

mgr Alina Augustynowicz
Wojskowy Instytut Medyczny
Zakład Epidemiologii i Medycyny Tropikalnej
młodszy asystent

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Porównanie efektywności metod koprologicznych na przykładzie diagnostyki pasożytów jelitowych w mikroskopii świetlnej

Inwazje pasożytnicze stanowią poważny problem zdrowotny populacji o zasięgu globalnym. Szacuje się, że około 2 miliardy ludzi jest zarażonych co najmniej jednym gatunkiem pasożyta jelitowego. Szerzeniu zarażeń pasożytniczych sprzyja wiele czynników ryzyka, w szczególności złe warunki socjoekonomiczne oraz niskie standardy sanitarne, zwłaszcza w zakresie żywności i żywienia. Mieszkańcy krajów rozwijających się w Afryce, Azji oraz w Ameryce Środkowej i Południowej są szczególnie narażeni na kontakt z patogenami przenoszonymi drogą pokarmową. Rezerwuarem może być zarażona ludność, jak również żywność i woda zanieczyszczone postaciami rozwojowymi pasożytów. W krajach, gdzie stosuje się nawożenie gleby odchodami ludzi i zwierząt, rozpowszechniona jest transmisja geohelminatów.

W ocenie występowania i rozpowszechnienia helmintów oraz pierwotniaków jelitowych w populacji kluczową rolę odgrywa diagnostyka parazytologiczna. W detekcji pasożytów stosuje się wiele metod, więc o wyborze najefektywniejszej powinny decydować takie cechy jak czułość, powtarzalność wyników oraz techniczne możliwości zastosowania określonej metody w istniejących warunkach. Bardzo istotna jest również wiedza teoretyczna i praktyczna diagnosty.

Metody parazytologiczne można zasadniczo podzielić na dwie grupy: bezpośrednie pozwalające na wykrycie form rozwojowych pasożyta oraz pośrednie, badające skutki obecności pasożyta w organizmie żywiciela (metody immunologiczne, molekularne). Do diagnostyki bezpośredniej należą metody oparte na określeniu cech morfologicznych pasożyta. W szczególności są to metody mikroskopii świetlnej, które pozwalają na bezpośrednią identyfikację, bez konieczności stosowania dedykowanych odczynników do wykrycia określonych gatunków pasożytów, jak to ma miejsce w przypadku metod pośrednich. Specyfika i efektywność metod mikroskopowych powoduje, że należą one do metodologii pierwszego rzutu w diagnostyce parazytologicznej. Badania kału na obecność pasożytów jelitowych są realizowane w większości placówek służby zdrowia na świecie, jednak ze względów ekonomicznych ograniczone są często do stosowania najtańszej i najprostszej metody diagnostycznej, jaką jest rozmaz bezpośredni, co może skutkować zmniejszeniem wykrywalności zarażeń.

Niniejsza rozprawa jest próbą oceny, które spośród wybranych metod koprologicznych są najbardziej efektywne w wykrywaniu pasożytów jelitowych w mikroskopii świetlnej w populacji o wysokim wskaźniku zarażeń, a także czy rozszerzenie metodologii badań do pięciu metod, wobec powszechnie stosowanej metody rozmazu bezpośredniego, zwiększy wykrywalność zarażeń pasożytniczych.

Na podstawie ww. założeń, sformułowano następujące cele:

Cel główny

Ocena efektywności wykrywania pasożytów jelitowych w mikroskopii świetlnej w oparciu o zastosowanie pięciu metod koprologicznych w porównaniu z jedną, powszechnie stosowaną metodą rozmazu bezpośredniego.

Cele szczegółowe

Określenie najefektywniejszej metody wykrywania helmintów jelitowych.

Określenie najefektywniejszej metody wykrywania pierwotniaków jelitowych.

Porównanie efektywności kosztów zastosowanych metod koprologicznych.

Material i metody

Material do badań koprologicznych w mikroskopii świetlnej stanowiły próby kału pobranego od 1550 mieszkańców Republiki Środkowej Afryki, utrwalone w 10% roztworze formaliny na czas transportu z Afryki do Polski, do Zakładu Epidemiologii i Medycyny Tropikalnej Wojskowego Instytutu Medycznego, gdzie przeprowadzono całość diagnostyki parazytologicznej. Badania przeprowadzone

w 2015 r. były możliwe dzięki realizacji nadzoru epidemiologicznego w rejonie stacjonowania żołnierzy PKW w Republice Środkowej Afryki oraz nawiązaniu współpracy z misjami katolickimi kierującymi ośrodkami służby zdrowia zajmującymi się leczeniem ludności miejscowej.

Do badań przystąpili mieszkańcy dwóch sąsiadujących ze sobą ekosystemów, żyjący w różnych warunkach bytowych i sanitarno-higienicznych. Grupę badaną (n=950) stanowili Pigmeje z plemienia Aka prowadzący koczowniczy tryb życia w lasach tropikalnych w rejonie Bagandou (pogranicze Republiki Środkowej Afryki /RŚA/ i Kongo) oraz Monassao (pogranicze RŚA i Kamerunu). Grupę kontrolną (n=600) stanowiła ludność osiadła zamieszkująca miejscowość Bagandou.

Kryterium włączenia do badań: pacjenci w wieku od 1 do 75 lat, bez względu na stan zdrowia.

Kryterium wykluczenia z badań: pacjenci mogli w każdym momencie wycofać się z badań. Zgodę na udział w badaniu stanowiły podpisy (zazwyczaj znaki 'x' stawiane przy nazwisku ze względu na powszechny analfabetyzm) pacjentów na listach zbiorczych, po uprzednim zapoznaniu pacjentów grupy badanej i kontrolnej z dokumentacją informacyjną, którą stanowiła informacja dla pacjenta oraz formularz świadomej zgody zapisane w języku sango (lokalny język ludności koczowniczej i osiadłej w pld.-zach. Republice Środkowej Afryki).

Zadanie badawcze otrzymało akceptację Komisji Bioetycznej Wojskowego Instytutu Medycznego (Uchwała nr 4/WIM/2015 z dn. 21.01.2015 r.) i było realizowane jako grant młodego naukowca (Sygn. nr 325/WIM/2015).

Diagnostyka koprologiczna w mikroskopii świetlnej została przeprowadzona w oparciu o następujące metody badawcze:

- rozmaz bezpośredni w płynie Lugola,
- dekantacja w wodzie destylowanej,
- flotacja w NaCl (metoda Fülleborne'a),
- gruby rozmaz kału metodą Kato-Miura,
- sedymentacja w systemie DiaSyS/PARASYS.

Wyniki

W grupie badanej (n=950) najefektywniejszą metodą w wykrywaniu helmintów obłych i płaskich (tasiemców, przywr) była flotacja w NaCl (metoda Fülleborne'a), natomiast w wykrywaniu pierwotniaków dekantacja w wodzie destylowanej.

W grupie kontrolnej (n=600) najefektywniejszą metodą w wykrywaniu helmintów obłych i płaskich (tasiemców, przywr) był rozmaz gruby kału metodą Kato-Miura (łącznie w grupach badanej i kontrolnej /n=1550/ najefektywniejszą metodą w wykrywaniu helmintów obłych i płaskich była flotacja w NaCl), natomiast w wykrywaniu pierwotniaków dekantacja w wodzie destylowanej.

Zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej najefektywniejszą kosztowo metodą w wykrywaniu helmintów obłych i płaskich była flotacja w NaCl, natomiast w wykrywaniu pierwotniaków dekantacja w wodzie destylowanej.

Badaniami koprologicznymi wykonanymi pojedynczą metodą rozmazu bezpośredniego w grupie badanej (n=950) wykryto łącznie 1422 zarażenia pasożytnicze u 81,2% osób. Badaniami wykonanymi pojedynczą metodą rozmazu bezpośredniego w grupie kontrolnej (n=600) wykryto łącznie 399 zarażeń pasożytniczych u 64,8% osób.

Najczęściej wykrywanymi gatunkami pasożytów jelitowych pojedynczą metodą rozmazu bezpośredniego w grupie badanej (n=950) były *Ascaris lumbricoides* (38,1%), *Ancylostoma duodenale/Necator americanus* (29,8%) i *Giardia intestinalis* (9,8%).

Najczęściej wykrywanymi gatunkami pasożytów jelitowych pojedynczą metodą rozmazu bezpośredniego w grupie kontrolnej (n=600) były *Giardia intestinalis* (39,1%), *Ascaris lumbricoides* (24,6%) i *Ancylostoma duodenale/Necator americanus* (22,3%).

Badania koprolologiczne wykonane kolejnymi czterema metodami (DEK, FLOT, KM, PAR) w grupie badanej (n=950) pozwoliły na zwiększenie wykrywalności odsetka osób zarażonych do 90,5% (wzrost o 9,3%) oraz zwiększenie liczby zarażeń pasożytniczych do 1587 (wzrost o 10,4%).

Badania koprolologiczne wykonane kolejnymi czterema metodami (DEK, FLOT, KM, PAR) w grupie kontrolnej (n=600) pozwoliły na zwiększenie wykrywalności odsetka osób zarażonych do 72,2% (wzrost o 7,4%) oraz zwiększenie liczby zarażeń pasożytniczych do 474 (wzrost o 15,8%).

Najczęściej wykrywanymi gatunkami pasożytów jelitowych kolejnymi czterema metodami koprolologicznymi w grupie badanej (n=950) były *Ascaris lumbricoides* (34,0%), *Ancylostoma duodenale/Necator americanus* (30,4%) i *Trichuris trichiura* (10,2%).

Najczęściej wykrywanymi gatunkami pasożytów jelitowych kolejnymi czterema metodami koprolologicznymi w grupie kontrolnej (n=600) były *Giardia intestinalis* (30,2%), *Ascaris lumbricoides* (25,7%) i *Ancylostoma duodenale/Necator americanus* (24,5%).

Przeprowadzone badania i analizy pozwoliły na wysunięcie następujących wniosków:

1. Rozszerzenie badań koprolologicznych o kolejne cztery metody mikroskopowe, w porównaniu z jedną metodą rozmazu bezpośredniego, pozwoliło zwiększyć wykrywalność pasożytów jelitowych oraz liczbę osób zarażonych w populacji o wysokim wskaźniku zarażeń, zarówno w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej.
2. Najbardziej efektywną metodą wykrywania helmintów jelitowych była flotacja w NaCl (metoda Fülleborne'a).
3. Najbardziej efektywną metodą wykrywania pierwotniaków jelitowych była dekantacja w wodzie destylowanej.
4. Najefektywniejszą kosztowo metodą w wykrywaniu helmintów jelitowych była flotacja w NaCl, natomiast w wykrywaniu pierwotniaków jelitowych dekantacja w wodzie destylowanej.

Przedstawione wyniki badań mogą zostać wykorzystane do opracowania procedur w zakresie prowadzenia badań przesiewowych zarówno pod kątem analizy prevalencji inwazji pasożytniczych, jak również wyboru najbardziej optymalnych metod diagnostycznych.

Comparison of effectiveness of coprological methods on the example of diagnostics of intestinal parasites in the light microscopy

Parasitic infections pose a serious health problem for population globally. It is estimated that approximately 2 billion people are infected with at least one species of intestinal parasites worldwide. There are a number of risk factors which may be associated with the spread of parasitic infections; in particular, poor socioeconomic conditions and lack of adequate sanitation, especially in terms of food and feeding hygiene. Some inhabitants, e.g. those living in developing countries in Africa, Asia, Central and South America run a higher risk for acquiring food- or water-borne pathogens. The most common reservoirs are human hosts as well as food and water which had been contaminated with parasites, at any of their developmental stage. The transmission of geohelminths is remarkably widespread in those countries where animal manure is used as soil fertilizer.

Parasitological diagnostics remains a very useful tool for assessing the prevalence and transmission rates of intestinal helminths and protozoa in a given population. Many kinds of methods to detect parasites are available nowadays. In order to choose the most effective one their sensitivity, repeatability of results and available technical resources need to be considered. Theoretical and practical knowledge of a laboratory diagnostician performing parasitological tests is also important and it needs to be taken into account.

Generally, parasitological methods fall into two broad categories: direct, which make it possible to detect any of the developmental stages of a parasite, and indirect, which focus on the effects of parasite presence on their hosts (immunological and molecular methods). Direct diagnostics include methods based on the analysis of the morphological features of a parasite, mostly by light microscopy and allow researchers to identify the parasite species without the use of dedicated reagents, as is the case with indirect methods. Because of their specificity and effectiveness direct methods remain first-line methodology in parasitological diagnostics. Intestinal parasite screening is carried out in most healthcare facilities around the world, however, for economic reasons only the cheapest and the easiest testing method, i.e. direct smear, is usually applied, which may have a negative impact on detection rates.

This dissertation aims at evaluating which of the selected coprological methods using light microscopy are the most effective in detecting intestinal parasites in high prevalence populations; it also tries to determine whether the extension of research methodology to five testing methods vs. the commonly applied direct smear method will increase detection rates of intestinal infections. Based on the above assumptions, the objectives of this dissertation are:

Main objective

To evaluate the effectiveness of detecting intestinal parasites through the application of five different coprological testing methods by light microscopy in comparison to the effectiveness of a commonly applied single direct smear test.

Detailed objectives

To determine the most effective method of detecting intestinal helminths.

To determine the most effective method of detecting intestinal protozoa.

To compare the cost efficiency of the coprological testing methods used in the study.

Material and methods

The material for coprological tests to be performed by light microscopy included stool samples obtained from 1550 residents of the Central African Republic. The samples were fixed in 10% formalin to ensure their safe transport from Africa to the Department of Epidemiology and Tropical Medicine of the Military Institute of Medicine in Poland. All of the parasitological diagnostics was carried out in the above-mentioned institute. The research study was carried out in 2015 and it was

supported by personnel conducting epidemiological surveillance in areas where Polish Military Contingents are deployed, including in the Central African Republic; the study was conducted in cooperation with Catholic missionaries running health care facilities where local residents receive medical aid. It involved the residents of two neighboring ecosystems, which differed in terms of living conditions and standards of hygiene and sanitation. The experimental group (n=950) consisted of the nomadic Aka Pygmies living in the tropical forests in the districts of Bagandou (on the border between the Central African Republic /CAR/ and Congo) and Monassao (on the border between CAR and Cameroon). The control group (n=600) consisted of the residents settled in the Bagandou village.

Inclusion criteria: patients aged between 1 and 75 years, regardless of their health condition.

Exclusion criteria: patients could withdraw from the study at all times. All subjects agreed to take part in the study by putting their handwritten signature next to their name in the register with the names of all study participants (the signature was usually the 'x' mark because a majority of local residents are illiterate). Prior to this all study participants were given the necessary information concerning the study, i.e. the patient information leaflet and the informed consent form both in the Sango language (a local language commonly used by both the nomadic and sedentary tribes living in the southwest of the Central African Republic).

The Research Task was approved by the Bioethics Committee of the Military Institute of Medicine (Resolution no. 4/WIM/2015 of 21.01.2015) and was funded from a young scientist grant (Ref. no. 325/WIM/2015).

Coprological diagnostics was performed by means of the following light microscopy methods:

- direct smear in Lugol's solution,
- decantation with distilled water,
- flotation in NaCl solution (Fülleborn's method),
- the Kato-Miura method (thick stool smear),
- sedimentation by the DiaSyS/PARASEP system.

Results

In the experimental group, flotation in NaCl solution (also known as the Fülleborn's method) turned out to be the most effective method for detecting nematodes, cestodes and trematodes (n=950), while decantation with distilled water proved to be the most effective in detecting protozoa.

As for the control group (n=600), the Kato-Miura method (thick stool smear) was the most effective method for detecting nematodes, cestodes and trematodes (in general, flotation in NaCl solution was the most effective method for detecting nematodes, cestodes and trematodes in both the experimental and the control group /n=1550/), whereas decantation with distilled water was most useful in detecting protozoa.

Both in the experimental and in the control group, the most cost-efficient method for detecting nematodes, cestodes and trematodes was flotation in NaCl solution, whereas decantation with distilled water was the most cost effective way of detecting protozoa.

In the experimental group, the coprological diagnostics performed by means of a single direct smear test found a total of 1422 parasitic infections in 81.2% of the group. A single direct smear test performed on samples obtained from the controls (n=600) revealed a total of 399 parasitic infections in 64,8% of the group.

The most common intestinal parasites which had been detected by means of a single direct smear test among the participants of the experimental group (n=950) included: *Ascaris lumbricoides* (38.1% of all species identified), *Ancylostoma duodenale/Necator americanus* (29.8%) and *Giardia intestinalis* (9.8%).

The most common intestinal parasites which had been detected by means of a single direct smear test among the controls (n=600) included *Giardia intestinalis* (39.1%), *Ascaris lumbricoides* (24.6%) and *Ancylostoma duodenale/Necator americanus* (22.3%).

The use of the other four coprological testing methods (DEC, FLOT, KM, PAR) in the experimental group (n=950) increased detection rates to 90.5% (an increase of 9.3%) and revealed a total of 1587 parasitic infestations (an increase of 10.4%).

The use of the other four coprological testing methods (DEC, FLOT, KM, PAR) in the control group (n=600) increased detection rates to 72.2% (an increase of 7.4%) and revealed a total of 474 parasitic infestations (an increase of 15.8%).

The most common intestinal parasites which had been detected by means of the other four coprological testing methods in the experimental group (n=950) included: *Ascaris lumbricoides* (34.0%), *Ancylostoma duodenale/Necator americanus* (30.4%) and *Trichuris trichiura* (10.2%).

The most common intestinal parasites which had been detected by means of the other four coprological testing methods among the controls (n=600) included: *Giardia intestinalis* (30.2%), *Ascaris lumbricoides* (25.7%) and *Ancylostoma duodenale/Necator americanus* (24.5%).

The results of the research study and the analyses which were performed have led to the following conclusions:

1. The extension of the research methodology by four other testing methods vs. a single direct smear method increased detection rates of intestinal parasites and revealed that the number of infected individuals was actually higher, both in the experimental and in the control group.
2. Flotation in NaCl solution (also known as the Fülleborn's method) was the most effective method for detecting intestinal helminths.
3. Decantation with distilled water proved to be the most effective method for detecting intestinal protozoa.
4. Flotation in NaCl solution turned out to be the most cost-efficient method for detecting intestinal helminths, whereas decantation with distilled water was the most cost effective way of detecting intestinal protozoa.

The research results may be used to establish procedures for conducting population-based studies aimed at assessing the actual prevalence rates of parasitic infections in a given population and selecting the optimal diagnostic methods for detecting intestinal parasites.