. Običajno mikroskopskemu preparatu dodamo Lugolovo raztopino joda, ki se veže z glikogenom v celicah parazitov, zaradi česar se celice obarvajo rjavkasto in so pod mikroskopom bolj vidne. Če želimo opazovati še gibljive trofozoite praživali, moramo pregledati nativni preparat svežega iztrebka brez konzervansa. Občutljivost preiskave blata na parazite povečamo s postopki koncentriranja morebitnih parazitov v blatu, bodisi s sedimentacijskimi postopki bodisi z naplavljanjem. Trajno barvanje razmazov (npr. s trikromom, železovim hematoksilinom in s klorazol črnim), pripravljenih iz vzorcev blata, poveča občutljivost preiskave blata na praživali. Uporabljamo lahko tudi barvanja, ki so namenjena proti kislinsko odpornim kokcijem (npr. prilagojeno barvanje po Kinyounu, prilagojeno barvanje po Ziehl-Neelsenu, barvanje s safraninom in metilenskim modrilom, prilagojeno barvanje s trikromom ipd.) (4).

Pri parazitozah, pri katerih je številno parazitov v črevesu nizko in posledično prisotnost vegetativnih oblik parazitov v blatu minimalna (ličinke, trofozoiti; npr. *Strongyloides stercoralis*, kavljaste gliste, *Trichostrongylus* spp. in nekatere praživali), lahko izvedemo kultivacijo, tj. namnožitvev parazitov v/na posebnih gojiščih. Za kultivacijo mora biti blato sveže odvzeto in brez dodanega konzervansa (4). Slabost kultivacije je precejšnja dolgotrajnost njene izvedbe. Odsotnost ličink ali trofozoitov parazita po kultivaciji sicer ne izključuje okužbe, je pa pri negativnih rezultatih verjetnost okužbe majhna, seveda če je bil vzorec hitro in pravilno prenesen v laboratorij (4, 7).

V molekularni diagnostiki črevesnih parazitov se najpogosteje uporabljajo testi za dokazovanje okužb s praživalmi *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. in *Entamoeba histolytica*. V LAB PRZ IMI poleg teh testov izvajamo tudi molekularno testiranje na glisto *Strongyloides stercoralis*, ki služi za potrditev diagnoze strongiloidoze kot alternativni test ali pa v kombinaciji s klasičnimi parazitološkimi tehnikami (mikroskopski pregled, kultivacija na agarskem gojišču), ne pa kot presejalni test. Za molekularno diagnostiko blato hranimo do 24 ur pri temperaturi 2–8 °C in ga odvzamemo v posodico brez konzervansa. Nekateri konzervansi lahko namreč povzročijo fragmentacijo ali poškodujejo DNA parazita, zaradi česar so možni lažno negativni rezultati molekularne preiskave (7).

Po zaključenem zdravljenju se blato bolnika pregleda s klasičnimi parazitološkimi metodami; pri okužbi s praživalmi tri do štiri tedne po zdravljenju, pri okužbi s helminti pa pet do šest tednov po zaključku zdravljenja (7).

Kri

V krvi iščemo praživali *Plasmodium* spp., *Leishmania* spp., *Trypanosoma* spp. in ličinke filarij, t. i. mikrofilarije. Kri odvzamemo po običajnem postopku za odvzem venske krvi v epruveto z antikoagulantom etilendiamintetraocetno kislino (angl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA). Tako odvzeta kri je primerna za mikroskopski pregled, hitre antigenske teste in molekularne preiskave. Krvne preparate moramo pripraviti v eni uri po odvzemu krvi. Ob sumu na malarijo s tem ohranimo granulacije znotraj eritrocitov in morfologijo malarijskih parazitov, kar je ključno za določanje vrste *Plasmodium* spp. Za vsakega bolnika pripravimo tako tanek krvni razmaz kot tudi gosto kapljo krvi. Občutljivost mikroskopskega pregleda goste kaplje krvi je v primerjavi s pregledom tankega krvnega razmaza višja. Krvne preparate obarvamo

z barvilom po Giemsi, ki je barvilo izbire za prikaz vseh krvnih parazitov (7).

Bolniku moramo ob sumu na malarijo odvzeti kri pred začetkom zdravljenja, najbolje ob napadu mrzlice, nato pa jo pregledujemo vsakih šest do osem ur tri dni oz. do prvega pozitivnega rezultata. V primeru slednjega vzorce krvi pregledujemo še 24, 48 in 72 ur po uvedbi ustreznih zdravil. Preden se izda negativen izvid, se priporoča natančen pregled vsaj 200–300 vidnih polj obarvane goste kaplje krvi in tankega krvnega razmaza pri 1000-kratni povečavi. Ob okužbi z vrsto *Plasmodium falciparum* določimo tudi parazitemijo, ki jo običajno izrazimo kot delež s paraziti okuženih eritrocitov (7, 13).

Pri afriški tripanosomozii so tripomastigoti v krvi bolnika v največjem številu prisotni v obdobjih vročine. Kri lahko centrifugiramo in s tem morebitne tripomastigote koncentriramo. Preden jih najdemo, je pogosto treba mikroskopsko pregledati več vzorcev krvi. Kri pregledujemo tudi med zdravljenjem in en do dva meseca po zdravljenju. Pri južnoameriški tripanosomozii so tripomastigoti v krvi prisotni predvsem v akutni stopnji okužbe, v kronični stopnji pa so redki. Pri odvzemu krvi za mikrobiološko diagnostiko visceralne lišmanioze moramo upoštevati, da je amastigotov v krvi več ponoči kot podnevi. Periodičnost pojavljanja v krvi je značilna tudi za mikrofilarije nekaterih vrst filarij. Nočna periodičnost je tako značilna za mikrofilarije vrst *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* in *Brugia timori*, mikrofilarije *Loa loa* pa v krvi najdemo podnevi. Občutljivost mikroskopske diagnostike povečamo s postopki koncentriranja mikrofilarij v krvi (7).

Z dobrimi hitrimi antigenskimi testi, ki predstavljajo pomemben napredek v diagnostiki malarije, zanesljivo zaznamo že 100–200 parazitov na μ l krvi, kar je primerljivo z občutljivostjo dobro izvedenega mikroskopskega pregleda. Hitri testi so primerni za uporabo v urgentnih ambulantah

razvitega in nerazvitega sveta in za samopregledovanje popotnikov, ki potujejo v odmaknjene predele sveta, saj je njihova izvedba preprosta in hitra, njihova cena nizka, enostavna je interpretacija njihovih rezultatov, prednost pa je tudi obstojnost pri visokih temperaturah (13).

V LAB PRZ IMI diagnosticiramo okužbe s plazmodiji in lišmanijami tudi z molekularnimi metodami, v raziskovalne namene pa jih uporabljamo za ugotavljanje DNA filarij.

Seč

Z mikroskopskim pregledom nativnega preparata usedline seča iščemo jajčeca krvnega metljaja *Schistosoma haematobium*. Preden se le-ta v seču začnejo izločati, lahko od okužbe mine do tri mesece. Ker je pri blagih okužbah jajčec v seču malo, je potreben pregled več vzorcev seča. Največ jajčec se v seču izloča med poldnevom in tretjo uro popoldan, zato je seč najprimerneje odvzeti v tem delu dneva. Lahko se zbira tudi celodnevni seč. Za oceno uspešnosti zdravljenja je treba seč pregledovati še eno leto po zaključenem zdravljenju (7).

V usedlini seča najdemo tudi trofozoitne oblike spolno prenosljivega bičkarja *Trichomonas vaginalis*. V LAB PRZ IMI trihomonozo dokazujemo z molekularnimi testi.

Vzorci iz dihal

V nativnih preparatih vzorcev iz dihal lahko z mikroskopskim pregledom najdemo ličinke glist *Ascaris lumbricoides* in *Strongyloides stercoralis*, jajčeca metljaja *Paragonimus westermani* in kaveljčke trakulje *Echinococcus* spp. Tahizoite *Toxoplasma gondii* iščemo v mikroskopskih preparatih, obarvanih z barvilom po Giemsi, ali pa njihovo prisotnost v vzorcu potrdimo z molekularnimi metodami (5).

Vzorci iz dihal odvajamo v sterilno posodico z navojem in jih v najkrajšem možnem času prenesemo v laboratorij. Če takoj-

šen prenos ni možen, jih hranimo pri temperaturi 2–8 °C do največ 24 ur (7).

Punktati in biopti organov in tkiv

Punktate in biopte organov in tkiv pregledujemo, predvsem če sumimo na okužbo z lišmanijami, tripanosomami in *Toxoplasma gondii*, včasih pa lahko v teh kužninah najdemo ličinke gliste *Strongyloides stercoralis*. Razmaze kužnine navadno obarvamo z barvilom po Giemsi in jih pregledamo pri 1000-kratni povečavi (5, 7). Za diagnostiko toksoplazmoze, lišmanioze in strongilidoze imamo v LAB PRZ IMI na voljo tudi molekularne teste. Ob sumu na zunajčrevesno amebozo in ehinokokozo pregledujemo punktate ognjokov in cist. Material mikroskopiramo ali pa uporabimo molekularne metode. Z mikroskopskim pregledom lahko v bioptu mišic najdemo ličinke gliste *Trichinella* spp. (7).

Punktate in biopte odvajamo v sterilno epruveto oz. posodico z navojem in jih v najkrajšem možnem času pošljemo v laboratorij. Če takojšen prenos vzorcev ni možen, jih hranimo pri temperaturi 2–8 °C do največ 24 ur (7).

Koža

Za parazitološko diagnostiko so primerni biopt, aspirat ali postržek kožne spremembe (razjeda, izpuščaj, nodul itd.). V kužnini iščemo amastigote lišmanij, filarije in mikrofilarije, ličinke gliste *Strongyloides stercoralis* ter členonožce – parazitske ličinke nekaterih tropskih muh, pršice vrste *Sarcoptes scabiei* in bolhe vrste *Tunga penetrans*. Običajno iz kužnine pripravimo nativne mikroskopske preparate ali pa razmaze obarvamo z barvilom po Giemsi (5, 7). V LAB PRZ IMI lahko kožno lišmaniozo in prisotnost ličink *Strongyloides stercoralis* diagnosticiramo tudi z molekularnimi testi. Slednje uporabljamo tudi v raziskovalne namene za ugotavljanje DNA filarij in mikrofilarij.

Pri sumu na kožno lišmaniozo je najprimernejša kužnina biopt z roba kožne spremembe. Najbolje je odvzeti več bioptov s *punch* biopsijo. Rano je treba pred odvzemom očistiti s 70-% alkoholom. Biopt odložimo v sterilno posodico z navojem. Vzorcudodamo nekaj kapljic sterilne fiziološke raztopine, da se ne izsuši, ali pa ga odložimo na sterilno gazo, navlaženo s sterilno fiziološko raztopino (7).

POSREDNE DIAGNOSTIČNE METODE

Parazitske okužbe lahko dokazujemo tudi posredno z ugotavljanjem značilnih protiteles v bolnikovem serumu, ki nastanejo kot imunski odziv na prisotnost patogena v gostitelju. Za serološke preiskave odvzamemo 2–3 ml krvi iz periferne vene v epruveto za vakuumski odvzem brez antikoagulantila in jo v največ štirih urah pošljemo v laboratorij. Če prenos v tem času ni možen, jo shranimo pri temperaturi 2–8 °C in jo najkasneje v 24 urah pošljemo v laboratorij (7).

V LAB PRZ IMI s serološkimi testi ugotavljamo prisotnost specifičnih protiteles, in sicer IgG, IgM in IgA proti prazivali *Toxoplasma gondii* in IgG proti prazivalim *E. histolytica*, *Leishmania* spp. in *Trypanosoma cruzi* ter proti helmintom *Trichinella spiralis*, *Toxocara* spp., *S. stercoralis*, *Echinococcus* spp., *Schistosoma* spp., *Fasciola* spp. in *T. solium*, če sumimo na (nevro)cisticerkozo.

Prisotnost značilnih IgG v bolnikovem serumu sicer kaže na okužbo s parazitom, ne pove pa, kdaj je do okužbe prišlo, zato mora klinični zdravnik presoditi, ali klinična slika ustreza mikrobiološkemu izvidu. Po uspešnem zdravljenju parazitske okužbe lahko IgG vztrajajo še več let, zato na podlagi seroloških testov večinoma ne moremo spremljati uspešnosti zdravljenja. Pri nekaterih kroničnih okužbah, ko se ličinke parazita naselijo v tkivih ali orga-

nih in tam poapnijo (npr. *Echinococcus granulosus*, *Taenia solium*, *Toxocara* spp., *Trichinella spiralis*), ali pa ko je bolnik imunsko zelo oslavljen zaradi bolezni ali imunosupresivne terapije, je lahko humoralni odziv na parazitsko okužbo tako šibek, da ga s serološkimi testi ne zaznamo in so rezultati lažno negativni. Podobno je tvorba IgG šibka pri črevesni amebozi in kožni lišmaniozi, zato je serološko testiranje na *Entamoeba histolytica* in *Leishmania* spp. smiselno pri sumu na zunajčrevesno amebozo in visceralno lišmaniozo. Serološki testi imajo slabšo občutljivost tudi pri bolnikih z akutno okužbo, npr. pri popotnikih, ki so se vrnili s potovanja. Zlasti takrat, ko za potrjevanje pozitivnih rezultatov presejalnih testov ni na voljo potrditvenega testiranja (npr. pri *Strongyloides stercoralis*), se moramo zavedati, da je lahko pozitiven rezultat posledica navzkrižne reaktivnosti, predvsem s protitelesi proti drugim parazitom, s katerimi je (bil) bolnik okužen. Pri interpretaciji rezultatov seroloških testov je zato vedno treba upoštevati bolnikovo klinično sliko in anamnezo (14).

ZAKLJUČEK

Mikrobiološka diagnostika parazitskih okužb še dandanes največkrat temelji na neposredni preiskavi kužnine. Parazitološki diagnostični laboratoriji morajo ohranjati svoje znanje o morfoloških značilnostih parazitov, saj lahko le tako zagotavljajo pravilno prepoznavo parazita ob pregledu kužnine s svetlobnim mikroskopom. Svetlobno mikroskopijo lahko dopolnjujejo modernejši antigenski in molekularni testi in predvsem v primeru parazitov, ki jih povzročajo tkivni paraziti, tudi posredni serološki testi. Dobra komunikacija med kliničnim zdravnikom in parazitološkim laboratorijem zagotavlja ustrezen odvzem in prenos kužnin, kar je eden izmed predpogojev za učinkovito obvladovanje parazitskih bolezni.

LITERATURA

1. Boggild AK, Yohanna S, Keystone JS, et al. Prospective analysis of parasitic infections in Canadian travelers and immigrants. *J Travel Med.* 2006; 13 (3): 138–44.
2. Leder K, Torresi J, Libman MD, et al. Geosentinel surveillance of illness in returned travelers, 2007–2011. *Ann Intern Med.* 2013; 158 (6): 456–68.
3. Showler AJ, Wilson ME, Kain KC, et al. Parasitic diseases in travelers: A focus on therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014; 12 (4): 497–521.
4. Šoba B. Laboratorijska diagnostika parazitov v blatu. *Med Razgl.* 2013; 52 (Suppl 5): 61–8.
5. Logar J, Šoba B. Laboratorijska diagnostika parazitskih bolezni pri popotnikih. *Med Razgl.* 2004; 43 (Suppl 2): 65–8.
6. Ružič-Sabljič E. Praktikum iz mikrobiologije za študente farmacije. 2nd ed. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo; 2016. p. 32–3.
7. Garcia LS. Diagnostic medical parasitology. 6th ed. Washington: ASM Press; 2016. p. 7–194, 1184–93.
8. Potters I, Bottieau E, Yansouni CP, et al. The case for parasitological stool microscopy. *Clin Microbiol Infect.* 2022; 28 (10): 1310–2.
9. Cvitković Špik V, Pirš M, Seme K. Osnove mikrobiološke laboratorijske diagnostike za študente dentalne medicine. 1st electronic ed. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo; 2020. p. 91.
10. Bradbury RS, Sapp SGH, Potters I, et al. Where have all the diagnostic morphological parasitologists gone? *J Clin Microbiol.* 2022; 60 (11): e0098622.
11. Siddiqui AA, Berk SL. Diagnosis of strongyloides stercoralis infection. *Clin Infect Dis.* 2001; 33 (7): 1040–7.
12. Krolewiecki A, Nutman TB. Strongyloidiasis: A neglected tropical disease. *Infect Dis Clin North Am.* 2019; 33 (1): 135–51.
13. Šoba B, Kotar T, Biasizzo H, et al. Laboratorijska diagnostika malarije. *Med Razgl.* 2013; 52 (Suppl 5): 135–41.
14. Skvarč M. Serološke preiskave pri popotnikih s sumom na parazitsko obolenje. *Med Razgl.* 2013; 52 (Suppl 5): 123–8.