

**4**

## Diagnostyka parazytologiczna u kotów, psów i koniowatych

Przewodnik ESCCAP 04 wydanie pierwsze – listopad 2022

ESCCAP  
Malvern Hills Science Park, Geraldine Road, Malvern,  
Worcestershire, WR14 3SZ, United Kingdom

Po raz pierwszy opublikowany przez ESCCAP w 2022 r.

© ESCCAP 2022

Wszystkie prawa zastrzeżone

Publikacja została wydana zgodnie z zasadą, że nie wolno dokonywać redystrybucji lub reprodukcji części, jak też całości wydawnictwa w jakikolwiek sposób, tj. za pomocą nośników elektronicznych, mechanicznych, wykonywania kserokopii lub nagrywania bez uprzedniego uzyskania pisemnej zgody od ESCCAP.

Publikacja może być rozpowszechniana tylko w formie, w której ukazała się po raz pierwszy, chyba że odbywa się to za uprzednią pisemną zgodą ESCCAP.

Numer katalogowy tej publikacji został udostępniony przez Bibliotekę Brytyjską.

**ISBN: 978-1-913757-58-8**

## SPIS TREŚCI

<b>WSTĘP</b>	6
Pobieranie, transport i przechowywanie materiału diagnostycznego	7
Standardowe wyposażenie laboratorium parazytologicznego	8
Media i roztwory	10
<b>1. BADANIA KOPROSKOPOWE</b>	10
1.1. Informacje ogólne	10
1.2. Metody koproskopowe	12
1.2.1. Sedymentacja w wodzie	12
1.2.2. Flotacja z wirowaniem	13
1.2.3. Połączona metoda sedymentacyjno-flotacyjna	14
1.2.4. Zmodyfikowana metoda McMastera do liczenia jaj	15
1.2.5. Mini-FLOTAC	16
1.2.6. Metoda dwukrotnego wirowania do wykrywania jaj <i>Anoplocephala</i> w kale koni	17
1.2.7. Metoda SAFC	18
1.2.8. Metoda Telemanna-Rivasa	19
1.2.9. Metoda Baermanna	19
1.2.10. Hodowla larw z kału	20
1.2.11. Rozmaz kału, barwienie	20
1.2.12. Metoda przylepca	21
1.2.13. Zestawy komercyjne do analizy kału/InPouch® TF Feline/testy kopro antygenowe	21

## 4 Diagnostyka parazytologiczna u kotów, psów i koniowatych

<b>2. SEROLOGIA</b>	23
2.1. Informacje ogólne	23
2.2. Ilościowe metody wykrywania przeciwciał	26
2.2.1. Test immunofluorescencji pośredniej na obecność przeciwciał (IFAT)	26
2.2.2. Test immunoenzymatyczny (ELISA)	26
2.3. Metody jakościowe	27
2.3.1. Systemy szybkiego testowania	27
<b>3. BADANIE SKÓRY</b>	27
3.1. Informacje ogólne	27
3.2. Wyczesywanie pcheł	27
3.3. Zeskrobiny skóry	28
3.4. Metoda przylepca	29
3.5. Trichogram	29
3.6. Wykrywanie roztoczy w wosku usznym	30
3.7. Metody biomolekularne	30

<b>4. RÓŻNE TECHNIKI</b>	30
4.1. Rozmaz krwi	30
4.1.1. Informacje ogólne	30
4.1.2. Patogeny wykrywane w rozmazach krwi	31
4.2. Metoda kożuszka	32
4.3. Aspiraty cienkoigłowe	32
4.3.1. Informacje ogólne	32
4.3.2. Patogeny wykrywane w aspiratach cienkoigłowych	33
4.4. Wykrywanie i identyfikacja mikrofilarii	33
4.4.1. Informacje ogólne	33
4.4.2. Test Knotta	34
4.4.3. Zmodyfikowany test Knotta	34
4.4.4. Metoda filtracji (Difil-Test®)	34
4.4.5. Barwienie kwaśną fosfatazą	35
4.4.6. Pomiary mikrofilarii	35
4.5. Biomolekularne metody wykrywania i różnicowania: reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) i izotermiczna amplifikacja materiału genetycznego (LAMP)	36
4.5.1. Informacje ogólne	36
4.5.2. Informacje szczegółowe	37
4.6. Wykrywanie dermatofitów	40
4.6.1. Informacje ogólne	40
4.6.2. Bezpośrednie badanie włosów	40
4.6.3. Badanie za pomocą lampy Wooda	40
4.6.4. Hodowla mykologiczna	40

## **ZAŁĄCZNIKI**

<b>ZAŁĄCZNIK 1 – ZASADY PODSTAWOWE</b>	41
<b>ZAŁĄCZNIK 2 - SŁOWNICZEK, SKRÓTY I PRZYDATNE LINKI</b>	42

## WSTĘP

Trafna diagnoza zarażenia i/lub choroby jest warunkiem wstępnym właściwego leczenia i skutecznego zwalczania, a rozpoznawanie chorób pasożytniczych nie jest wyjątkiem. Wstępna diagnoza oparta na objawach klinicznych, badaniach hematologicznych, biochemicznych, patologii lub histopatologii może być pomocna w wyborze konkretnych metod diagnostycznych do bezpośredniego lub pośredniego wykrywania pasożytów (lub zintegrowania obu).

Opracowanie standardowych procedur i dobrych praktyk laboratoryjnych ma fundamentalne znaczenie we wspieraniu lekarza weterynarii. Niezależnie od tego, czy potwierdza się diagnozę zarażenia u zwierząt towarzyszących wykazujących objawy kliniczne wskazujące na chorobę pasożytniczą, czy przeprowadza się badania przesiewowe pod kątem inwazji w ramach szerszego programu zapobiegania i zwalczania, niezbędnym jest zastosowanie metod dokładnych i niezawodnych.

### Wykrywanie bezpośrednie

Parazytologiczne metody laboratoryjne często umożliwiają bezpośrednie rozpoznanie pasożytów w oparciu o ich morfologię lub bezpośrednie wykrycie śladów obecności pasożytów, takich jak antygeny lub DNA.

#### Bezpośrednie wykrycie pasożytów jest możliwe poprzez:

- identyfikację morfologiczną (makroskopowa, mikroskopowa, bezpośrednio lub po zagęszczeniu, po wybarwieniu lub wyznakowaniu swoistymi przeciwciałami, po hodowli w kierunku patogenów grzybiczych);
- diagnostykę immunologiczną w kierunku antygenów pasożytów;
- biomolekularne wykrywanie pasożytniczego DNA;
- wykrywanie makrocząsteczek pasożytów metodą spektrometrii mas;
- hodowlę *in vitro* w celu namnażania lub rozwoju stadiów pasożytniczych.

#### Czynniki ograniczające obejmują:

- nieregularne rozmieszczenie i wydalanie pasożytów;
- nieprawidłowe pobieranie próbek, ich przechowywanie i transport;
- ograniczenie dostępnych danych genetycznych/proteomicznych;
- w niektórych przypadkach niską czułość lub specyficzność.

Zastrzeżenie: Biomolekularne wykrywanie DNA lub antygenu może czasami prowadzić do wyników fałszywie dodatnich, ponieważ te ślady obecności pasożytów mogą utrzymywać się przez pewien czas po ustąpieniu zarażenia.

### Wykrywanie pośrednie

W przypadku niektórych zarażeń pasożytniczych bezpośrednie stwierdzenie nie zawsze jest możliwe. Może to być spowodowane szczególną lokalizacją pasożytów w organizmie, występowaniem w bardzo niskiej intensywności, gdy nie można ich wykryć metodami bezpośrednimi, względnie gdy metoda jest zbyt pracochłonna lub inwazyjna dla pacjenta. W takich przypadkach bardzo pomocne może być wykrywanie pośrednie, poprzez rozpoznanie reakcji immunologicznych na pasożyty. Pośrednie metody wykrywania obejmują stwierdzanie specyficznych przeciwciał w różnym materiale od pacjenta.

#### Czynniki ograniczające obejmują:

- zmienne i opóźnione reakcje immunologiczne (w zależności od czasu po zarażeniu, intensywności, lokalizacji pasożytów i rodzaju reakcji);
- trwałość i reaktywność krzyżową przeciwciał;
- w niektórych przypadkach niską czułość lub specyficzność.

Przeciwciała mogą utrzymywać się w różnym czasie po ustąpieniu zarażenia, więc możliwość wykrywania istniejących zarażeń może być ograniczona.

Niniejszy przewodnik jest przeznaczony dla lekarzy weterynarii, którzy w swojej praktyce wykonują rutynowe procedury diagnostyczne w celu wykrycia zarażeń pasożytniczych, a także dla tych, którzy regularnie przesyłają próbki do zewnętrznych laboratoriów.

Został on podzielony na rozdziały, bazując na rodzaju badanego materiału oraz dostępnych metodach. Przewodnik zawiera również ogólne informacje na temat pobierania próbek, obchodzenia się z nimi i ich przechowywania.

## **POBIERANIE PRÓBEK, WYSYŁKA I PRZECHOWYWANIE MATERIAŁU DIAGNOSTYCZNEGO**

### **Uwagi ogólne**

Dokładność testów diagnostycznych zależy w dużej mierze od prawidłowego pobierania próbek, ich przechowywania i transportu. Każda próbka musi być odpowiednio oznakowana (dane pacjenta i właściciela wraz z datą pobrania), wysłana w szczelnie zamkniętych, nietłukących pojemnikach (oznakowanych zgodnie z krajowymi i międzynarodowymi przepisami dotyczącymi transportu materiałów potencjalnie zakaźnych), szybko przetransportowana do laboratorium wraz z prawidłowo wypełnionymi formularzami umożliwiającymi personelowi laboratorium przypisanie próbki i wykonanie zleconego badania. Probki krwi/surowicy należy przesyłać kurierem w szczelnej plastikowej probówce z zakrętką, w schłodzonym opakowaniu. Probówkę należy umieścić w zamykanej strunowej torebce/opakowaniu na próbki na wypadek pęknięcia probówki, zabezpieczonej materiałem ochronnym i umieszczonej w wytrzymałym opakowaniu transportowym.

Wiele laboratoriów zapewnia szczegółowe wytyczne dotyczące pobierania próbek i ich wysyłki. Ponadto należy przestrzegać ogólnych i specjalnych środków ostrożności oraz odpowiednio utylizować substancje toksyczne lub materiały zakaźne.

### **Pobieranie i przechowywanie próbek**

#### **1. Materiał kałowy**

Próbki kału należy pobierać z prostnicy lub bezpośrednio po defekacji, aby zapobiec zanieczyszczeniu materiałem ze środowiska, w którym mogą znajdować się wolno żyjące nicienie. Do badań należy użyć próbek świeżych lub przechowywanych w temperaturze 4°C, ponieważ jaja niektórych robaków i oocyst kokcydiów mogą nadal się rozwijać i zmieniać swoje cechy diagnostyczne. W starszych próbkach kału larwy pierwszego stadium nicieni płucnych (L1) mogą nie być zdolne do migracji przy zastosowaniu metody Baermanna. Larwy *Strongyloides* spp. i słupekowców mogą wykluc się z jaj, odpowiednio po kilku godzinach lub dniach, a próbki badane w kierunku wykrycia jaj mogą dać wynik fałszywie ujemny. Aby zapobiec rozwojowi jaj nicieni, próbki i pojemniki powinny zawierać jak najmniej tlenu i być szczelnie zamknięte.

W parazytologii weterynaryjnej próbki kału zwykle nie są konserwowane przez długi czas przed badaniem. Dłuższe przechowywanie może wymagać konserwacji, np. chemikaliami (patrz fachowe piśmiennictwo dotyczące mediów) lub przez zamrożenie w temperaturze -20°C. Należy zaznaczyć, że w zakonserwowanym lub wcześniej zamrożonym materiale nie mogą być miarodajnie wykryte niektóre stadia pasożytnicze, szczególnie larwy nicieni, jaja słupekowców i inne cienkoskorupowe jaja robaków.

#### **2. Surowica**

W większości przypadków próbki surowicy do identyfikacji i ilościowego oznaczenia antygenów lub przeciwciał uzyskuje się z krwi obwodowej. W idealnym przypadku krew powinna swobodnie napływać do probówki; zapobiega to hemolizie. Jeśli to możliwe, należy pobrać co najmniej 5 ml krwi, aby zapewnić objętość surowicy wynoszącą 2 ml dla całego panelu testowego. Po koagulacji trwającej co najmniej 20 minut, surowicę oddziela się od skrzepu przez odwirowanie, przenosi do świeżej probówki i najlepiej od razu przesyła. W razie potrzeby surowicę można przechowywać w temperaturze 4°C przez maksymalnie 24 godziny przed wysyłką. Dłuższe przechowywanie, jeśli to konieczne, powinno odbywać się w temperaturze -20°C. Należy pamiętać, że wirowanie przed całkowitym skrzepnięciem może spowodować hemolizę, która może zakłócić test; pozostawienie krwi na zbyt długi czas może prowadzić do wzrostu drobnoustrojów i późniejszej degradacji próbki. Jeśli surowica nie jest dostępna, do niektórych testów można użyć osocza; musi to zostać uzgodnione z laboratorium przed badaniem.

### 3. Pełna krew

Do mikroskopowego lub molekularnego wykrywania pasożytów lub DNA pasożytów w krwi pełnej (bezpośrednio lub po zagęszczeniu, np. w teście Knotta) stosuje się probówki z antykoagulantem (EDTA, Li-heparyna). Próbkę krwi pełnej można przechowywać w temperaturze 4°C maksymalnie przez 4 dni. Zamrażanie próbek w temperaturze -20°C w celu ułatwienia dłuższego przechowywania nadal umożliwia wykrywanie DNA, ale ogranicza izolację i identyfikację stadiów pasożytniczych.

### 4. Izolowane pasożyty

Żywe stawonogi (oraz zeszkobiny skóry) należy przechowywać w szczelnie zamkniętym pojemniku, aby zapobiec ich ucieczce. Aby zapobiec odwodnieniu, można dodać trochę wilgotnej bibuły papierowej. Do dalszych badań należy je utrwalić w 70% etanolu. Pasożyty z kału, wymiocin, skóry itp. należy zbierać oddzielnie i konserwować w roztworze soli fizjologicznej (krótkoterminowo) lub w 70% etanolu.

## STANDARDOWE WYPOSAŻENIE LABORATORIUM PARAZYTOLOGICZNEGO

Ponieważ mikroskopia jest standardową techniką oceny próbek, dobrze utrzymany mikroskop świetlny jest niezbędny do diagnostyki parazytologicznej. Pomiary mikroskopowe są często niezbędne do identyfikacji, dlatego powinien być dostępny sprzęt do dokładnych, znormalizowanych pomiarów. W przypadku obiektów widocznych gołym okiem, mikroskop stereoskopowy jest zwykle najlepszą opcją do szczegółowego badania (patrz Tabela 1).

Tabela 1. Zalecane zakresy powiększeń i kryteria identyfikacji stadiów pasożytniczych

Stadia	Zakres powiększenia*
jaja i larwy robaków, małe stawonogi	Małe powiększenie do badań przesiewowych: 40-100x; Szczegóły: 400x
Pierwotniaki	Średnie i duże powiększenie: 400–650x Rozmazy krwi, bardzo małe obiekty w kale: 1000x (pod imersją)
Duże stawonogi, dorosłe robaki (lub ich części, np. proglotydy)	Małe powiększenie (mikroskop stereoskopowy)

\* Należy pamiętać, że dla mikroskopu świetlnego powiększenie jest obliczane jako powiększenie okularu (zwykle 8-10x) x powiększenie obiektywu, podczas gdy mikroskop stereoskopowy wykorzystuje tylko jeden zestaw soczewek powiększających.

Podczas rozpoznawania stadiów pasożyta pod mikroskopem należy wziąć pod uwagę różne cechy, takie jak wymiary, kształt, barwa i morfologia powierzchni, samej otoczki i narządów wewnętrznych. W celu identyfikacji larw nicieni (nicieni płucnych, słupkowców u koni, tęgoryjców psów i kotów lub *Strongyloides* spp.), gdy są żywe należy wziąć pod uwagę ich ruchliwość. Ponadto do identyfikacji pomocne są charakterystyczne struktury, takie jak morfologia przedniej części ciała, przełyku i końca ogona.



## W skład dodatkowego wyposażenia pracowni diagnostyki parazytologicznej wchodzi zazwyczaj:

### (A) do koproskopii:

- sprzęt do odważania
- tłuczek i moździerz
- plastikowy pojemnik i szpatułka, szpatułka do języka, plastikowa łyżka lub podobny przedmiot
- plastikowy patyczek lub wąska szpatułka
- wacik
- plastikowa elastyczna butelka
- probówki wirówkowe (12–15 ml; 50 ml)
- wirówka stołowa z wychylnym rotorem
- zlewka (250 ml) lub inny pojemnik odpowiedni do sedymentacji
- lejek
- sitka do herbaty o wielkości sita ok. 0,5-1 mm (do flotacji lub sedymentacji-flotacji) i 0,3 mm (do sedymentacji)
- druczana pętka (wygięta pod kątem prostym, o średnicy około 6 mm) lub inne wyposażenie do pobierania kropli roztworu flotacyjnego z powierzchni
- szkiełka mikroskopowe
- szkiełka nakrywkowe
- olejki immersyjne
- szalka Petriego (szklana lub plastikowa, ze znakowanym dnem dla łatwiejszego badania mikroskopowego)
- roztwór błękitu metylenowego (atrament)
- pompka wodna (lub pipety 10-20 ml)
- gaza bawełniana (20 x 20 cm)
- plastikowe lub szklane pipety Pasteura
- komora do liczenia jaj lub oocyst (np. McMaster, FLOTAC)

### Ponadto do metody Baermanna:

- aparat do mocowania lejka
- gumowa rurka i zacisk rurki
- kalibrowane cylindry miarowe (100 ml i większe)
- mieszadło magnetyczne i magnesy mieszające

### W przypadku koprokultur również:

- słoik 500 ml (lub podobny)
- szalka Petriego o nieco większej średnicy niż szklany słoik
- komora do hodowli w temperaturze 25°C w ciemności
- autoklawowane trociny, węgiel drzewny lub wermikulit

### (B) do hematologii i serologii

- W zależności od formatu i metody odczytu potrzebne jest różne wyposażenie, np. mikroskop wyposażony we fluorescencję do IFAT lub czytnik płytek do testu ELISA itp., a także pipety laboratoryjne i sprzęt do barwienia

### (C) w przypadku zeszkrobin skóry:

- 10% roztwór KOH lub laktofenol
- olej mineralny lub gliceryna

## MEDIA I ROZTWORY

- 0,9% NaCl (roztwór soli fizjologicznej)
- roztwory flotacyjne (patrz tabela 2)
- płyn Lugola (10 g jodku potasu, 5 g jodu, w 200 ml wody destylowanej)
- eter dietylowy<sup>1</sup>
- SAF (octan sodu-kwas octowy-formalina): 4,5 g octanu sodu, 6,0 ml stężonego kwasu octowego, 12,0 ml formaliny<sup>1</sup>
- barwienie Ziehla-Neelsena: fuksyna karbolowa, zieleń malachitowa, kwaśny alkohol (15 ml HCl (37%) w 485 ml EtOH), metanol (użyj zestawu do barwienia)

<sup>1</sup> eter, formalina lub mertiolan-jod-formaldehyd (zawierający rtęć) są używane w metodzie zagęszczania SAF (patrz 1.2.7), metodzie Telemanna-Rivasa (patrz 1.2.8.) i/lub metodzie zagęszczania MIFC (mertiolan-jod-formaldehyd) (nieopisaną w niniejszym przewodniku). O wyborze przyjętej metody mogą decydować, między innymi, różne standardy bezpieczeństwa stosowane w laboratoriach w odniesieniu do tych roztworów.

Tabela 2. Składniki i właściwości roztworów flotacyjnych do koproskopowych analiz parazytologicznych (wybór)

Roztwór flotacyjny	Ilość	Objętość wody	Ciężar właściwy*
Nasycony roztwór soli (NaCl)	340–360 g NaCl	1000 ml	~1,18–1,2
Roztwór chlorku cynku i soli (ZnCl <sub>2</sub> + NaCl)	275 g ZnCl <sub>2</sub> + 262 g NaCl	1000 ml	1,3
Roztwór chlorku cynku (ZnCl <sub>2</sub> )	440 g ZnCl <sub>2</sub>	1000 ml	1,3
Roztwór chlorku cynku (ZnCl <sub>2</sub> )	660 g ZnCl <sub>2</sub>	1000 ml	1,45
Roztwór siarczanu cynku (ZnSO <sub>4</sub> )	760 g ZnSO <sub>4</sub>	1000 ml	1,3
Roztwór siarczanu magnezu (MgSO <sub>4</sub> )	350 g MgSO <sub>4</sub>	1000 ml	1,28
Roztwór sacharozy**	550 g sacharozy	440 ml	1,28
Nasycony roztwór soli z 50% glukozą	375 g glukozy + 250 g NaCl	Do 1000 ml	1,27
Roztwór soli z sacharozą**	50 g sacharozy + 100 ml nasyconego roztworu soli		1,33

\* w temperaturze pokojowej, mierzyć **gęstościomierzem**.

\*\* dodać 0,7 ml formaliny (37%) lub 1 g krystalicznego fenolu na każde 100 ml, aby zapobiec rozwojowi bakterii i grzybów, względnie przechowywać w temperaturze 4°C.

## 1. BADANIA KOPROSKOPOWE

### 1.1. Informacje ogólne

#### Badanie makroskopowe

Przed obróbką każda próbka kału powinna zostać zbadana makroskopowo na obecność wydalonych robaków (np. glist, członów tasiemca, owsików) lub krwi (w celu zakonserwowania wyizolowanych pasożytów, zob. wstęp).

#### Badanie mikroskopowe

Umożliwia wykrycie wydalonych jaj, pakietów jaj, larw, oocyst, trofozoitów (tylko w świeżym kale, jeśli nie został dodany roztwór konserwujący) i cyst.

Jaja robaków i (oo)cysty pierwotniaków należy różnicować na podstawie:

- kształtu: okrągłe, owalne, wielokątne, cytrynowate;
- rozmiaru: duży = około 80-150 (do 300)  $\mu\text{m}$  (np. jaja *Fasciola hepatica*, pakiety jaj *Dipylidium caninum*), średni = około 60-80 (do 120)  $\mu\text{m}$  (jaja Ancylostomatidae, jaja *Strongylidae*), mały = około 40-60  $\mu\text{m}$  (np. jaja *Strongyloides*, jaja Taeniidae) i bardzo małe = <40  $\mu\text{m}$  (np. oocysty kokcydiów i *Cryptosporidium*, cysty *Giardia*);
- otoczki: grubość, powierzchnia (np. gładka, szorstka, wpuklona), barwa, cechy wyróżniające, takie jak czopy biegunowe lub mikropyle; oraz
- zawartości (w odniesieniu do czasu po wydaleniu kału): komórki niesegmentowane, blastomery, zarodek lub larwa w jajach robaków, liczba sporocyst i sporozoitów oraz innych struktur w kokcydiach i innych pierwotniakach.

Larwy nicieni różnicuje się na podstawie ich całkowitej długości, morfologii osłonki kutykularnej, przewodu pokarmowego oraz przedniego i tylnego odcinka ciała. Można je odróżnić od larw nicieni wolnożyjących na podstawie braku dodatkowych osłonek. Wolnożyjące larwy nicieni mają wyraźny otwór gębowy i ciemniejszą barwę niż larwy inwazyjne nicieni pasożytniczych; mogą mieć zgrubienia przełyku i kilka innych cech wyróżniających.

W zależności od wykonywanej procedury wyróżnia się różnorodne techniki koproskopowe: metody bezpośrednio bez zagęszczania (tj. niebarwione i barwione rozmazy kału, wykrywanie stadiów ruchliwych) oraz metody zagęszczania stadiów pasożytniczych:

- sedymentacja
- flotacja (z wirowaniem lub bez)
- połączona metoda sedymentacyjno-flotacyjna
- metoda Baermanna
- specyficzne metody zagęszczania, takie jak metoda Telemanna-Rivasa, SAFC itp.

### Rozstrzygająca ocena badań koproskopowych

Wymienione metody mogą służyć wykryciu różnych pasożytów, jednak żadna z nich nie jest jednakowo skuteczna do stwierdzenia wszystkich obecnych w próbce pasożytów i ich stadiów. Preferowaną metodę należy wybrać w kierunku wykrycia spodziewanych stadiów pasożyta, natomiast aby uwzględnić pełne spektrum możliwych zarażeń niezbędne będzie zastosowanie kilku metod.

Ogólnie rzecz biorąc, im większa ilość kału, tym większe prawdopodobieństwo wykrycia stadiów pasożytniczych (wyższa czułość, tj. mniej wyników fałszywie ujemnych). Jednak ilość badanego kału będzie ograniczona stopniem zanieczyszczenia przetwarzanej próbki: zbyt duża ilość zanieczyszczeń zmniejsza czułość (tj. więcej wyników fałszywie ujemnych), a także swoistość.

Ponieważ większą ilość kału można zbadać **połączoną metodą sedymentacyjno-flotacyjną**, poziom czułości jest wyższy, szczególnie w przypadku niskiego poziomu wydalania pasożytów. Dlatego też jest to **preferowana metoda** rutynowych badań. Podobnie jak flotacja i sedymentacja, metoda ta jest klasyfikowana jako półilościowa, jeśli jest wykonywana przy użyciu spójnej metodologii i określonej liczby próbek kału. Aktywna flotacja wspomagana wirowaniem jest preferowana w porównaniu z flotacją pasywną. Również wybór roztworu flotacyjnego, a tym samym gęstość roztworu ma ogromne znaczenie, ponieważ niektórych pasożytów nie można wykryć w roztworach o wysokiej gęstości, a innych w roztworach o niskiej gęstości.

Czułość metod koproskopowych jest ograniczona przez następujące czynniki:

- Zarażenie musi być w fazie patentnej, tj. stadia rozwojowe (jaja, larwy, (oo)cysty) muszą być obecne w próbce, co wskazuje na trwającą inwazję z namnażaniem/wytwarzaniem potomstwa. Zarażenia pre- i postpatentne nie mogą być wykryte za pomocą kopromikroskopii.
- Nie wszystkie stadia rozwojowe/pasożyty są wydalone w sposób ciągły; może być konieczne pobranie kilku próbek od danego zwierzęcia (np. przez 3 kolejne dni) lub ponowne pobranie próbek.
- Często zarażenia na niskim poziomie są przyczyną wytwarzania tylko niewielkiej liczby wykrywalnych form pasożytniczych. Zwiększenie ilości kału lub wykonanie kilku analiz dla danego zwierzęcia może być korzystne, jak opisano powyżej.

Biegunka może rozcieńczyć próbki poprzez zwiększenie objętości kału, a tym samym zmniejszenie czułości. Można tego uniknąć stosując łączoną metodę sedymentacyjno-flotacyjną, która polega na zagęszczaniu płynnych odchodów przez sedymentację przed koncentracją pasożytów poprzez flotację.

Ze względu na niską czułość kopromikroskopii **wyniki ujemne** należy interpretować z ostrożnością. Fakt, że w kale nie wykryto żadnych stadiów pasożytniczych, nie wyklucza zarażenia pasożytniczego, gdy występują typowe objawy kliniczne (np. zarażenia, które są jeszcze w stadium prepatentnym). Takie przypadki wymagają dalszych badań. W niektórych przypadkach można zastosować metody alternatywne (tj. wykrywanie antygeny lub przeciwciał).

Z drugiej strony, bezpośrednie wykrywanie stadiów pasożytniczych ma na ogół wysoką specyficzność, a wyniki fałszywie dodatnie są rzadkie jeśli analiza jest przeprowadzona prawidłowo. Wyniki fałszywie dodatnie mogą wynikać z koprofagii u psów (tj. obserwowanego pasażu jelitowego pasożytów kotów *Toxocara cati* lub *Toxoplasma gondii* w próbkach kału psowatych). Dlatego należy doradzić właścicielom, aby próbowali zapobiegać takiemu zachowaniu, szczególnie w dniach poprzedzających pobranie próbki koproskopowej, aby uniknąć fałszywie dodatniego wykrycia pasażowanych stadiów pasożyta. Wykrywanie antygeny, które jest dostępne na rynku dla niektórych gatunków nicieni u psów, może umożliwić ominięcie tego problemu.

W celu interpretacji wyników w kontekście klinicznym należy ocenić wyniki badań parazytologicznych wraz z innymi ustaleniami diagnostycznymi (np. badaniem klinicznym, hematologicznym itp.), a w przypadku stadiów zoonotycznych - ich implikacjami dla zdrowia ludzkiego.

## 1.2. Metody koproskopowe

### 1.2.1. Sedymentacja w wodzie

#### Zasada:

Dzięki tej metodzie stadia pasożyta o stosunkowo wysokim ciężarze właściwym (np. jaja przywr, zwłaszcza *Fasciola hepatica* i *Opisthorchis felineus*, ale także oocysty *Eimeria leuckarti*) oraz ciężkie cząsteczki kału szybko osadzają się na dnie. Poprzez wielokrotną sedymentację i dekantację supernatantu usuwane są lżejsze cząstki kału. Metodę tę stosuje się zwykle do wykrywania jaj motylicy wątrobowej w kale koni, a także jaj przywry kociej w kale kotów.

#### Wymagany materiał kałowy:

5-10 g kału (czułość wzrasta po kilkukrotnym pobraniu próbek).

#### Procedura:

1. Wymieszać szpatułką próbkę kału z wodą do uzyskania jednorodnej zawiesiny. Jeśli kał jest bardzo zbity, rozdrobnić próbkę w wodzie za pomocą tłuczka i moździerza.
2. Przebrać zawiesinę przez sitko (oczko 0,3 mm) do odpowiedniego pojemnika (np. zlewki lub podobnego naczynia) i przepłukać sitko silnym strumieniem wody plastikowej elastycznej butelki, aż zlewka się wypełni.
3. Pozostawić na 3 minuty.
4. Nieprzerwanym ruchem zlać supernatant (lub odessać pompą wodną).
5. Ponownie napełnić zlewkę wodą.
6. Sedymentację powtórzyć trzy razy. Końcowy supernatant powinien być prawie przezroczysty.
7. Do ostatniej sedymentacji dodać 1-3 krople błękitu metylenowego (atramentu) i dokładnie wymieszać.
8. Wlać cały osad do szalki Petriego.
9. Zbadać osad pod mikroskopem lub stereomikroskopem (powiększenie 20-50x).

Do standardowego wykrywania jaj *Fasciola* w próbkach kału koni dostępny jest przyrząd FlukeFinder® (zestaw sitek – przyp. tłum.).

## 1.2.2. Flotacja z wirowaniem

### Zasada:

Flotację przeprowadza się w celu wykrycia jaj robaków, cyst pierwotniaków i oocyst, które mają ciężar właściwy niższy niż roztwór flotacyjny. W zawiesinie próbki kału rozproszony w roztworze flotacyjnym o znanym ciężarze właściwym, lżejsze formy pasożytnicze gromadzą się na powierzchni, podczas gdy cięższe cząstki opadają lub pozostają w zawiesinie.

Można zastosować wiele różnych roztworów flotacyjnych (patrz tabela 2 na str. 10). Wybrany roztwór należy przygotować co najmniej jeden dzień przed analizą i sprawdzić ciężar właściwy gęstościomierzem.

Za pomocą nasyconego roztworu chlorku sodu można wykryć jaja *Strongyloides* (świeże próbki), słupkowców, glist, owsików, oocysty kokcydiów i cysty pierwotniaków. Dzięki tej metodzie stadia pasożytnicze unoszą się dzięki ich niskiemu ciężarowi właściwemu w roztworze soli o wyższym ciężarze właściwym. Wykrywanie jaj *Trichuris*, *Capillaria*, tasiemców z rodziny Taeniidae, filarii lub owsików oraz oocyst *Eimeria leuckarti* może być niepewne, ponieważ wymagają one roztworów flotacyjnych o wyższym ciężarze właściwym. Cysty *Giardia* są zdeformowane, podczas gdy jaja przywr nie są wykrywane. Długotrwałe przechowywanie jaj robaków lub form pierwotniaków w roztworach hipertonicznych może prowadzić do deformacji tych stadiów, co utrudnia diagnostykę. Larwy nicieni można czasami znaleźć w roztworach flotacyjnych, jednak zwykle szybko ulegają deformacji i ich określenie staje się bardzo utrudnione.

Oprócz wyżej wymienionych stadiów, *Trichuris*, *Capillaria*, jaja Taeniidae i filarii oraz cysty *Giardia* (zdeformowane) można wykryć z zastosowaniem roztworów siarczanu cynku, chlorku cynku, siarczanu magnezu lub sacharozy/roztworu soli oraz sacharozy. Zużyte roztwory zawierające cynk (metal ciężki) należy gromadzić i usuwać jako odpady specjalne.

Możliwych jest kilka adaptacji standardowej techniki flotacji, z których niektóre opisano poniżej.

### Wymagany materiał kałowy:

Małe zwierzęta: 4-5 g (w przybliżeniu wielkości orzecha włoskiego), zbierane możliwie przez 3 kolejne dni, badane jako podpróbka zbiorczej próbki; konie: do 20 g kału.

### Procedura:

1. Przygotować roztwór flotacyjny w temperaturze pokojowej i określić ciężar właściwy za pomocą gęstościomierza (jeśli nie jest dostępny, mieszać aż sól prawie całkowicie się rozpuści).
2. Zmieszać próbkę kału z 10-krotną objętością roztworu flotacyjnego do uzyskania jednorodnego roztworu. Jeśli konsystencja kału jest zbita, namoczyć próbkę w wodzie.
3. Przebrać zawieszynę kału przez sitko do herbaty i za pomocą lejka do dwóch probówek wirówkowych na próbkę. Pozostawić 1 cm margines od góry w każdej probówce, aby uniknąć rozlania zawieszyny w wirówce.
4. Wirować probówki przez 3-5 minut przy 300 x g.
5. Za pomocą drucianej pętli (lub podobnego przyrządu) pobrać 3-5 kropli z powierzchni zawieszyny i umieścić na szkiełku mikroskopowym.
6. Przykryć szkiełkiem nakrywkowym i zbadać pod mikroskopem, rozpoczynając od 40-krotnego powiększenia. Ustawić ostrość, w odniesieniu do małych pęcherzyków powietrza lub cząstek w zawiesinie. Cały obszar szkiełka nakrywkowego można następnie zbadać przy większym powiększeniu (100–400x). W przypadku mniej zanieczyszczonych próbek, zwiększyć czułość może badanie bez szkiełka nakrywkowego przy małym powiększeniu, ponieważ jaja i cysty koncentrują się na wypukłej powierzchni kropli.

**Istnieje kilka możliwości badania mikroskopowego form pasożytniczych unoszących się na powierzchni próbek:**

- kilka kropel z powierzchni zawiesiny kału można przenieść na szkiełko za pomocą drucianej pętli wygiętej pod kątem prostym, a następnie zbadać (ze szkiełkiem nakrywkowym lub bez) pod mikroskopem. Należy uważać, aby nie naruszyć powierzchni zawiesiny podczas pobierania kropli; oczko pętli powinno być czyszczone po każdej próbce (spłukane, a następnie opalone nad płomieniem).
- umieścić szkiełko nakrywkowe na wypełnionej próbówce wirówkowej (szkiełko nakrywkowe powinno stykać się z powierzchnią roztworu flotacyjnego) i odwirować z założonym szkiełkiem nakrywkowym. Szkiełko nakrywkowe można następnie zdjąć, umieścić na szkiełku mikroskopowym i zbadać pod mikroskopem. Flotujące stadia pasożyta zostają przeniesione na szkiełko podstawowe wraz z płynem przylegającym do spodu szkiełka nakrywkowego. Wirowanie ze szkiełkiem nakrywkowym jest najskuteczniejsze z roztworem sacharozy.
- po odwirowaniu umieścić szkiełko nakrywkowe na próbówce (w tym celu próbkę należy napełnić całkowicie, tak aby powierzchnia roztworu utworzyła menisk wypukły), a następnie odczekać kilka minut, aby umożliwić wypłynięcie form pasożytniczych.

### **1.2.3. Połączona metoda sedymentacyjno-flotacyjna**

Dzięki tej metodzie stadia pasożytów najpierw gromadzą się tworząc osad w wodzie, a następnie unoszą się dzięki ich niskiemu ciężarowi właściwemu w roztworze flotacyjnym o wyższym ciężarze właściwym. Zaletą tej metody jest wyższa czułość, ponieważ można zbadać większą ilość kału (do 20 g).

Metodę można stosować do dokładnej identyfikacji jaj wszystkich rodzajów robaków oraz większości oocyst i cyst pierwotniaków. Wykrywanie larw nicieni i jaj przywr wymaga specjalistycznej wiedzy, ponieważ ulegają one deformacji. Nie jest możliwe wykrycie tą metodą trofozoitów i cyst pierwotniaków.

#### **Wymagany materiał kałowy:**

W przypadku psów i kotów pobiera się co najmniej 4-5 g kału (w przybliżeniu wielkości orzecha włoskiego). W niektórych przypadkach, aby zwiększyć prawdopodobieństwo wykrycia, przydatne może być pobranie próbek kału przez 3 kolejne dni i przebadanie podpróbek z próbki zbiorczej. W przypadku koni: do 20 g kału.

#### **Procedura:**

1. Próbkę umieścić w moździerzu i dokładnie rozetrzeć tłuczkiem w wodzie.
2. Zawiesinę przelać przez sitko za pomocą lejka do dwóch probówek wirówkowych. Przepłukać kał przez sitko silnym strumieniem wody z butelki z rozpylaczem (nie powinno dojść do utraty materiału).
3. Wirować przez 8 minut, przy około 500-700 x g, w celu sedymentacji.
4. Wylać supernatant jednym ruchem bez przerwy (lub odessać pompą wodną), aż pozostanie maksymalnie 5 mm osadu.
5. Napełnić probówki roztworem flotacyjnym.
6. Wirować probówki przez 3-5 minut przy 300 x g.
7. Postępować jak w przypadku flotacji (patrz 1.2.2.).

Alternatywnie, jeśli nie ma wirówki, rozmieszać próbkę kału z wodą i pozostawić probówki w temperaturze pokojowej na 30 minut do jednej godziny, zlać supernatant, wymieszać osad z roztworem flotacyjnym, dolać roztworu do pojawienia się menisku wypukłego. Nałożyć szkiełko nakrywkowe, odczekać 10-20 minut (w zależności od roztworu flotacyjnego), umieścić szkiełko nakrywkowe na szkiełku podstawowym, a następnie oglądać pod mikroskopem. Ta metoda jest mniej czuła, niż metody oparte na wirowaniu i zwykle wykrywa formy pasożytów obecne w większej liczbie.

## 1.2.4. Zmodyfikowana metoda McMastera do liczenia jaj

### Zasada:

Ta metoda jest stosowana do **ilościowego** badania kału pod względem liczby jaj robaków lub oocyst kokcydiów. Określoną ilość kału flotuje się w komorze i zlicza pod mikroskopem postacie pasożytów w obrębie zaznaczonego pola. Na tej podstawie oblicza się ich liczbę w 1 g kału i wyraża jako epg (liczba jaj na gram) lub opg (liczba oocyst na gram). Obliczenie liczby jest często stosowane do ilościowego oznaczania jaj słupekowców u koni, ale ma również zastosowanie do innych stadiów pasożytniczych, które flotują. Zwykle stosuje się nasycony roztwór flotacyjny NaCl; stosując roztwory flotacyjne o wyższym ciężarze właściwym można wykryć cięższe jaja.

W przypadku terenowych badań lekooporności technikę tę stosuje się przed i po leczeniu antyhelmintykiem (test redukcji liczby jaj w kale, FECRT). FECRT to badanie przeglądowe oceniające skuteczność leczenia.

W programach selektywnego zwalczania, liczba jaj w 1 g (epg) dostarcza informacji o znaczeniu poszczególnych zwierząt w stadzie w zanieczyszczeniu pastwiska i może być wykorzystana jako wsparcie decyzji w zabiegach selektywnego odrobaczania koni (patrz Przewodnik ESCCAP 8: Przewodnik leczenia i zwalczania inwazji pasożytów żołądkowo-jelitowych u koni).

Ze względu na granice wykrywalności (patrz poniżej), zmodyfikowana metoda McMastera nie jest zalecana do badań przesiewowych na obecność pasożytów u zwierząt, szczególnie w przypadku bardzo istotnych pasożytów wewnętrznych (tj. *Echinococcus* spp. u zwierząt mięsożernych lub *Parascaris* spp. u koni).

### Wymagany materiał kałowy:

Co najmniej 4 g kału.

### Procedura:

1. Dokładnie wymieszać w moździerzu 4 g kału z około 30 ml roztworu flotacyjnego.
2. Wlać zawiesinę kału przez sito i lejek do cylindra; wycisnąć pozostałość na sicie; przepłukać moździerz i tłuczek roztworem flotacyjnym.
3. Zdjąć sito i lejek oraz uzupełnić roztwór flotacyjny do 60 ml.
4. Przebrać zawiesinę do zlewki i dobrze wymieszać, np. mieszadłem magnetycznym.
5. Pobrać próbkę zawiesiny za pomocą pipety i napełnić pierwszą komorę płytki objętością co najmniej 0,15 ml. Komora musi być całkowicie wypełniona, bez pęcherzyków powietrza.
6. Ponownie dokładnie wymieszać zawiesinę i pobrać drugą próbkę, aby wypełnić drugą komorę płytki.
7. Pozostawić szkiełko na 5–10 minut, aby jaja/oocysty mogły ulec flotacji.
8. Umieścić płytkę pod mikroskopem i policzyć wszystkie postacie pasożytnicze w obrębie kratki do liczenia (powiększenie 40–100x).

### Kalkulacja jaj/oocyst na 1 g (epg/oeg):

$$\text{epg/opg} = (\text{liczba jaj/oocyst ze wszystkich zliczonych siatek (N)}/\text{ilość kału (g)} \times \text{powierzchnia kratki (cm}^2\text{)} \times \text{objętość zawiesiny kału (ml)}/\text{wysokość komory zliczającej (cm)} \times \text{liczba kratek (n)},$$

- gdzie N to średnia liczba jaj/oocyst zliczonych na siatkę;
- n oznacza liczbę zliczonych kratek;
- objętość pod kratką = powierzchnia kratki (cm<sup>2</sup>) x wysokość komory (cm).

### Przykład:

Gdy ilość kału = 4 g, objętość zawiesiny = 60 ml i objętość pod kratką = 0,15 ml, dolna granica wykrywalności wynosi 100 epg/opg. W przypadku płytek dwukomorowych i po dodaniu całkowitej liczby jaj zliczonych **pod obiema siatkami**, dolna granica wykrywalności na szkiełku wynosi 50 epg/opg.



epg/opg =

liczone jaja		objętość zawiesiny kału (ml)
ilość kału (g) x rozmiar siatki (cm <sup>2</sup> )	X	wysokość komory (cm) x liczba przeliczonych kratki

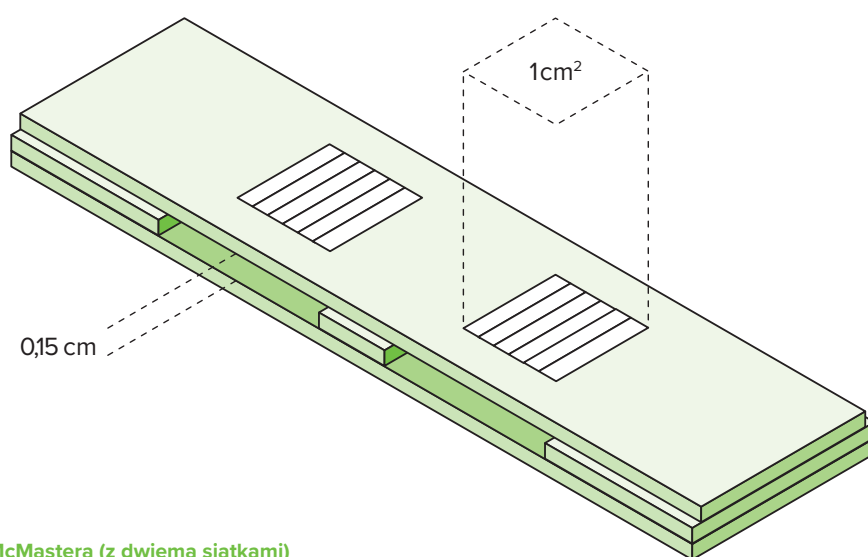
epg/opg = liczba jaj/ocyst na gram kału

rozmiar siatki: 1 x 1 cm = 1 cm<sup>2</sup>

wysokość komory = 0,15 cm

objętość pod siatką = 0,15 ml (liczona z wysokości komory i rozmiaru kratki)

liczba zliczonych kratki: może się zmieniać, dlatego jest to uwzględnione we wzorze



Rysunek 1: Komora McMastera (z dwiema siatkami)

### 1.2.5. Mini-FLOTAC

#### Zasada:

Mini-FLOTAC umożliwia wykrywanie i oznaczanie ilościowe pasożytów przewodu pokarmowego, w tym ocyst kokcydiów, jaj robaków i larw nicieni. Pochodzi od oryginalnego aparatu FLOTAC, ale ma tę dodatkową zaletę, że nie wymaga etapu wirowania. Mini-FLOTAC można wykonać na świeżych lub utrwalonych próbkach kału, co daje możliwość przebadania próbek kilka dni lub tygodni po przesłaniu ich do laboratorium. Czulość Mini-FLOTAC wynosi 5 ocyst/jaj/larw/kokcydiów na gram kału.

Mini-FLOTAC składa się z dwóch elementów: podstawy i dysku odczytującego. Istnieją dwie komory flotacyjne o pojemności 1 ml, które są przeznaczone do badania zawiesiny próbek kału, umożliwiając maksymalne powiększenie 400x.

Fill-FLOTAC 2 i 5 to jednorazowe urządzenia do badania próbek, które wchodzi w skład zestawów FLOTAC i Mini-FLOTAC. Składają się z pojemnika, kolektora (2 g lub 5 g) oraz filtra. Zestawy te ułatwiają wykonanie pierwszych czterech etapów techniki Mini-FLOTAC, tj. pobranie próbki (w tym ważenie), homogenizację, filtrację i napełnianie. Zestaw i proces Mini-FLOTAC opisano poniżej.



## Dla psów i kotów

### Wymagany materiał kałowy:

Co najmniej 2 g kału.

### Procedura:

1. Dodać 18 ml roztworu flotacyjnego do pojemnika Fill-FLOTAC 2.
2. Za pomocą szpatułki napełnić stożkowy kolektor urządzenia Fill-FLOTAC 2 g kału i wyrównać powierzchnię.
3. Zhomogenizować próbkę, przesuując stożkowy kolektor w górę i w dół.
4. Nałożyć końcówkę na Fill-FLOTAC, krótko homogenizować, a następnie napełnić dwie komory urządzenia Mini-FLOTAC, aż utworzy się mały menisk.
5. Po 10 minutach przesunąć dysk odczytowy, obracając go w kierunku zgodnym z ruchem wskazówek zegara i umieścić urządzenie pod mikroskopem za pomocą adaptera dołączonego do zestawu. Mini-FLOTAC można badać przy maksymalnym powiększeniu 400x.
6. Zbadać próbkę, odczytując obie komory Mini-FLOTAC. Pomnożyć każde zliczone jajo przez 5, aby uzyskać liczbę jaj/larw/oocyst na gram.

Uwaga: w celu niezawodnego wykrywania jaj tasiemców należy stosować roztwory flotacyjne o wyższej gęstości (patrz tabela 2).

## Dla koni

### Wymagany materiał kałowy:

Co najmniej 5 g kału.

### Procedura:

1. Dodać 45 ml roztworu flotacyjnego (tj. nasyconego NaCl) do pojemnika Fill-FLOTAC 5.
2. Za pomocą szpatułki napełnić stożkowy kolektor urządzenia Fill-FLOTAC 5 g kału i wyrównać powierzchnię.
3. Zhomogenizować próbkę, przesuując stożkowy kolektor w górę i w dół.
4. Nałożyć końcówkę na Fill-FLOTAC, krótko homogenizować, a następnie napełnić dwie komory urządzenia Mini-FLOTAC, aż utworzy się mały menisk.
5. Po 10 minutach przesunąć dysk odczytowy, obracając go w kierunku zgodnym z ruchem wskazówek zegara i umieścić urządzenie pod mikroskopem za pomocą adaptera dołączonego do zestawu. Mini-FLOTAC można badać przy maksymalnym powiększeniu 400x.
6. Zbadać próbkę, odczytując obie komory Mini-FLOTAC. Pomnożyć każde zliczone jajko przez 5, aby uzyskać liczbę jaj na gram.

### 1.2.6. Metoda podwójnego wirowania do wykrywania jaj *Anoplocephala* w kale koni

Wykrywanie jaj tasiemców w kale koni przy użyciu standardowej metody flotacji z 20 g kału ma ograniczoną czułość. Stosowanie połączonej procedury sedymentacji i flotacji, podczas której stosuje się dwa etapy wirowania z 15 g kału, zapewnia wyższy wskaźnik wykrywalności.

### Wymagany materiał kałowy:

15 g

**Procedura:**

1. Dokładnie wymieszać szpatułką próbkę kału (minimum 15 g) z co najmniej 40 ml wody.
2. Umieścić sitko na zlewce o pojemności 250 ml i przenieść próbkę kału na sitko. Przepuścić cały płyn przez sitko, naciskając próbkę kału szpatułką.
3. Przenieść przesącz do probówek o pojemności 50 ml.
4. Wirować przez 10 minut przy 400 x g.
5. Usunąć supernatant za pomocą pompy ssącej lub pipety.
6. Pozostały osad rozpuścić w 1–2 ml roztworu sacharozy i przenieść zawiesinę do probówki o pojemności 15 ml.
7. Uzupełnić roztworem sacharozy.
8. Wirować przez 10 minut przy 200 x g.
9. Za pomocą drucianej pętli przenieść krople z (całej) powierzchni odwirowanej zawiesiny kału na szkiełko podstawowe i przykryć szkiełkiem nakrywkowym.
10. Zbadać pod mikroskopem cały obszar pod szkiełkiem nakrywkowym, jak opisano w części 1.2.2.

**1.2.7. Metoda SAFC****Zasada:**

Metoda **SAFC** (**S**odium **A**cetate **A**cetic **A**cid **F**ormalin **C**oncentration; roztwór octanu sodu, kwasu octowego i formaliny) jest odpowiednia do wykrywania otorbionych i wegetatywnych stadiów pierwotniaków (np. *Giardia*) oraz małych jaj niektórych przywr, takich jak *Opisthorchis* i *Metorchis*. Stosuje się uprzednią konserwację świeżych próbek kału w roztworze SAF. Podczas przetwarzania próbki składniki tłuszczowe są usuwane za pomocą eteru, a stadia pasożytnicze ulegają zagęszczeniu. Odmianami metody SAFC jest metoda Telemanna-Rivasa (patrz 1.2.8.) oraz MIFC (nieopisana w tym przewodniku).

**Roztwór SAF:**

20 ml stężonego kwasu octowego  
40 ml formaldehydu (37%)  
15 g octanu sodu  
ad 1 l woda dest.

**Wymagany materiał kałowy:**

Minimum 1 g świeżego kału przenieść do probówek z 10 ml roztworu SAF.

**Procedura:**

1. Wstrząsnąć probówką zawierającą kał i roztwór SAF.
2. Połowę zawiesiny przelać przez gazę do probówki wirówkowej i wirować przez 2 minuty (500 x g).
3. Zdekantować supernatant, dodać 8 ml roztworu soli fizjologicznej i wymieszać osad plastikową szpatułką lub patyczkiem.
4. Dodać 3 ml eteru dietylowego, zamknąć probówkę i delikatnie wymieszać zawartość.
5. Zdjąć pokrywkę i wirować przez 5 minut (500 x g), co pozwoli na utworzenie kilku warstw.
6. Oddzielić detrytus od ścianki probówki za pomocą patyczka i zdekantować supernatant.
7. Przenieść dwie lub więcej kropli osadu na szkiełko. Opcjonalnie dodać płyn Lugola, a następnie przykryć krople szkiełkiem nakrywkowym.
8. Zbadać pod mikroskopem cały obszar pod szkiełkiem nakrywkowym, jak opisano w części 1.2.2.

### 1.2.8. Metoda Telemanna-Rivasa

#### Zasada:

Ta metoda jest odmianą techniki SAFC. Metoda ta polega na koncentracji jaj, cyst i larw w próbkach kału o wysokim stężeniu tłuszczu (np. pochodzących od zwierząt mięsożernych).

#### Wymagany materiał - kał:

1 g, świeży

#### Procedura:

1. Odważyć 1 g świeżego kału.
2. Umieścić kał w szklanym słoiku i dodać 5 ml kwasu octowego (stężenie co najmniej 5%).
3. Dokładnie zhomogenizować patyczkiem i przefiltrować przez podwójną warstwę gazy.
4. Przenieść roztwór kału do probówki wirówkowej (12 ml).
5. Dodać taką samą ilość eteru dietylowego i wymieszać wstrząsając.
6. Wirować przez 5 minut (300 x g). Mieszanina rozdzieli się na 4 warstwy (od góry do dołu): eter dietylowy/detrytus (w tym składniki tłuszczowe)/kwas octowy/osad. Osad jest zwykle bardzo drobny.
7. Pobrać osad za pomocą pipety i przenieść na szkiełko. Opcjonalnie dodać płyn Lugola do wykrywania niektórych stadiów pasożytniczych (np. cyst *Giardia*), przykryć krople szkiełkiem nakrywkowym.
8. Zbadać pod mikroskopem cały obszar pod szkiełkami nakrywkowymi, jak opisano w części 1.2.2.

### 1.2.9. Metoda Baermanna

#### Zasada:

Metodę tę stosuje się zwykle do izolacji ruchliwych larw nicieni (L1 nicieni płucnych, *Strongyloides*). Metodę Baermanna można również wykorzystać do odzyskania larw trzeciego stadium (L3) słupkowców z koprokultury. Zasada opiera się na migracji larw (dodatnia hydrotaksja) i grawitacji, dlatego można ją przeprowadzić tylko z żywymi larwami ze świeżych odchodów. Po zważeniu próbki kału i zliczeniu wszystkich obecnych larw (lub reprezentatywnych podwielokrotności) możliwa jest analiza ilościowa.

#### Wymagany materiał kałowy:

Co najmniej 4-10 g kału; pobieranie próbek przez trzy kolejne dni jest pomocne, aby zrównoważyć nierównomierne wydalanie L1 nicieni płucnych.

#### Procedura:

1. Przygotować aparat Baermanna mocując lejek, a na jego końcu gumową rurkę z zaciskiem. Wlać trochę wody z kranu do lejka. Upewnić się, że zacisk nie przecieka, np. poprzez napełnienie aparatu dzień przed użyciem.
2. Odpowiednio wymieszać kał (do spulchnienia kału można użyć trocin, jeśli próbka jest zbita i zwarta) i umieścić jednorodną mieszaninę w gazie.
3. Umieścić gazę z próbką kału w lejku i dodać wodę, aż próbka zostanie prawie całkowicie pokryta.
4. Pozostawić próbkę na co najmniej 12 godzin w temperaturze pokojowej. Larwy migrują z kału do rurki i opadają (grawitacyjnie) do końca lejka.
5. Po otwarciu gumowego zacisku pierwsze krople można zbadać pod mikroskopem (powiększenie 40–400x). Jeśli larwy się poruszają, można dodać 1 kroplę płynu Lugola, który zabija larwy ułatwiając stwierdzenie ich cech morfologicznych. Ewentualnie zebrać 10–14 ml płynu do probówki, wirować przez 2 minuty (500 x g), zlać supernatant i zbadać 0,5–1 ml osadu.

W celu ilościowego określenia liczby larw w gramie kału (LPG), należy uprzednio zważyć próbkę, policzyć wszystkie larwy (lub ich podwielokrotność) w osadzie i przeliczyć LPG.

### 1.2.10. Hodowla larw z kału

#### Zasada:

Koprokultury wykonuje się z kału **koni** w celu pozyskania larw trzeciego stadium (L3) nicieni żołądkowo-jelitowych: hoduje się jaja Trichostrongylidae i Strongylidae do L3, co umożliwia ich różnicowanie do poziomu rodzaju.

#### Wymagany materiał kałowy:

Co najmniej 50 g kału pobranego *per rectum* lub bezpośrednio po wydaleniu, aby uniknąć zanieczyszczenia nicieniami glebowymi.

#### Procedura:

1. Zmieszać kał z wysterylizowanymi trocinami do uzyskania wilgotnej konsystencji (w razie potrzeby dolać wody z kranu, ale zwracać uwagę, aby woda pozostała wchłonięta; zbyt wilgotna mieszanina uniemożliwi rozwój larw).
2. Przenieść mieszaninę do zakręcanego szklanego słoika, napełnić do połowy i luźno zamknąć wieczko (niezbędny jest dostęp powietrza).
3. Inkubować słoik przez 7-10 dni w ciemności w temperaturze 25°C, umożliwiając rozwiniętym larwom migrację w górę po szklanych ściankach słoika.
4. Otworzyć słoik i docisnąć hodowlę tłuczkiem lub łyżką.
5. Mocno docisnąć pokrywkę szklanej szalki Petriego do szklanego słoika, a następnie odwrócić hodowlę do góry dnem.
6. Napełnić szalkę Petriego do połowy wodą i pozostawić słoik na szalce na 12 godzin, umożliwiając larwom przejście ze słoika do płynu na szalce.
7. Zebrać pipetą płyn z szalki Petriego i zróżnicować larwy pod mikroskopem (patrz 1.2.9.).

Alternatywnie, po inkubacji i pojawieniu się larw trzeciego stadium (pkt 3), można je zagęścić metodą Baermanna (zob. 1.2.9.).

### 1.2.11. Rozmazy kału, barwienie

#### Zasada:

Bezpośrednie rozmazy kału na szkiełkach mikroskopowych mogą być szybszą opcją, np. do wykrywania dużej liczby larw nicieni płucnych lub trofozoitów pierwotniaków. Jednak bez zagęszczenia ta procedura ma niską czułość i w większości przypadków jest niewystarczająca do niezawodnego wykrywania pasożytów. Jedynym wyjątkiem jest opisane tutaj barwienie w celu wykrycia *Cryptosporidium*.

Oocysty *Cryptosporidium* można wykryć w cienkich rozmazach kału po barwieniu. Po zmodyfikowanym wybarwieniu metodą Ziehla-Neelsena (szybkie barwienie kwasem) oocysty pojawiają się jako różowe, okrągłe obiekty (średnica 4-6 µm) na turkusowym tle. Po barwieniu karbolfuksyną metodą Heinego oocysty są widoczne jako bezbarwne struktury na czerwonym tle. Do wykrywania tych oocyst odpowiednio jest również barwienie metodą Kinyouna.

#### Wymagany materiał kałowy:

1 g kału, półpłynnego lub płynnego (zmieszanego z wodą, gdy jest zbyt zbity).

### **Procedura barwienia (Ziehl-Neelsena):**

1. Rozprowadzić materiał kałowy w postaci cienkiej warstwy na szkiełku mikroskopowym za pomocą bawełnianego wacika.
2. Suszyć na powietrzu przez około 30 minut w temperaturze pokojowej.
3. Utrwalać w metanolu przez 5 minut.
4. Wysuszyć na powietrzu.
5. Barwić fuksyną karbolową przez 4 minuty.
6. Spłukać zimną bieżącą wodą z kranu.
7. Odbarwiać kwaśnym alkoholem, aż barwnik przestanie wypływać.
8. Spłukać zimną bieżącą wodą z kranu.
9. Barwić kontrastowo zielenią malachitową przez 4 minuty.
10. Spłukać zimną bieżącą wodą z kranu.
11. Wsuszyć na powietrzu.
12. Wykonać badanie mikroskopowe w powiększeniu 400–1000x (olejek immersyjny), szukając różowo zabarwionych, okrągłych tworów (średnica 4–6  $\mu\text{m}$ ).

### **Procedura (barwienie metodą Heinego):**

1. Zmieszać kroplę kału z fuksyną karbolową i cienko rozprowadzić na szkiełku mikroskopowym.
2. Pozostawić do wyschnięcia na powietrzu, aż powierzchnia stanie się matowa i natychmiast obejrzeć pod mikroskopem w olejku immersyjnym, jak opisano powyżej.

### **1.2.12. Metoda przylepca**

W technice pobierania bezpośredniego wykorzystuje się przezroczystą taśmę przylepną (o szerokości około 1 cm i długości około 4 cm) do pobierania materiału z okolic odbytu koni w celu wykrycia jaj *Oxyuris equi*. Tą samą metodą można wykrywać jaja *Echinococcus* i innych tasiemców z okolic odbytu psów. Lepką stronę taśmy dociska się kilkakrotnie do skóry. Następnie odciska się ją (lepką stroną) na szkiełku. Taśma służy jako szkiełko nakrywkowe i umożliwia ocenę próbki pod mikroskopem.

### **1.2.13. Zestawy komercyjne do analizy kału/testy InPouch™ TF Feline/ testy koproantygenu**

W handlu dostępne są różne zestawy do przeprowadzania procedury flotacji ułatwiającej badanie kału (np. Parasite Diagnosis System®, ParaTest®, Fecalyzer®, Ovatec® Plus); zestawy te działają z gotowym do użycia roztworem flotacyjnym (ciężar właściwy 1,2) i naczyniami analitycznymi.

Zestawy te najlepiej nadają się do badań kału psów i kotów. Są poręczne, łatwe w użyciu i zapewniają higieniczny sposób postępowania z próbkami kału i ich badaniem.

Należy jednak wziąć pod uwagę to, że za pomocą zestawów można badać tylko niewielkie ilości kału, ponieważ naczynie jest małe, a procedura może wiązać się z zamontowaniem próbki kału na spodniej stronie wkładu sitka. W rezultacie zestawy nadają się tylko do próbek pobranych od zwierząt mięsożernych, w przypadku inwazji o niskiej intensywności charakteryzują się niższą czułością wykrywania (mniejsza ilość badanego kału, niższy ciężar właściwy roztworów flotacyjnych, brak koncentracji przez wirowanie) w porównaniu do metody sedymentacyjno-flotacyjna opisanej wyżej. Co więcej, zwykle nie jest możliwe makroskopowe zbadanie próbki (np. na obecność członów tasiemców), jeśli właściciel zwierzęcia zamknie pojemnik z próbką kału przed przekazaniem jej do analizy. W porównaniu z metodami konwencjonalnymi, analiza z użyciem zestawu wiąże się z wyższymi kosztami i wytwarzaniem większej ilości odpadów z tworzyw sztucznych, ponieważ stosowane są elementy jednorazowego użytku.

## InPouch™ TF dla kotów

Ta procedura jest stosowana do hodowli i wykrywania trofozoitów *Trichostrongylus axei* w kocich odchodach. Masę kałową (0,03 g, odpowiadającą wielkości główki szpilki) wprowadza się za pomocą sterylnej bawełnianej waciki do znajdującej się w zestawie torebki (InPouch™ TF Feline) zawierającej pożywkę hodowlaną. Torebka jest opatrzona etykietą i datą, a następnie zamykana w celu hodowli w pozycji pionowej w temperaturze 37°C przez 24 godziny i przechowywana w temperaturze pokojowej w ciemności. Torebkę bada się pod mikroskopem na obecność trofozoitów po 24 godzinach, 48 godzinach, a następnie co drugi dzień do 12 dni.

Chociaż test jest uważany za specyficzny dla *T. foetus*, w hodowli mogą pojawić się niepatogenne wiciowce, takie jak *Pentatrichomonas*, co wymaga różnicowania molekularnego.

## Testy koproantygenowe i inne testy oparte o wykrywanie przeciwciał anty-pasożytniczych

Testy koproantygenowe służą do jakościowego wykrywania antygenów pasożytów w kale i są powszechnie stosowane w klinikach oraz w specjalistycznych laboratoriach jako szybkie testy diagnostyczne. Ich czułość jest wysoka, gdy są stosowane do badania wskazanego w teście gatunku zwierzęcia. Metodami wykrywania koproantygeny mogą być bezpośrednie testy immunofluorescencyjne (DFA) na szkiełkach, testy ELISA lub immunoenzymatyczne (EIA) testy wykrywające antygen w 96-studzienkowych płytkach lub immunochromatograficzne testy paskowe (ICT) (patrz także Tabela 3). Ponieważ obecnie dostępne są testy przeznaczone do stosowania u psów i kotów, są one preferowane w porównaniu z testami opracowanymi dla próbek kału ludzi ze względu na lepszą dokładność, zwłaszcza pod względem swoistości.

W przypadku *Giardia* należy podkreślić, że wykrycie koproantygeny nie zawsze koreluje z chorobą, a wyniki badań należy interpretować w powiązaniu z objawami klinicznymi.

Tabela 3. Przykłady dostępnych na rynku testów koproantygenowych

Test	Producent	Wykrywane pasożyty	Format	Gatunek żywiciela*
Anigen Rapid Giardia 2.0	BioNote, Korea	<i>Giardia</i>	immunochromatografia	pies, kot
FASTest® GIARDIA Strip	Megacor, Austria	<i>Giardia</i>	immunochromatografia	pies, kot
FASTest® CRYPTO-GIARDIA Strip	Megacor, Austria	<i>Giardia</i> / <i>Cryptosporidium</i>	immunochromatografia	pies, kot
Giardia SNAP®	IDEXX, Stany Zjednoczone	<i>Giardia</i>	ELISA	pies, kot
Merifluor® Cryptosporidium/Giardia Test Kit	Meridian Bioscience, UK	<i>Giardia</i> / <i>Cryptosporidium</i>	bezpośrednia detekcja immunofluorescencyjna	pies
PetChek™ IP Fecal Dx™***	IDEXX, Stany Zjednoczone	<i>Giardia</i> glisty Trichuridae tęgoryjce	ELISA	pies, kot***
Uranotest® Giardia	Uranovet, Hiszpania	<i>Giardia</i>	immunochromatografia	pies, kot
WITNESS® GIARDIA	Operon S.A., Hiszpania****	<i>Giardia</i>	immunochromatografia	pies, kot

\* zgodnie z zaleceniami producenta; niektóre testy można rozszerzyć na inne gatunki, jak opisano w literaturze.

\*\* zestaw do pobierania IP PetChek™ dystrybuowany do praktyk weterynaryjnych, próbki należy przesłać do producenta w celu przebadania. Fecal Dx™ odnosi się do tych samych testów i tej samej firmy.

\*\*\* opisany do stosowania u psów.

\*\*\*\* dystrybuowany przez firmę Zoetis.

## 2. SEROLOGIA

### 2.1. Informacje ogólne

Testy serologiczne są preferowane do bezpośredniego wykrywania w przewlekłych zarażeniach, gdzie niskie zagęszczenie pasożyta w próbce wykorzystywanej do bezpośredniego wykrywania zmniejsza wskaźnik powodzenia, np. w babeszjozie lub neosporozie lub w przypadkach, gdy nie można pobrać próbki zarażonej tkanki i nie ma bezpośredniego dostępu do stadiów rozwojowych w płynach ustrojowych. Przykładem tego są żyjące w tkankach pierwotniaki, które powodują przewlekłe inwazje np. w mózgu lub oku – *Toxoplasma gondii* lub *Encephalitozoon cuniculi*. W diagnostyce leiszmaniozy u psów testy serologiczne są stosowane obok bezpośredniego wykrywania w celu wsparcia prawidłowej interpretacji zarażenia i statusu immunologicznego zwierząt, monitorowania odpowiedzi na leczenie i przewidywania potencjalnego nawrotu choroby.

#### Wykrywanie przeciwciał

Podobnie jak testy koproantygenowe, które wykrywają antygen w kale (patrz 1.2.13.), serologiczne wykrywanie antygenów oznacza, że elementy pasożytnicze (antygeny somatyczne) lub antygeny wydaliniczo/wydzielnicze wytwarzane przez pasożyta są bezpośrednio wykrywane we krwi lub surowicy. Podobnie jak wykrywanie DNA, dostarcza to bezpośrednich dowodów na obecność pasożyta w krwioobiegu, a tym samym informacji o aktualnym stanie inwazji. *Dirofilaria immitis* i *Angiostrongylus vasorum* to pasożyty krwi, których antygeny krążeniowe można wykryć serologicznie (patrz Tabela 4).

**Tabela 4. Wybór dostępnych na rynku testów serologicznych do diagnostyki pasożytów lub patogenów przenoszonych przez wektory u psów, kotów i koni.**

(Źródła: [www.megacor.at](http://www.megacor.at); [www.laboklin.de](http://www.laboklin.de); [www.idexx.ch](http://www.idexx.ch); [uranovet.com](http://uranovet.com) i inne)

Analiza	Producent	Wykryte pasożyty lub bakterie przenoszone przez wektory	Postać	Gatunek żywiciela
<b>Testy na wykrywanie antygenów</b>				
Antigen Rapid CHW Ag Test Kit 2.0	BioNote, Korea	<i>Dirofilaria immitis</i>	Immunochromatografia z przepływem bocznym	pies
DiroCHEK®	Zoetis, Stany Zjednoczone	<i>Dirofilaria immitis</i>	ELISA	pies
FASTest® HW Antigen	Megacor, Austria	<i>Dirofilaria immitis</i>	ELISA	pies
IDEXX Angio Detect™ Test	IDEXX, Stany Zjednoczone	<i>Angiostrongylus vasorum</i>	Immunochromatografia z przepływem bocznym	pies
Speed Diro™	BVT-Virbac, Francja	<i>Dirofilaria immitis</i>	Immunochromatografia z przepływem bocznym	pies
Uranotest® Dirofilaria	Uranovet, Hiszpania	<i>Dirofilaria immitis</i>	Immunochromatografia z przepływem bocznym	pies, kot
WITNESS® Dirofilaria	Synbiotics Corp., Stany Zjednoczone*	<i>Dirofilaria immitis</i>	Immunochromatografia z przepływem bocznym	pies
<b>Testy na wykrywanie przeciwciał</b>				
<i>Anaplasma</i> -ELISA DOG	Afosa, Niemcy	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	ELISA	pies
Anigen Rapid <i>Leishmania</i> Ab Test Kit	BioNote, Korea	<i>Leishmania infantum</i>	Immunochromatografia z przepływem bocznym	pies
<i>Babesia</i> -ELISA DOG	Afosa, Niemcy	<i>Babesia canis</i>	ELISA	pies
<i>Ehrlichia</i> -ELISA DOG	Afosa, Niemcy	<i>Ehrlichia canis</i>	ELISA	pies
Diagnosteq	Uniwersytet w Liverpoolu, Wielka Brytania	<i>Anoplocephala perfoliata</i>	ELISA	koń
EquiSal	Austin Davis Biologics, Wielka Brytania	<i>Anoplocephala perfoliata</i>	ELISA (ze śliną)	koń
<i>Leishmania</i> -IgG ELISA DOG	Afosa, Niemcy	<i>Leishmania infantum</i>	ELISA	pies
<i>Sarcoptes</i> -ELISA DOG	Afosa, Niemcy	<i>Sarcoptes scabiei</i> var. <i>canis</i>	ELISA	pies
SNAP® <i>Leishmania</i>	IDEXX, Stany Zjednoczone	<i>Leishmania infantum</i>	ELISA	pies
Speed Leish K™	BVT-Virbac, Francja	<i>Leishmania infantum</i>	Immunochromatografia z przepływem bocznym	pies
Uranotest® <i>Ehrlichia</i> - <i>Anaplasma</i>	Uranovet, Hiszpania	<i>Ehrlichia canis</i> , <i>Anaplasma platys</i>	Immunochromatografia z przepływem bocznym	pies
Uranotest® <i>Ehrlichia</i>	Uranovet, Hiszpania	<i>Ehrlichia canis</i>	Immunochromatografia z przepływem bocznym	pies
Uranotest® <i>Leishmania</i>	Uranovet, Hiszpania	<i>Leishmania infantum</i>	Immunochromatografia z przepływem bocznym	pies
<b>Testy do wykrywania mieszanych antygenów (Ag) i przeciwciał (Ab).</b>				
SNAP® 4Dx® Plus Test	IDEXX, Stany Zjednoczone	<i>Dirofilaria immitis</i> (Ag) <i>Borrelia burgdorferi</i> (Ab) <i>Ehrlichia canis</i> (Ab) ( <i>E. ewingii</i> , <i>E. chaffeensis</i> ) <i>Anaplasma phagocytophilum</i> (Ab), <i>A. platys</i> (Ab)	ELISA	pies
Uranotest® Quattro	Uranovet, Hiszpania	<i>Dirofilaria immitis</i> (Ag) <i>Leishmania infantum</i> (Ab) <i>Ehrlichia canis</i> (Ab), <i>A. platys</i> (Ab)	Immunochromatografia	pies

\* dystrybucja: Zoetis



## Wykrywanie przeciwciał

Wykrycie swoistych przeciwciał przeciwko pasożytom w pojedynczej próbce wskazuje, czy zwierzę było wcześniej narażone na działanie tego antygenu/pasożyta. Ponieważ wytwarzanie przeciwciał jest opóźnione, zwykle można je wykryć dopiero po 2–3 tygodniach od pierwotnego zarażenia. Przeciwciała utrzymują się również po wyeliminowaniu patogenu, w wielu przypadkach przez tygodnie do miesięcy/lat, z dużymi różnicami indywidualnymi i specyficznymi dla patogenu. Ważne jest, aby wziąć pod uwagę przeciwciała, które pochodzą ze źródeł innych niż inwazja, takich jak wcześniejsze szczepienie (np. przeciwko *Leishmania* lub *Babesia*) lub przeciwciała matczyne u bardzo młodych zwierząt. Reaktywność krzyżowa z innymi organizmami lub reakcje niespecyficzne mogą ograniczać specyficzność testów serologicznych.

Aby zmniejszyć liczbę fałszywych wyników, testy serologiczne można powtórzyć po pewnym czasie (zwykle 2–3 tygodnie), aby sprawdzić, czy wartości się zmieniły. Jeśli zwierzę z wcześniej ujemnymi lub niskimi wartościami ma rosnącą lub dodatnią wartość, można to interpretować jako inwazję aktywną/trwającą; jeśli wartość maleje lub zmienia się na ujemną, inwazja zostaje zakończona. Istnieją jednak wyjątki od tej reguły.

Aby przetestować fluktuacje przeciwciał, można zastosować ilościowe testy ELISA (z wartościami jednostek, punktów lub stężeń) lub półilościowe testy IFA (miana). Szybkie testy w klinice mają charakter jakościowy i pozwalają jedynie na stwierdzenie, czy zwierzę jest serologicznie pozytywne, czy negatywne.

Formaty wykrywania przeciwciał przypominają wykrywanie antygenu, z wyjątkiem tego, że substrat do wykrywania jest odwrócony. Ze względu na to, że większość formatów jest ograniczona do stosowania w wyspecjalizowanych laboratoriach, ponieważ do przeprowadzenia badań niezbędny jest specjalistyczny sprzęt, metody nie są szczegółowo opisane w niniejszym przewodniku, a jedynie wymienione są różne formaty i testy dostępne w klinice.

Zazwyczaj wykrywanie przeciwciał stosuje się do oceny stanu zarażenia pierwotniakami pozajelitowymi powodującymi przewlekłe inwazje, takimi jak *T. gondii*, *E. cuniculi* (koty i psy), *Neospora caninum* (psy), *Sarcocystis neurona* (konie), a także wielu patogenów przenoszonych przez wektory drogą płciową, w tym *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Dirofilaria immitis* (koty), *Angiostrongylus vasorum* (psy), *Babesia caballi* i *Theileria equi* (konie). W przypadku psów wykrywanie przeciwciał przeciwko stadiom larwalnym w bąblowicy wielojamowej stosowane jest w wyspecjalizowanych laboratoriach.

Zarażenie *Anoplocephala perfoliata* u koni można rozpoznać po wykryciu przeciwciał w surowicy lub w ślinie. W przypadku psów bezpośrednio wykrycie świerzbu skórniego może być poparte serologicznym testem na obecność przeciwciał.

Niektóre laboratoria oferują „pakiety podrózne” dla psów, łącząc różne testy (serologiczne, PCR, wykrywanie antygenu, test Knotta i inne) na różne „egzotyczne” patogeny. Należy jednak wziąć pod uwagę różnice w czasach inkubacji i początku objawów klinicznych choroby. W niektórych przypadkach może być wskazane ponowne badanie.

Niektóre państwa nakładają przepisy krajowe dotyczące badań na obecność piroplazmozy koni.

## Zapewnienie jakości w systemach testów serologicznych

Podobnie jak w przypadku wszystkich testów diagnostycznych, testy serologiczne mają różne poziomy czułości i swoistości. Dobrą praktyką kliniczną jest zawsze uwzględnianie w teście serologicznym kontroli dodatniej i ujemnej. Wiele laboratoriów oferuje podstawowe informacje na temat jakości technicznej swoich testów i pomoc w interpretacji wyników, zwłaszcza w odniesieniu do wpływu m.in. miana po szczepieniu, reaktywności krzyżowej z blisko spokrewnionymi patogenami i innych czynników, które należy wziąć pod uwagę przy interpretacji wyników testu.

W zależności od obrazu klinicznego i wymagań testu, może być wskazane połączenie testu serologicznego z innymi metodami bezpośredniego wykrywania lub, jeśli nie jest to możliwe, z innym pośrednim systemem testowym do wykrywania przeciwciał. Western blotting jest często stosowany jako test referencyjny w wykrywaniu zarażeń u ludzi, ale ze względu na ograniczenia czasowe i kosztowe jego zastosowanie w diagnostyce weterynaryjnej zwykle ogranicza się, z nielicznymi wyjątkami, do badań naukowych.

Tam, gdzie ma to zastosowanie, immunoglobuliny wytwarzane podczas aktywnych, podostrych zarażeń (IgM) różnią się od tych, które dominują w inwazjach przewlekłych (IgG).

Aby ocenić powodzenie leczenia leishmaniozy psów, serologia może nie być wystarczająca, ponieważ przeciwciała mogą utrzymywać się przez kilka miesięcy lub lat po wyleczeniu klinicznym, ze względu na to, że pasożyta nie można wyeliminować. Dlatego wskazane są dalsze badania laboratoryjne oceniające stan immunologiczny i stan zdrowia pacjenta. Ilościowa reakcja PCR umożliwia oszacowanie obciążenia pasożytami w porównywalnych tkankach, co może być przydatne w obserwacji podczas leczenia leishmaniozy u psów, chociaż podejście to wymaga dokładnej oceny.

## **2.2. Ilościowe metody wykrywania przeciwciał**

### **2.2.1. Test immunofluorescencji pośredniej na obecność przeciwciał (IFAT)**

Test fluorescencji pośredniej na obecność przeciwciał opiera się na wykrywaniu specyficznych przeciwciał, które wiążą się z antygenami (tj. inaktywowanymi całymi pasożytami) unieruchomionymi na szkiełkach, a następnie są wykrywane przez przeciwciała drugorzędowe. To przeciwciała wiążą się z regionem niezmiennym przeciwciała pierwotnego (surowiczego), który jest kowalencyjnie połączony z fluoroforem. Za pomocą fluorescencyjnej mikroskopii świetlnej wykrywa się fluorofor związanego przeciwciała przy odpowiedniej długości fali. Technika ta jest bardzo dokładna, jeśli jest wykonywana prawidłowo, ale jest czasochłonna i wymaga pewnego poziomu wyszkolenia i wiedzy specjalistycznej. Jednak w przypadku małych zwierząt test jest nadal szeroko stosowany, ponieważ jest mniej podatny na niespecyficzne reakcje. Wadą IFAT jest to, że nie wszystkie antygeny są jednakowo dostępne dla przeciwciał, więc czułość może być niska w porównaniu z innymi testami. Ponieważ wyniki są wyrażone w mianach, dają wynik półilościowy, który może być przydatny w dalszych badaniach.

### **2.2.2. Test immunoenzymatyczny (ELISA)**

Test immunoenzymatyczny (ELISA) wykrywa specyficzne antygeny lub przeciwciała, które wiążą się z przetworzonym antygenem (tj. całym lizatem antygenów natywnych lub antygenów rekombinowanych) lub przeciwciałami zaabsorbowanymi na powierzchni z tworzywa sztucznego (pośredni test ELISA). W tym przypadku drugorzędowe przeciwciała jest znakowane enzymem, który indukuje zmianę barwy substratu chromoforowego, którą można zmierzyć i określić ilościowo przez pomiar gęstości optycznej. Bardziej skomplikowaną formą jest kanapkowy test ELISA, który nie wiąże antygeny bezpośrednio na plastikowej powierzchni, ale wykorzystuje przeciwciała połączone z tą powierzchnią w celu „wychwytywania” specyficznych antygenów. Metoda ta ma zastosowanie, gdy bezpośrednie wiązanie mieszanin antygenów z fazą stałą prowadzi do obniżenia swoistości testu. Możliwe są także inne formaty testu ELISA.

ELISA to bardziej ujednolicony format testu, ponieważ jest dostarczany na 96-dołkowych płytkach i często jest dostosowywany do potrzeb oraz zawiera kontrole, więc do przeprowadzenia testu nie jest konieczna specjalistyczna wiedza na temat patogenu. Wyniki testu są zwykle wyrażane jako wartości absorbancji, w większości przypadków do wykrywania swoistych przeciwciał stosuje się tylko jedno rozcieńczenie materiału diagnostycznego, a do wykrywania antygeny stosuje się niskie rozcieńczenia. Dlatego intensywność reakcji nie zawsze jest skorelowana z ilością obecnych przeciwciał (w silnie dodatnich reakcjach układ może być nasycony).

Ponieważ formaty ELISA są bardziej wystandaryzowane niż IFAT, a odczyt optyczny jest mniej subiektywny niż mikroskopia, ilościowy ELISA jest dokładniejszy niż IFAT do wykrywania zmian miana przeciwciał w czasie.

W szczególnych przypadkach można badać substraty inne niż krew, tak jak w przypadku *Anoplocephala perfoliata* w ślinie koni (EquiSal®).

## 2.3. Metody jakościowe

### 2.3.1. Systemy szybkiego testowania

Szybkie testy enzymatyczne (wykorzystujące przeciwciała kowalencyjnie związane z enzymem oraz etap przemywania) lub testy immunochromatograficzne (wykorzystujące przeciwciała związane ze złotem koloidalnym bez etapu przemywania) są dostępne do szybkiej diagnostyki różnych chorób zakaźnych w klinice. Są one dostarczane przez wyspecjalizowane firmy, które zapewniają jakość swoich testów i dostarczają wszystkie materiały, w tym kontrole pozytywne i negatywne, które są dołączane do testu. Testy są łatwe i szybkie do wykonania i nie wymagają specjalnego przeszkolenia. Nie należy ich jednak używać w przypadkach i dla żywicieli innych niż określone w specyfikacji testów. Oceniany poziom przeciwciał lub antygenu zwykle nie jest wystarczająco dokładny, aby stwierdzić wzrost lub spadek miana.

## 3. BADANIE SKÓRY

### 3.1. Informacje ogólne

Ten rozdział poświęcony jest identyfikacji pasożytów zewnętrznych, które wywołują choroby swoją bezpośrednią obecnością na skórze psów, kotów, koni i małych ssaków domowych.

Pchły, wszy, roztocza i kleszcze powodują choroby pasożytnicze, zarówno poprzez bezpośrednie działanie, jak i przenoszenie patogenów.

Rozpoznanie infestacji skóry mniejszymi ektopasożytami, takimi jak roztocza oraz różnicowanie wyizolowanych osobników zwykle wymaga identyfikacji mikroskopowej jednego lub kilku stadiów rozwojowych pasożyta. Sukces diagnostyczny zależy od prawidłowego pobrania materiału i, po niezbędnej obróbce, zbadania pod mikroskopem świetlnym, najlepiej przy opuszczonym kondensorze i przyciemnionym źródle światła.

Poniższy rozdział zawiera opisy najczęściej stosowanych metod izolacji ektopasożytów.

### 3.2. Wyczesywanie pcheł

„Pchli grzebień” to grzebień o drobnych zębach, służący do zbierania zanieczyszczeń z sierści zwierzęcia.

W przypadku pozornej nieobecności bardzo ruchliwych pcheł, ich odchody można wykryć poprzez wyczesanie zwierzęcia i umieszczenie zebranego materiału na wilgotnym białym papierze, chusteczce lub wacie: czarne plamki odchodów pcheł zostają otoczone czerwonym pierścieniem niestrawionej krwi.



Ryc. 2. Wyczesywanie pcheł



Ryc. 3. Odchody pcheł zawierające krew, co jest widoczne po dodaniu wody

Wyczesywanie może być również przydatne do diagnozowania infestacji *Cheyletiella* i wszy. Zebrany materiał można umieścić na szalce Petriego i zbadać za pomocą mikroskopu stereoskopowego: roztocza będą widoczne jako ruchliwe wśród szczątków („chodzący łupież”). Innym sposobem identyfikacji wszy lub roztoczy *Cheyletiella* jest zebranie „łupieżu” z grzebienia za pomocą przylepca (patrz 1.2.12). Mikroskopia światlna pozwala na identyfikację tych pasożytów lub ich jaj.

### 3.3. Zeskrobiny skóry

Zeskrobiny skóry umożliwiają pobranie próbek z pierwszych warstw (powierzchniowych) lub wszystkich warstw (głębokich) naskórka w celu wykrycia pasożytów zewnętrznych, które albo pozostają na powierzchni skóry, albo gnieźdzą się w głębszych strukturach, takich jak mieszki włosowe. Pobieranie próbek odbywa się na krawędzi zmian skórnych lub w miejscach predylekcji ektopasożytów.

Zeskrobywanie wykonuje się ostrzem skalpela lub skrobaczką. Ostrze skalpela i skórę należy pokryć olejem mineralnym, aby umożliwić przyleganie zanieczyszczeń i pasożytów do ostrza. Jeśli konieczne jest strzyżenie, należy używać tylko nożyczek i najlepiej zeskrobać skórę, która nie została uszkodzona przez nadmierne drapanie.

Próbkę należy przenieść do przezroczystej plastikowej probówki z dużym otworem, którą można szczelnie zamknąć.

Początkowo materiał ze skóry i ścianki plastikowego pojemnika można zbadać za pomocą mikroskopu stereoskopowego lub szkła powiększającego, ponieważ roztocza i inne stawonogi mają tendencję do migracji z zeskrabin skóry. Pobrany materiał można następnie rozprowadzić na szkiełku, przykryć szkiełkiem nakrywkowym i obejrzyć pod mikroskopem w powiększeniu 40–100x. Na szkiełku należy również umieścić olej mineralny (lub kroplę glicerolu).

**Najlepiej jest pobrać zarówno powierzchowne, jak i głębokie zeskróbiny skóry** ze stosunkowo dużych części ciała, graniczących ze zmienionymi obszarami.

W przypadku **psów i kotów** zaleca się pobranie zeskrobiny w celu rozpoznania świerzbu (np. *Sarcoptes scabiei*, *Notoedres cati*), nużycy (*Demodex* spp.), cheyletiellozy (*Cheyletiella* spp.) lub infestacji śwędzika jesiennego (larwy *Trombicula autumnalis*). W szczególności:

- W przypadku podejrzenia zarażenia *Demodex canis*, warto rozpocząć od trichogramu (patrz 3.5.): jeśli roztocza *Demodex* są obecne i przyczepiły się do włosów, nie ma już potrzeby wykonania zeskrabin skóry.
- W przypadku *S. scabiei* u psów należy pobrać głębokie zeskróbiny skóry z łokci, brzegów uszu i bocznych powierzchni stawów skokowych. Z doniesień wynika, że ponad 50% zeskrabin u psów ze świerzbem jest negatywnych; dlatego, aby zwiększyć czułość, należy pobrać kilka próbek (6–10) z różnych podejrzanych miejsc na ciele zwierzęcia. Alternatywnie, niektóre laboratoria oferują testy ELISA wykrywające przeciwciała przeciwko *S. scabiei*, co ułatwia postawienie rozpoznania (patrz Tabela 4).
- W przypadku *Demodex gatoi* u kotów można przyjąć tę samą procedurę, co w przypadku zeskrabin *S. scabiei* u psów.
- W celu wykrycia roztoczy *Cheyletiella* można zeskrobać skórę grzbietu i małżowin usznych; jednakże zalecaną techniką jest metoda przylepca (patrz 3.4.).
- Zeskróbiny skóry pozwolą również wykryć endopasożyty w skórze, tj. larwy nicieni *Pelodera*, *Uncinaria*, *Ancylostoma* lub stadia promastigoty *Leishmania*. Sporadycznie można również wykryć mikrofilarie *Dirofilaria*. W celu potwierdzenia gatunku należy przeprowadzić diagnostykę molekularną.

Zeskróbiny skóry można również wykorzystać do wykrywania roztoczy występujących na **małych ssakach domowych**.

**Głębokie zeskróbiny skóry** są zalecane w celu wykrycia roztoczy *Demodex*, które żyją głęboko w mieszkach włosowych. W celu wykrycia nużeńców *Demodex* obszary wyłysienia należy zeskrobać ostrzem lub skrobaczką posmarowaną olejem mineralnym, w kierunku z włosem, aż do pojawienia się krwi włosniczkowej. Skórę należy ścisnąć przed lub w trakcie zeskrobywania, aby ułatwić wydostawanie się roztoczy *Demodex* z mieszków włosowych.

Ocena liczby i żywotności różnych stadiów rozwojowych jest przydatna do określenia odpowiedzi na leczenie. Zdrowe psy są często nosicielami małej liczby nużeńców, podczas gdy zwierzęta dotknięte klinicznie są zwykle w dużym stopniu obciążone tymi roztoczami, i bezpośrednia diagnoza ma w takich przypadkach dużą czułość. Jednak istnieją doniesienia, że głębokie zeskrobiny mogą dawać wyniki fałszywie ujemne w kierunku nużeńca, w szczególności te z obszarów trudnych do pozyskania (oczy, przestrzenie międzypalcowe) oraz u niektórych ras (owczarek staroangielski, terier szkocki, shar-pei). W takich przypadkach trichogramy (patrz 3.5.) mogą być bardziej przydatne w uzyskaniu wystarczającej ilości materiału diagnostycznego. Ostatnio wykazano, że zastosowanie metody przylepca (patrz 3.4.) i ściśnięcie skóry cechuje wyższy sukces diagnostyczny, niż głębokie zeskrobanie w przypadku nużeńca; ta procedura jest również mniej bolesna dla psów i kotów.

U **koniowatych** głębokie zeskrobiny skóry mogą być użyte do wykrycia nużeńca, jak również stadiów rozwojowych nicieni (*Pelodera*, *Strongyloides* i *Habronema*).

### Powierzchnowe zeskrobiny skóry

U **psów**, w przypadku występujących powierzchownie, krótkich roztoczy *Demodex* można wykonać powierzchowne zeskrobiny skóry, jako alternatywę dla metody przylepca (patrz 3.4.) i trichogramu (patrz 3.5.).

U **koniowatych** zeskrobiny ze skóry można wykorzystać do identyfikacji roztoczy *Chorioptes*, *Psoroptes*, *Sarcoptes*, larw *Trombicula* i roztoczy pastwiskowych (*Pediculoides ventricosus*, *Pyemotes tritici*, *Acarus farinae*).

Powierzchnowe zeskrobiny skóry (jak również metoda przylepca) są również pomocne w wykrywaniu wszy.

### Obróbka zeskrobin skóry roztworem wodorotlenku potasu (KOH) lub laktofenolem

Zeskrobany materiał można poddać obróbce dodając 10% roztwór KOH lub laktofenol na co najmniej 2–3 godziny lub przez noc, w temperaturze pokojowej. Alternatywnie, podgrzanie roztworu KOH w odpowiednim pojemniku skraca procedurę. Roztwór KOH i laktofenol macerują substancje keratynowe skóry, pozostawiając nienaruszone chitynowe egzoszkielety stawonogów. Zawiesinę można badać na szalce Petriego pod mikroskopem stereoskopowym lub na szkiełku podstawowym pod mikroskopem (powiększenie 40–100x). W celu dokładnej identyfikacji, stawonogi należy przenieść na szkiełko i zróżnicować. Potencjalne stawonogi do identyfikacji: wszy i wszoły, roztocza (*Cheyletiella*, *Trombicula*, *Demodex*, *Sarcoptes*, *Notoedres*).

## 3.4. Metoda przylepca

W tej metodzie wykorzystuje się przezroczystą taśmę przylepną (o szerokości około 1 cm i długości około 4 cm) do zbierania zanieczyszczeń z powierzchni skóry i okrywy włosowej, jak opisano w 1.2.12. Lepką stroną taśmy dociska się kilkakrotnie do skóry. Następnie dociska się ją (również lepką stroną do dołu) na szkiełko. Taśma służy jako szkiełko nakrywkowe (powiększenie: 40–100x).

Zwykle pobiera się kilka próbek z różnych obszarów skóry. Technika ta jest szczególnie przydatna w przypadku roztoczy *Cheyletiella* i roztoczy *Demodex* o krótkim ciele, ponieważ można bardzo szybko pobrać **próbki z większej powierzchni**.

U **koniowatych** metoda przylepca może być stosowana do wykrywania *Chorioptes equi*, *Dermanyssus gallinae* i wszy. W przypadku *Demodex* żyjących w mieszkach włosowych, przylepiec można umieścić na wybranej zmianie jako alternatywę dla głębokich zeskrobań skóry. Skórę należy ścisnąć pod przylepcem, a następnie przykleić taśmę do szkiełka podstawowego.

## 3.5. Trichogram

Trichogram to badanie mikroskopowe wyrwanych włosów. Może zastąpić zeskrobiny skóry w obszarach trudnych do ich pozyskania, takich jak powieki, okolice oczu, pysk lub stopy, albo w przypadkach gdy zmiany są bardzo bolesne. Pęsety służą do energicznego wyrywania włosów zgodnie z kierunkiem wzrostu włosa. Jeśli to możliwe, skórę ściska się przed oraz w trakcie pobierania próbki. Co najmniej 40 (najlepiej 50–100) włosów umieszcza się następnie na szkiełku z olejem mineralnym pod szkiełkiem nakrywkowym i ocenia pod małym powiększeniem. W przypadku podejrzenia zarażenia nużeńcem sensowne jest rozpoczęcie od trichogramu: jeśli nużeńce są obecne i przyczepiły się do włosów, nie ma już potrzeby wykonania zeskrobin skóry.



### 3.6. Wykrywanie roztoczy w wosku usznym

Pobieranie woskowiny od **psów i kotów** często daje doskonałe wyniki u zwierząt dotkniętych *Otodectes cynotis*. Podczas badania otoskopowego często można zaobserwować roztocza uszne, a obfite, ciemnobrązowe zanieczyszczenia w tle są typowe. Te zanieczyszczenia można zebrać za pomocą bawełnianego wacika (gdy są woskowate) lub łyżeczki (gdy są wysuszone i kruche) i ocenić pod mikroskopem po rozdrobnieniu ostrzem skalpela i zmieszaniu z olejem mineralnym.

Taki sam sposób można zastosować do wykrycia *Psoroptes cuniculi* w uszach **królików**, chociaż ilość szczątków wytwarzanych w takiej inwazji może wymagać trawienia wodorotlenkiem potasu (KOH) lub laktofenolem w celu uwolnienia roztoczy.

### 3.7. Metody biomolekularne

Jeśli chodzi o endopasożyty, w przypadkach, gdy morfologia stawonogów nie pozwala na ich identyfikację, można stosować techniki oparte na DNA (patrz 4.5.). Do tej procedury żywe stawonogi można zakonserwować w 70% alkoholu lub zamrozić.

## 4. RÓŻNE TECHNIKI

### 4.1. Rozmaz krwi

#### 4.1.1. Informacje ogólne

Świeżo przygotowane rozmazy wykonane z próbek krwi pobranych do antykoagulantu mogą być wykorzystywane do diagnozowania szeregu inwazji pasożytniczych. Chociaż obecność pasożytów we krwi może być rzadka, zwłaszcza w chorobach o przewlekłym przebiegu, łatwość i szybkość rozmazu krwi może zapewnić szybkie i niedrogie podejście diagnostyczne.

#### Wymagane materiały:

- dwa szkiełka przetarte alkoholem
- próbka krwi z antykoagulantem

#### Procedura:

1. Umieścić bardzo małą kroplę krwi blisko końca szkiełka podstawowego.
2. Umieścić koniec drugiego szkiełka na pierwszym tak, aby krótsza krawędź szkiełka znajdowała się tuż pod kroplą krwi.
3. Przytrzymać drugie szkiełko pod kątem 30°.
4. Przesunąć drugie szkiełko tak, aby krawędź ledwo dotykała kropli krwi; w wyniku działania kapilarnego wzdłuż krawędzi szkiełka rozprzestrzeni się cienka linia krwi.
5. Szybkim płynnym ruchem przeciągnąć szkiełko na całej długości szkiełka podstawowego (rozmaz powinien kończyć się „pierzastą krawędzią”).
6. Wysuszyć na powietrzu i barwić (Diff Quick).

Wysuszone na powietrzu preparaty utrwalają się w metanolu przez 5-10 minut i barwi za pomocą Giemsy, Diff-Quick, Hemocolor lub innych gotowych roztworów dostępnych na rynku, aby umożliwić rozpoznanie cech pierwotniaków. Należy zauważyć, że artefakty pochodzące z niewłaściwie przechowywanych barwników mogą prowadzić do wyników fałszywie dodatnich.

## 4.1.2. Patogeny wykrywane w rozmazach krwi

### Piroplazmy

Pierwotniaki te występują wewnątrz krwinek czerwonych. Obwodowa krew włośniczkowa pobrana z małżowiny usznej, z końca ogona lub preparatu z kożuszka (patrz 4.2.) może zawierać większą liczbę komórek zarażonych pasożytem, dlatego też możliwe jest szybkie rozpoznanie ostrej choroby u zwierzęcia. W przypadkach przewlekłych parazytemia jest zwykle niska. Na podstawie wielkości merozoitów w erytrocytach można wyróżnić duże ( $> 3 \mu\text{m}$ ) i małe ( $< 3 \mu\text{m}$ ) gatunki *Babesia* lub *Theileria* (patrz Tabela 5), ale do wiarygodnego zróznicowania niezędne jest badanie molekularne, ponieważ duża *Babesia* może prezentować się jako nietypowe małe formy. Różne gatunki *Babesia* można w większości różnicować między sobą morfologicznie na podstawie liczby merozoitów, kąta między nimi i ich położenia w erytrocytach (patrz Tabela 5). Historia przypadku (czas spędzony na obszarach endemicznych, inwazja kleszczy), objawy kliniczne oraz inne procedury diagnostyczne, takie jak serokonwersja i wykrywanie DNA (patrz 4.5.) mogą wspierać diagnozę.

W niektórych krajach obowiązują regionalne przepisy dotyczące importu koni i badań na obecność piroplazmozy koni.

Tabela 5. Cechy diagnostyczne do morfometrycznej identyfikacji piroplazm u psów, kotów i koni.

Aby uzyskać szczegółowe informacje na temat patogenności, wektorów i występowania, patrz Pzewodnik ESCCAP 5: Zwalczanie chorób przenoszonych przez wektory u psów i kotów.

Piroplazmy u psów			
	Rozmiar (merozoity)	Położenie w erytrocytach	Kąt/inne
<i>Babesia canis</i>	duża	pośrodkowo	ostry
<i>B. vogeli</i>	duża	pośrodkowo	ostry
<i>B. rossi</i>	duża	pośrodkowo	ostry
<i>B. gibsoni</i> i typu <i>gibsoni</i>	mała	pośrodkowo	-
<i>B. conradae</i>	mała	pośrodkowo	-
<i>B. vulpes</i> *	mała	pośrodkowo	-
Piroplazmy u kotów			
<i>B. felis</i>	mała	pośrodkowo	krzyż maltański
<i>Babesia</i> spp.	duża	pośrodkowo	-
<i>Cytauxzoon</i> spp.	mała	różnie	w kształcie pręta lub przecinka
Piroplazmy u koni			
<i>B. caballi</i>	duża	pośrodkowo	ostry
<i>Theileria equi</i>	mała	różnie	pleomorfa (1–4 merozoity, w tym krzyż maltański)

\* *Babesia vulpes* obejmuje wcześniej używane terminy *Theileria* / *Babesia annae* i *Babesia* typu *microti*.

### Hepatozoon spp.

*Hepatozoon* spp. są pierwotniakami przenoszonymi przez wektory (poprzez połknięcie zarażonych kleszczy). W regionach Europy o ciepłym klimacie *Hepatozoon canis* jest powszechnym pasożytem psowatych, podczas gdy *Hepatozoon americanum* występuje u psowatych w Stanach Zjednoczonych. *Hepatozoon felis* i *H. silvestris* to rzadkie pasożyty kotów. W rzadkich przypadkach *H. canis* można znaleźć również u kotów. Gamonty można znaleźć głównie w granulocytach obojętnochłonnych jako typowe o ceglastym kształcie struktury w rozmazach krwi.

## Larwy (mikrofilarie) *Dirofilaria* i innych nicieni filarioidalnych

Mikrofilarie patogennych (*D. immitis*, *D. repens*) i niepatogennych nicieni filarioidalnych można znaleźć w rozmazach krwi i dlatego należy je różnicować (patrz 4.4.).

## Rickettsiae (Anaplasmataceae)

*Ehrlichia* spp. są przenoszonymi przez wektory, Gram-ujemnymi, obligatoryjnymi bakteriami wewnątrzkomórkowymi. W Europie *Ehrlichia canis* jest czynnikiem etiologicznym monocytarnej erlichiozy psów (CME). Patogen ten atakuje głównie monocyty, w których rozwijają się typowe, ale rzadko obserwowane mikrokolonie (morule). *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* jest czynnikiem etiologicznym neoerlichiozy u psów. Inne gatunki *Ehrlichia* (*E. chaffeensis*, *E. ewingii*) są endemiczne w strefie subtropikalnej i rzadko identyfikowane w Europie. U kotów opisano *Ehrlichia canis* lub blisko spokrewniony gatunek, ale nie mają one znaczenia weterynaryjnego.

*Anaplasma* spp. są przenoszonymi przez wektory, Gram-ujemnymi, obligatoryjnymi bakteriami wewnątrzkomórkowymi. W Europie *A. platys* stwierdzano u psów domowych, a *A. phagocytophilum* u psów, kotów, koni i innych gatunków. Infekują odpowiednio płytki krwi (*A. platys*) lub głównie granulocyty obojętnochłonne (*A. phagocytophilum*) i rozwijają się w typowe mikrokolonie (morulae), które można obserwować pod mikroskopem świetlnym w ostrej fazie.

*Mycoplasma* spp. (syn. *Haemobartonella* spp.) to małe bakterie Gram-ujemne, które przyczepiają się do powierzchni krwinek czerwonych są to m. in. *Mycoplasma haemocanis* i *M. haemofelis* odpowiednio u psów i kotów. Inne mniej patogenne gatunki opisano głównie u kotów: *Candidatus Mycoplasma haemominutum* i *Candidatus Mycoplasma turicensis*, ale także u psów: *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*. Metody wykrywania DNA wspomagają wykrywanie i umożliwiają różnicowanie.

## 4.2. Metoda kożuszka

W tej procedurze probówkę mikrohematokrytową napełnia się krwią z EDTA, zamyka na jednym końcu i odwirowuje w wirówce hematokrytovej przez 5 minut. Trypanosomy i mikrofilarie gromadzą się w strefie między warstwą kożuszka a osoczem. Leukocyty są skoncentrowane dla *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia* spp. lub *Hepatozoon* spp. Jako że *Babesia* spp. zarażają raczej retikulocyty niż dojrzałe erytrocyty, ich wykrywanie w kożuszku leukocytnym jest bardziej czułe niż w pełnej krwi. Do badania mikroskopowego rurkę hematokrytową zarysowuje się małym nożem do szkła na poziomie kożuszka leukocytnego i łamie tak, aby warstwę kożuszka leukocytnego i osocze można było przenieść na szkiełko. Dodaje się kroplę soli fizjologicznej lub można wykonać zabarwiony wymaz w celu uwidocznienia pasożytów.

## 4.3. Aspiraty cienkoigłowe

### 4.3.1. Informacje ogólne

Niektóre pierwotniaki i patogeny przenoszone przez wektory występują wewnątrzkomórkowo w limfocytach/monocytach/makrofagach. Zatem aspiracja tkanek układu krwiotwórczego (np. węzłów chłonnych, szpiku kostnego, śledziony) może być ważna zarówno dla ich identyfikacji morfologicznej poprzez rozmazy, jak i/lub pobrania materiału do analizy biomolekularnej (patrz 4.5.). Aspiraty cienkoigłowe z narządów wewnętrznych, np. wątroby, mogą być również stosowane w diagnostyce zarażeń stadiami larwalnymi *Echinococcus* spp. (bąblowica wielojamowa i jednokomorowa). Jeżeli do tego celu wykorzystywana jest śledziona, aspirat należy wykonać bez podciśnienia, aby uniknąć krwawienia.

#### Wymagane materiały:

- strzykawka 15 ml
- igła o rozmiarze 22-20
- szkiełko podstawowe



**Procedura:**

1. Wbić igłę w tkankę i wytworzyć podciśnienie w strzykawce, odciągając tłok do 5–10 ml.
2. Utrzymując to podciśnienie, skieruj igłę w kilku kierunkach bez wyjmowania końcówki igły z tkanki.
3. Zwolnić tłok strzykawki i wyjąć igłę z tkanki (nie wyjmować igły z tkanki bez zwolnienia tłoka, ponieważ cały pobrany materiał zostanie zassany do strzykawki).
4. Odłączyć strzykawkę od igły i napełnić ją powietrzem.
5. Ponownie podłącz strzykawkę do igły i użyj powietrza, aby przedmuchać próbkę z igły na jedno lub więcej szkiełek.
6. Rozmazać, osuszyć i zabarwić jak przy rozmazie krwi (patrz 4.1.).

### 4.3.2. Patogeny wykrywane w aspiratach cienkoigłowych

#### *Leishmania infantum*

Aspiraty węzłów chłonnych, zwłaszcza od zwierząt z limfadenopatią, są najwłaściwsze, podczas gdy pobieranie szpiku kostnego i śledziony jest bardziej inwazyjne, ale może być wskazane w przypadku zarażonych klinicznie zdrowych psów.

Amastigoty, z typową strukturą jądra/kinetoplastu w kształcie litery „T”, można zobaczyć w cytoplazmie monocytów/makrofagów, a także swobodnie w rozmazie.

W przypadkach, gdy występuje kulawizna, amastigoty można zaobserwować w cienkoigłowych aspiratach płynu maziowego.

Aspiraty ze zmian skórnych są również metodą do wykonania w celu wykrycia zarażenia amastigotami w makrofagach *Leishmania* za pomocą cytologii.

#### *Ehrlichia canis*

Czułość badania mikroskopowego może być wyższa przy badaniu cienkoigłowych aspiratów z węzłów chłonnych, szpiku kostnego lub śledziony, albo w preparatach z kożuszka leukocyтарnego, w porównaniu z rozmazem krwi, jednak obecnie zalecaną metodą diagnostyczną jest wykrywanie DNA metodą PCR.

## 4.4. Wykrywanie i identyfikacja mikrofilarii

### 4.4.1. Informacje ogólne

Rozpoznanie zarażenia nicieniami filarioidalnymi u zwierząt towarzyszących można przeprowadzić poprzez izolację i identyfikację morfologiczną krążących mikrofilarii. Próbkę krwi należy zbadać po zagęszczeniu testem Knotta lub metodą filtracyjną (komercyjny zestaw testowy: Difil-Test®). Świeże rozmazy krwi nie pozwalają na identyfikację gatunku i mają bardzo niską czułość.

Należy podkreślić, że liczba krążących mikrofilarii niekoniecznie koreluje z liczbą dorosłych robaków, tj. psy z wysoką mikrofilaremią mogą być nosicielami niewielu dojrzałych robaków. Również czas pobrania krwi może wpływać na czułość wykrywania mikrofilarii: zarówno w przypadku *D. repens*, jak i *D. immitis* opisano tendencję do wyższej mikrofilareмии w godzinach nocnych.

Mikrofilarie można różnicować za pomocą pomiarów morfometrycznych, barwienia kwaśną fosfatazą lub, szczególnie w wątpliwych przypadkach, metodami biomolekularnymi umożliwiającymi rozpoznanie gatunku po izolacji DNA z pełnej krwi i zagęszczeniu mikrofilarii po wirowaniu. Istnieją pewne ograniczenia w identyfikacji morfologicznej krążących mikrofilarii. Dotyczą one wpływu różnych technik utrwalania na wielkość larw, słabego wybarwienia larw w próbce oraz współzarażenia nieproporcjonalną liczbą larw innych gatunków. PCR specyficzny dla gatunku (w czasie rzeczywistym) jest metodą z wyboru do różnicowania gatunków.

Mimo że inwazję robaczącą serca (*D. immitis*) można wiarygodnie zdiagnozować za pomocą serologii, zawsze zaleca się wykonanie testu na obecność krążących mikrofilarii.

U kotów, u których nie występuje mikrofilaremia lub wynik wykrywania antygeny jest ujemny, ale występują u nich objawy kliniczne dirofilariozy, wykrycie przeciwciał jest alternatywą dla stwierdzenia zarażenia.

#### 4.4.2. Test Knotta

Ta metoda polega na zagęszczeniu mikrofilarii obecnych w 1 ml krwi EDTA przez odwirowanie. Są one następnie barwione błękitem metylenowym.

Pokrótkce, 1 ml krwi z EDTA rozcieńcza się w 9 ml 2% formaliny i roztwór miesza się przez kilka minut. Następnie wiruje się przy 390 x g przez 5 minut. Supernatant usuwa się i do osadu dodaje się jedną kroplę 1% błękitu metylenowego w celu przeprowadzenia analiz morfometrycznych lub zbadania aktywności kwaśnej fosfatazy, chociaż powszechną procedurą identyfikacji mikrofilarii jest obecnie procedura biomolekularna (patrz 4.4.1.). Szkiełka bada się przy 40-krotnym powiększeniu na obecność larw i przy 100-krotnym powiększeniu w kierunku oceny cech morfologicznych. Aby uzyskać maksymalną czułość, należy przeanalizować cały osad.

#### 4.4.3. Zmodyfikowany test Knotta

Alternatywnie, żywe mikrofilarie można wykryć w oparciu o ich ruchliwość, gdy stosuje się zmodyfikowany test Knotta. W tym celu do 1 ml krwi EDTA dodaje się cztery krople 2% roztworu saponiny i 5 ml wody destylowanej, aby zniszczyć erytrocyty. Zawiesinę można badać pod mikroskopem, jak wyżej. Żywe larwy są ruchliwe i można je łatwo wykryć pod mikroskopem (powiększenie 40x).

#### 4.4.4. Metoda filtracji (Difil-Test®)

Ten komercyjny zestaw koncentruje mikrofilarie z 1 ml krwi EDTA na filtrze o powierzchni mniej więcej wielkości małego szkiełka nakrywkowego. Dzięki tej technice mikrofilarie są wyprostowane, a nie zwinięte lub faliste.

Zestaw zawiera roztwór do lizy, barwnik, filtry i wkład.  
W skrócie procedura wygląda następująco:

- Filtr umieszcza się na podstawie wkładu filtra i wkład jest mocowany.
- 1 ml krwi dodaje się do 9 ml roztworu do lizy w dużej strzykawce i miesza razem. Zhemolizowany roztwór krwi przedostaje się przez filtr poprzez podłączenie go do portu na wkładzie filtra.
- Filtr płucze się poprzez przepuszczenie równej objętości wody przez otwór na wkładzie filtra.
- Wkład filtra otwiera się, filtr usuwa i umieszcza na szkiełku mikroskopowym.
- Kroplę barwnika dołączonego do zestawu umieszcza się na filtrze.
- Na filtr nakłada się szkiełko nakrywkowe w celu rozproszenia barwnika i preparat jest gotowy do oglądania.

#### 4.4.5. Barwienie kwaśną fosfatą

Istnieje kilka wyróżniających cech, które mogą odróżnić mikrofilarie *D. immitis* od mikrofilarii *D. repens* (i od niepatogennych nicieni filarioidalnych). Jest to szczególnie ważne na obszarach, na których występują zarówno *D. immitis*, jak i *D. repens* (patrz Przewodnik ESCCAP nr 5: Zwalczanie chorób przenoszonych przez wektory u psów i kotów).

Mikrofilarie różnych nicieni filarioidalnych można rozróżnić po barwieniu kwaśną fosfatą (patrz tabela 6):

- Mikrofilarie *D. immitis* mają dwie plamki (otwór wydalniczy i odbytowy);
- Mikrofilarie *D. repens* mają tylko jedną plamkę (otwór odbytowy);
- Mikrofilarie *Acanthocheilonema dracunculoides* mają trzy obszary aktywności enzymatycznej (otwór odbytowy, ciało wewnętrzne, otwory wydalnicze);
- Mikrofilarie *A. reconditum* cechują się rozproszonym jasnoczerwonym wzorem.

Dostępne są komercyjne zestawy, które można wykorzystać w laboratorium. Jednak metody barwienia są stopniowo zastępowane przez izolację DNA z zagęszczonych mikrofilarii.

#### 4.4.6. Pomiary mikrofilarii

Alternatywnie, pomiary mikrofilarii mogą pomóc w ich rozróżnieniu: w tym celu średnia długość powinna opierać się na wielkości 10 larw (patrz także Przewodnik ESCCAP nr 5: Zwalczanie chorób przenoszonych przez wektory u psów i kotów). Należy zauważyć, że preparat (zwłaszcza technika utrwalania) może znacznie zmienić długość i cechy mikrofilarii.

Tabela 6. Morfologiczne zróżnicowanie mikrofilarii<sup>1</sup> ze względu na długość, szerokość i kształt

Gatunek	Długość (μ)	Szerokość (μ)	Cechy
<i>Dirofilaria immitis</i>	301,77 ± 6,29 290–330	5–7	Bez pochwki, odcinek głowowy spiczasty, ogon prosty ze spiczastym końcem. APh-S: dwa punkty aktywności zlokalizowane wokół otworów odbyowego i wydalniczego.
<i>D. repens</i>	369,44 ± 10,76 300–370	6–8	Bez pochwki, odcinek głowowy tępy, ogon ostry i nitkowaty, często zakończony jak rączka parasola. APh-S: jeden punkt aktywności wokół otworu odbyowego.
<i>Acanthocheilonema reconditum</i>	264,83 ± 5,47 260–283	4	Bez pochwki, odcinek głowowy tępy z wydatnym haczykiem głowowym, guzik ogonowy haczykowaty i zakrzywiony. APh-S: aktywność w całym organizmie.
<i>A. dracunculoides</i>	259,43 ± 6,69 190–247	4–6,5	Pochewka, odcinek głowowy tępy, odcinek ogonowy ostry i wydłużony. APh-S: trzy punkty, w tym jeden pośrodku ciała.

<sup>1</sup> Mikrofilarie (n=10) mierzone po zagęszczeniu testem Knotta; przy użyciu testu Difil® wymiary są krótsze. APh-S: barwienie kwaśną fosfatą.

## 4.5. Biomolekularne metody wykrywania i różnicowania: reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) i izotermiczna amplifikacja materiału genetycznego (LAMP)

### 4.5.1. Informacje ogólne

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) jest coraz bardziej popularną i skuteczną metodą laboratoryjną do diagnozowania wielu zakażeń i zarażeń. Metoda cechuje się wysoką specyficznością i przy różnym materiale i stadium zarażenia jest również bardzo czuła i może pomóc lekarzowi w diagnozowaniu aktywnych inwazji, gdy można podejrzewać wystąpienie objawów klinicznych. Metoda jest wskazana w przypadku patogenów i pasożytów przenoszonych przez wektory, które wymagają wykrywania o wysokiej czułości i/lub różnicowania bez wykorzystania morfologii.

Jeśli PCR stosuje się do celów diagnostycznych, a nie różnicowania, czułość będzie, między innymi, zależała od liczby kopii genu docelowego.

PCR przeprowadza się wyłącznie w wyspecjalizowanych laboratoriach. Dokładne wyniki zależą zatem od prawidłowego pobrania, zabezpieczenia i wysłania próbek. Stosowanie dwóch różnych protokołów PCR może zwiększyć czułość i specyficzność.

Ogólne zalecenia są następujące:

- Ponieważ reakcja PCR jest bardzo czuła, należy unikać zanieczyszczenia krzyżowego próbek. Próbki należy pobierać i przechowywać w miarę możliwości za pomocą sprzętu jednorazowego użytku.
- Próbki należy przechowywać w lodówce (4°C) i wysłać z wkładami z lodu lub zamrożone w temperaturze -20°C lub niższej.
- Próbki powinny dotrzeć do laboratorium nie później niż 3 dni po pobraniu.

Izotermiczna amplifikacja materiału genetycznego (LAMP) jest techniką z pojedynczą probówką do amplifikacji DNA. Ze względu na swoją prostotę i niskie koszty LAMP jest już używany przez klinicystów do wykrywania niektórych patogenów, jako prosty test przesiewowy w terenie lub w klinice. Odczynniki/zestawy są dostępne w handlu, dostarczane przez niektóre firmy. W przeciwieństwie do techniki PCR, w której reakcję przeprowadza się w szeregu etapów lub cykli o naprzemiennej temperaturze, amplifikacja izotermiczna jest prowadzona w stałej temperaturze i nie wymaga termocyklera. Zaobserwowano, że LAMP jest bardziej niż PCR odporny na inhibitory w złożonych próbkach, takich jak krew lub kał, prawdopodobnie z powodu zastosowania innej polimerazy DNA (zwykle Bst – *Bacillus stearootherophilus* – polimeraza DNA zamiast polimerazy Taq, jak w PCR).

Ekstrakcję DNA można przeprowadzić praktycznie na każdym podłożu, jednak najczęściej analizowanymi próbkami są próbki krwi i tkanek.

#### **Krew:**

Kilka patogenów przenoszonych przez wektory, takich jak *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Bartonella* i *Babesia* można zdiagnozować identyfikując ich DNA we krwi obwodowej. PCR stosuje się również do wykrywania i różnicowania gatunków filarioidalnych, które uwalniają mikrofilarie do krwioobiegu.

Istnieje wiele protokołów PCR dla krwi, a każde laboratorium ma swój własny, z użyciem najlepszego antykoagulantu. Większość preferuje EDTA, ale najlepiej sprawdzić w wybranym laboratorium. Zwykle wystarczy maksymalnie 0,5–1 ml krwi.

#### **Aspiraty tkankowe:**

*Leishmania infantum* i *Ehrlichia* spp. są obecne w narządach limfatycznych, a aspiraty cienkoigłowe można stosować do testów PCR. Biopsje skóry można również pobrać do PCR w kierunku *Leishmania*. Po pobraniu aspirat można wycisnąć na bibułę filtracyjną lub wacik, który następnie można przechowywać w sterylnej probówce w temperaturze 4°C. Wykazano, że rozmiatywanie materiału na szkiełkach ma niższą czułość.

#### **Pasożyty:**

Mogą zaistnieć sytuacje, w których konieczna jest molekularna identyfikacja poszczególnych pasożytów (robaki, stawonogi). Powinny one być konserwowane w 70% etanolu i wysyłane w hermetycznych pojemnikach.

**Kał:**

Próbki kału są również bezpośrednio wykorzystywane do wykrywania DNA różnych stadiów pasożytniczych. Na przykład zaleca się wykrywanie *Tritrichomonas fetus* w kale kotów zamiast zagęszczenia poprzez posiew w kale (patrz 1.2.13.). Obecnie copro-PCR stosuje się w przypadku *E. multilocularis*, różnych kokcydiów (tj. *Toxoplasma / Hammondia*), *Cryptosporidium* i *Giardia*.

W przypadku pasożytów wymagających różnicowania gatunków lub genotypów, którego nie można dokonać morfologicznie, np. w przypadku *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., oocyst *Toxoplasma / Hammondia*, jaj glist lub tasiemców, genotypowanie (z próbek kału lub izolowanych pasożytów) może być pomocne w oznaczaniu gatunków zoonotycznych lub genotypów itp. W niektórych przypadkach z małą liczbą stadiów pasożytniczych lub tam, gdzie ekstrakcja DNA jest trudna (np. w przypadku jaj tasiemców lub glist, patrz poniżej), najlepiej byłoby, gdyby wcześniej stadia pasożytnicze zostały zagęszczone w kale. Jako przykład można przyjąć metodę flotacji i przesiewania sekwencyjnego (patrz poniżej).

**Flotacja i przesiewanie etapowe:**

Jaja robaków można gromadzić z próbek kału, łącząc flotację w roztworze chlorku cynku, a następnie kolejne przesiewanie przy użyciu sit o malejących rozmiarach oczek (21–200 µm). W związku z tym, stosując odpowiedni rozmiar oczek ostatniego sita, jaja (w szczególności jaja tasiemców i jaja *Toxocara* do różnicowania) można zagęścić, umożliwiając m.in. izolację DNA.

## 4.5.2. Informacje szczegółowe

Zasadniczo wszystkie istotne pasożyty można wykryć lub potwierdzić metodą PCR lub innymi metodami genetycznymi. Na rynku jest już kilka urządzeń oferujących jednoczesne automatyczne wykrywanie czynników zakaźnych, ale nie zostały one zatwierdzone w medycynie weterynaryjnej.

W literaturze, w zależności od pasożyta, dostępne mogą być następujące opcje:

- specyficzne startery dla różnych gatunków pasożytów replikujących tylko docelowy rodzaj i/lub gatunek;
- multipleks PCR łączący różne (specyficzne) startery;
- tradycyjny PCR vs. PCR w czasie rzeczywistym;
- LAMP.

Po uzyskaniu produktu PCR można go zidentyfikować na podstawie jego wielkości za pomocą elektroforezy żelowej (z lub bez uprzedniej fragmentacji enzymami restrykcyjnymi) lub przez sekwencjonowanie łańcuchów nukleotydowych i porównanie ich z dostępnymi sekwencjami genów.

**Interpretacja:**

Wszystkie wyniki PCR należy interpretować jako element kryteriów klinicznych i innych testów diagnostycznych.

Kilka przykładów, bez wymagań kompletności:

## Pierwotniaki

### *Leishmania infantum*

PCR można stosować zarówno do diagnozowania inwazji, jak i do monitorowania psów poddawanych leczeniu leishmaniozy. Kilka laboratoriów oferuje również ilościowe testy PCR (w czasie rzeczywistym itp.), które mogą wskazywać liczbę pasożytów oraz wzrost/spadek tej liczby. Testy te są one również przydatne do monitorowania odpowiedzi na leczenie.

Chociaż próbkami z wyboru dla *L. infantum* są próbki tkanek (węzły chłonne, śledziona, szpik kostny) lub próbki skóry (w przypadku zmian skórnych), laboratoria wykonują również analizy krwi. Istnieją pewne obawy dotyczące wyników fałszywie ujemnych (brak białych krwinek we krwi zawierającej pasożyta) ze względu na niską czułość, chociaż czułość PCR w czasie rzeczywistym ukierunkowana na geny wielokrotnie kopiowane wydaje się być zadowalająca. Obecnie zalecane są również badanie próbek nieinwazyjnych, takich jak wymazy spojówkowe. W tym celu należy pobrać próbki z obu oczu, a wymazy powinny zawierać wystarczającą liczbę komórek.

## **Babesia**

Czułość PCR okazała się wyższa niż badanie rozmazu krwi, zwłaszcza w diagnostyce przewlekle zarażonych psów. Nie można jednak całkowicie wykluczyć wyników fałszywie ujemnych. Identyfikacja gatunków i podgatunków może być ważna z punktu widzenia możliwości leczenia (duża vs. mała *Babesia*) i rokowania.

## **Toxoplasma gondii**

*Toxoplasma gondii* wydalane przez koty z trudem można odróżnić morfologicznie od oocyst niepatogennego *Hammondia hammondi*. Wraz z procedurami serologicznymi różnicującymi specyficzne przeciwciała w surowicach kotów i żywicieli pośrednich, PCR można wykonać z oocyst lub w celu identyfikacji cyst z bradyzoitami *T. gondii* w mięsie. U psów i/lub kotów z zaburzeniami neurologicznymi zgodnymi z toksoplazmozą można przeprowadzić PCR z płynu mózgowo-rdzeniowego lub cieczy wodnistej.

## **Neospora caninum**

Oocysty *N. caninum* są wydalane w kale psa przez bardzo krótkie okresy i w niskim zagęszczeniu. Podobnie jak w przypadku *T. gondii* / *H. hammondi*, oocysty *N. caninum* są trudne do odróżnienia od *Hammondia heydorni* (występującego w kale psów lub lisów) w rutynowej diagnostyce, a także *T. gondii* / *H. hammondi* (w przypadku koprofagii kału kotów). Dlatego do ich identyfikacji wskazana jest analiza PCR.

U psów z podejrzeniem objawów klinicznych, opcją diagnostyczną jest analiza serologiczna wraz z biopsją mięśni, badaniem wysięku lub płynu mózgowo-rdzeniowego metodą PCR.

## **Giardia**

Klasyczne testy w kierunku zarażeń *Giardia* zwykle nie są gatunkowo specyficzne. Jeśli w celu wyjaśnienia potencjału zoonotycznego konieczne jest określenie odmiany genotypowej, można przeprowadzić multiplex PCR i sekwencjonowanie.

## **Tritrichomonas**

PCR, który umożliwia różnicowanie *T. fetus* od innych rzęśistków w kale kotów, ma przewagę nad wykrywaniem pasożytów w hodowli (InPouch®, patrz 1.2.13.) i omija jego wady (wrażliwość na temperaturę, czas).

## **Bakterie przenoszone przez wektory-stawonogi**

### **Bartonella**

Chociaż złotym standardem w diagnostyce bartonellozy jest posiew krwi, może to być czasochłonne i kosztowne. Możliwe jest również wykrycie DNA *Bartonelli* w próbkach krwi, tkanek, płynu mózgowo-rdzeniowego lub cieczy wodnistej. Połączenie hodowli wzbogacającej, po której następuje amplifikacja PCR, skutkuje zwiększoną czułością.

### **Ehrlichia/Anaplasma**

Dodatni wynik PCR generalnie potwierdza obecność zakażenia tymi bakteriami przenoszonymi przez kleszcze. Jednak ujemny wynik PCR nie wyklucza obecności infekcji.

Czułość testu PCR dla *Ehrlichia* jest wyższa, gdy przeprowadza się go na węzłach chłonnych, śledzionie, aspiratach szpiku kostnego lub kożuszkach leukocytnych.

## Helminy

### Jaja tasiemców

Na terenach endemicznych *Echinococcus* zaleca się różnicowanie *Echinococcus* spp. z jajami innych tasiemców (Taenidae) w celu wykluczenia możliwości przenoszenia chorób odzwierzęcych. Jaja można izolować metodą flotacji, techniką przylepca w okolicy odbytu lub metodą flotacji i etapowego przesiewania próbek, przy zachowaniu zasad bezpieczeństwa biologicznego (wyposażenie specjalistycznych laboratoriów). PCR przeprowadza się ze specyficznymi starterami, jako multiplex PCR naceLOWany na różne gatunki tasiemców lub PCR na obecność szerokiego spektrum helmintów, a następnie sekwencjonowanie.

### *Toxocara*

Wykazano, że około jedna trzecia psów pozytywnych na *Toxocara* wydala jaja *Toxocara cati* (po koprofagii). Jaja te można odróżnić od jaj *T. canis* za pomocą pomiarów jaj lub bardziej wiarygodnie za pomocą PCR.

### Robaki płucne

*Aelurostrongylus abstrusus* jest najczęściej występującym robakiem płucnym u kotów. Jednak w niektórych krajach inne robaki płucne, takie jak *Troglostrongylus* spp. i *Osslerus rostratus* mogą być obecne, a do zróżnicowania morfologicznego L1 wymagana jest specjalistyczna wiedza. Alternatywnie, PCR można przeprowadzić z wyizolowanymi z kału L1 lub poprzez analizę wymazów z tchawicy lub popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (niższa czułość).

L1 najczęściej spotykanych nicieni płucnych u psów, *A. vasorum* i *C. vulpis* można łatwo rozróżnić morfologicznie. Jednak w pojedynczych przypadkach pomocne może być zastosowanie metod biomolekularnych do potwierdzenia gatunku.

### *Capillaria*

Psy, koty i inne ssaki mogą być nosicielami różnych gatunków *Capillaria*, które mają różne cykle życiowe. Nie wszystkie są ostatecznie przypisane taksonomicznie. PCR może pomóc w identyfikacji gatunku.

### Nicienie filarioidalne

Specyficzny dla gatunku PCR (w czasie rzeczywistym) z krwi EDTA jest metodą z wyboru do różnicowania gatunków mikrofilarii (patrz 4.4.1), chociaż analiza morfologiczna i barwienie kwaśną fosfatazą są nadal stosowane.

### Niepasżytnicze helminty

Kiedy takie helminty są morfologicznie nie do odróżnienia lub wymagana jest ekstrakcja z próbek utrwalonych histologicznie, można przeprowadzić PCR, także z materiałem barwionym histologicznie lub zeszkobinami skóry.

## Stawonogi

W przypadkach, gdy morfologia stawonogów uniemożliwia ich identyfikację, można zastosować metody oparte na analizie DNA.

## Dermatofity

Dostępny w handlu panel obejmuje *Microsporum* spp., *M. canis* i *Trichophyton* spp. - PCR w czasie rzeczywistym, który charakteryzuje się wysoką czułością i specyficznością. Zeszkobiny skóry i/lub włosy należy pobrać i przesłać do laboratorium. Wyniki są dostępne po kilku dniach.



## 4.6. WYKRYWANIE DERMATOFITÓW

### 4.6.1. Informacje ogólne

Dermatofitozę diagnozuje się za pomocą kombinacji różnych i uzupełniających się testów, w tym lampy Wooda (tylko dla psów i kotów) i bezpośredniego badania w celu udokumentowania aktywnego zakażenia sierści, posiewu mykologicznego w celu identyfikacji gatunków grzybów i monitorowania odpowiedzi na leczenie, a czasami biopsji skóry przy guzowatych lub nietypowych objawach. Wykrywanie dermatofitów metodą PCR jest obecnie możliwe w przypadku psów i kotów w Europie (patrz 4.5.2.).

### 4.6.2. Bezpośrednie badanie włosów

Dermatofitozy można wykryć poprzez badanie mikroskopowe włosów. Jednak technika pobierania próbek i wiedza eksperta silnie wpływają na czułość tej procedury. Ponadto, pomimo optymalnego pobierania próbek i badania, nie można wykluczyć trichogramów fałszywie ujemnych (patrz 3.5.). Dlatego tylko pozytywny trichogram ma znaczenie. Wodorotlenek potasu (KOH) lub olej mineralny z dodatkiem barwników (np. błękitu laktofenolowego) lub bez nich, może być użyty do efektywniejszego wykrywania struktur grzybów. Włosy zakażone przez grzyby dermatofitowe mają zwykle postać powiększonych i nabrzmiąłych struktur o szorstkiej i nieregularnej powierzchni. Na powierzchni włosów zwykle widoczne są skupiska lub łańcuchy zarodników grzybów (arthroconidia) (2–4 µm dla *Microsporum canis*).

### 4.6.3. Badanie za pomocą lampy Wooda

Badanie sierści za pomocą lampy ultrafioletowej (lampa Wooda) jest dobrą metodą przesiewową w kierunku dermatofitozy u psów i kotów. Pod wpływem światła włosy zaatakowane przez niektóre gatunki dermatofitów, w tym *M. canis*, świecą na zielono. Włosy zakażone innymi gatunkami dermatofitów nigdy nie wykazują fluorescencji, a niektóre miejscowe leki mogą ją maskować. Tak więc negatywny wynik badania w lampie Wooda nie wyklucza dermatofitozy. Obserwację fluorescencji należy potwierdzić badaniem mikroskopowym włosów (choć rozpoznanie zakażonych włosów nie zawsze jest łatwe i może wymagać wprawnego oka) (patrz 4.6.2.).

### 4.6.4. Hodowla mykologiczna

Kultura mykologiczna pozostaje najbardziej niezawodną metodą potwierdzania dermatofitozy u psów i kotów. Pobranie próbki można uzyskać poprzez zeszkobanie skóry, wyskubanie sierści (pod lampą Wooda) lub wyczesanie sierści sterylną szczoteczką do zębów, kawałkiem sterylnej wykładziny lub ściereczką zatrzymującą kurz. Kilka podłoży (takich jak agar z dekstrozą Sabourauda) nadaje się do hodowli mykologicznych. W ciągu kilku dni mogą rozwinąć się kolonie dermatofitów, takich jak *M. canis*. Pożywki testowe dermatofitów (DTM) są regularnie stosowane w medycynie weterynaryjnej. Jednak podjęto bardzo niewiele prób oceny działania takich podłoży z próbkami pobranymi od zwierząt, a stosowanie samej DTM bez mikroskopowej identyfikacji makrokonidiów nie jest zalecane do diagnozowania dermatofitoz zwierzęcych. W idealnym przypadku materiał pobrany od zwierząt powinien zostać przesłany do laboratorium posiadającego doświadczenie w mykologii weterynaryjnej. W laboratorium specyficzna identyfikacja jest dokonywana poprzez badanie mikroskopowe kolonii grzybów. Liczba kolonii może pomóc w rozróżnieniu między mechanicznymi nosicielami, a zakażonymi zwierzętami. Nosicielstwo mechaniczne jest spowodowane zanieczyszczeniem środowiska/ze środowiska i zwykle wiąże się z ograniczoną liczbą kolonii dermatofitów w hodowli. Infekcja prowadzi do masowej produkcji zarodników grzybów (arthroconidia) i zwykle wiąże się z bardzo dużą liczbą kolonii dermatofitów w hodowli.



## **ZAŁĄCZNIK 1 – ZASADY PODSTAWOWE**

ESCCAP (Europejska Rada Naukowa ds. Pasożytów u Zwierząt Towarzyszących) jest niezależną organizacją non-profit, która tworzy wytyczne i promuje dobre praktyki w zwalczaniu i leczeniu inwazji pasożytniczych u zwierząt towarzyszących. Przy odpowiednim doradztwie ryzyko zachorowań i przenoszenia pasożytów pomiędzy zwierzętami i ludźmi może być zminimalizowane. ESCCAP ma aspirację, której wyrazem jest wizja Europy, w której pasożyty zwierząt towarzyszących nie stanowią więcej zagrożenia dla zdrowia i komfortowego życia zwierząt i ludzi.

Istnieje ogromna różnorodność w zakresie rodzajów i miejsc występowania pasożytów na całym obszarze Europy, a przewodniki ESCCAP reasumują i uwidaczniają istotne różnice jakie istnieją pomiędzy poszczególnymi częściami Europy, a tam gdzie jest to konieczne, zalecają stosowanie swoistych metod zwalczania.

### **ESCCAP uważa, że:**

- Lekarze weterynarii i właściciele zwierząt muszą podejmować działania w celu ochrony zwierząt przed inwazjami pasożytów.
- Lekarze weterynarii i właściciele zwierząt muszą podejmować działania w celu ochrony populacji zwierząt towarzyszących przed ryzykiem związanym z podróżami i ich potencjalnymi konsekwencjami w postaci wpływania na zmiany w miejscowej sytuacji epizootycznej, zachodzącymi pod wpływem przywiezienia lub wywiezienia z tego miejsca nie-endemicznych gatunków pasożytów.
- Lekarze weterynarii, właściciele zwierząt i lekarze medycyny powinni współpracować w celu ograniczenia ryzyka związanego z przenoszeniem odzwierzęcych chorób pasożytniczych.
- Lekarze weterynarii powinni być w stanie udzielać wskazówek właścicielom zwierząt odnośnie ryzyka związanego z inwazjami pasożytów i wiążącymi się z nimi chorobami oraz postępowania, które powinno być wdrożone w celu zminimalizowania tego typu ryzyka.
- Lekarze weterynarii powinni starać się edukować właścicieli zwierząt na temat pasożytów, aby umożliwić im odpowiedzialne postępowanie nie tylko w stosunku do zdrowia ich własnego zwierzęcia, ale również zdrowia innych zwierząt i ludzi żyjących w ich otoczeniu.
- W sytuacjach, w których jest to właściwe, lekarze weterynarii powinni przeprowadzać badania diagnostyczne w celu ustalenia statusu pasożytniczego, aby możliwe było zaproponowanie przez nich najlepszej możliwej porady.

### **Aby osiągnąć te cele ESCCAP tworzy:**

- Szczegółowe przewodniki dla lekarzy weterynarii i parazytologów weterynaryjnych.
- Tłumaczenia, adaptacje oraz streszczenia przewodników, które uwzględniają zróżnicowane potrzeby poszczególnych państw i regionów Europy. Wydania każdego przewodnika można znaleźć na [www.esccap.org](http://www.esccap.org) oraz [www.esccap.pl](http://www.esccap.pl)

Lekarze weterynarii powinni starać się edukować właścicieli zwierząt na temat pasożytów, aby umożliwić im odpowiedzialne postępowanie nie tylko w stosunku do zdrowia ich własnego zwierzęcia, ale również zdrowia innych zwierząt i ludzi żyjących w ich otoczeniu.

### **Oświadczenie:**

Dołożono wszelkich starań, aby wiedza zawarta w tych przewodnikach, która jest oparta na doświadczeniach ich autorów, była ścisła. Niemniej jednak, autorzy oraz wydawcy nie biorą odpowiedzialności za jakiegokolwiek konsekwencje wynikające z mylnej interpretacji zawartej w przewodnikach wiedzy, jak również nie stosuje się do tych przewodników żadnych zasad związanych z nadawaniem gwarancji. ESCCAP podkreśla, że w trakcie stosowania porad zawartych w jego przewodnikach, należy stale mieć na uwadze krajowe, regionalne oraz miejscowe regulacje prawne.

## ZAŁĄCZNIK 2 – SŁOWNICZEK, SKRÓTY I PRZYDATNE LINKI

---

### SŁOWNICZEK

---

<b>Czułość</b>	Odsetek próbek prawdziwie dodatnich (oceniany za pomocą testu uznanego za „złoty standard”) lub prawdopodobieństwo, że zarażone zwierzę może zostać wykryte jako pozytywne w teście.
<b>Czułość [%]</b>	$\text{Próbki prawdziwie dodatnie}/(\text{próbki prawdziwie dodatnie} + \text{próbki fałszywie ujemne}) \times 100$ .
<b>Specyficzność</b>	Odsetek próbek prawdziwie ujemnych (oceniany za pomocą testu uznanego za „złoty standard”) lub prawdopodobieństwo, że niezarażone zwierzę może zostać wykryte jako ujemne w teście.
<b>Swoistość [%]</b>	$\text{Próbki prawdziwie ujemne}/(\text{próbki prawdziwie ujemne} + \text{próbki fałszywie dodatnie}) \times 100$ .
<b>Metody wykrywania bezpośredniego</b>	Wykrycie obecności samego patogenu za pomocą wizualizacji (np. za pomocą mikroskopii), poprzez wykrycie materiału genetycznego (np. PCR lub LAMP) lub poprzez wykrycie cząsteczek specyficznych dla danego pasożyta (np. antygen, zwykle składający się z białek w różnych odmianach).
<b>Pośrednie metody wykrywania</b>	Metody serologiczne określające wcześniejszy kontakt z pasożytami poprzez wykrywanie swoistych przeciwciał wywołanych zarażeniem. Ponieważ przeciwciała są zwykle wytwarzane jakiś czas po początkowej inwazji i występują po eliminacji pasożyta, niekoniecznie wskazują na obecność aktywnych zarażeń. Wykrywanie przeciwciał można przeprowadzić w różnych formatach, np. Western blotting, bezpośrednie lub pośrednie testy immunofluorescencyjne, ELISA, testy przepływu bocznego i inne. Wykrywanie przeprowadza się przez zastosowanie znakowanych przeciwciał drugorzędowych. Wiele z tych testów, choć nie wszystkie, pozwala na ilościowe określenie poziomów (mian) przeciwciał, np. do badań kontrolnych w trakcie zarażenia lub leczenia.

## SKRÓTY

<b>CME</b>	monocytna erlichioza psów
<b>DFA</b>	test immunofluorescencji bezpośredniej
<b>DTM</b>	podłoże testowe dla dermatofitów
<b>EIA</b>	test immunoenzymatyczny
<b>ELISA</b>	test immunoenzymatyczny
<b>EPG</b>	liczba jaj na gram
<b>FECRT</b>	test redukcji liczby jaj w kale
<b>ICT</b>	immunochromatograficzny test paskowy
<b>IFAT</b>	test immunofluorescencji pośredniej na przeciwciała
<b>KOH</b>	roztwór wodorotlenku potasu
<b>L1</b>	larwy pierwszego stadium
<b>L3</b>	larwy trzeciego stadium
<b>LAMP</b>	Loop-Mediated Isothermal Amplification - izotermiczna amplifikacja materiału genetycznego
<b>LPG</b>	liczba larw na gram
<b>MIFC</b>	stężenie mertiolanu-jodu-formaldehydu
<b>OPG</b>	liczba oocyst na gram
<b>PCR</b>	reakcja łańcuchowa polimerazy
<b>SAF</b>	octan sodu-kwas octowy-formalina
<b>SAFC</b>	stężenie octanu sodu-kwasu octowego-formaliny

## PRZYDATNE LINKI

Pomiary za pomocą mikroskopu:

[www.youtube.com/watch?v=\\_CkcYrns-6I](http://www.youtube.com/watch?v=_CkcYrns-6I)  
[www.youtube.com/watch?v=\\_eu9OrNM\\_wY](http://www.youtube.com/watch?v=_eu9OrNM_wY)  
[www.youtube.com/watch?v=GdRLPAo\\_j1Y](http://www.youtube.com/watch?v=GdRLPAo_j1Y)  
[parazytologia.cvm.ncsu.edu/vmp930/m\\_keys.html](http://parazytologia.cvm.ncsu.edu/vmp930/m_keys.html)

Zmodyfikowana metoda MCMastera liczenia jaj:

[youtu.be/rkSGe-L4Sec](http://youtu.be/rkSGe-L4Sec)

Fotografie stadiów pasożytniczych można znaleźć na następujących stronach:

[www.parasite.org.au/para-site/contents/toc.html](http://www.parasite.org.au/para-site/contents/toc.html)  
[www.ksvdl.org/resources/news/diagnostic\\_insights\\_for\\_technicians/sierpnia2019/pasozyty-jelitowe-pt1.html](http://www.ksvdl.org/resources/news/diagnostic_insights_for_technicians/sierpnia2019/pasozyty-jelitowe-pt1.html)  
[www.ncvetp.org/parasite-image-database.html](http://www.ncvetp.org/parasite-image-database.html)  
[quizlet.com/64375340/parasites-in-veterinary-medicine-flash-cards/](http://quizlet.com/64375340/parasites-in-veterinary-medicine-flash-cards/)



ISBN: 978-1-913757-58-8

ESCCAP Secretariat  
Malvern Hills Science Park, Geraldine Road, Malvern,  
Worcestershire, WR14 3SZ, United Kingdom

0044 (0) 1684 585135  
info@esccap.org • wiedza@esccap.pl  
www.esccap.org • www.esccap.pl



4

## Diagnostyka parazytologiczna u kotów, psów i koniowatych

Przewodnik ESCCAP 04 wydanie pierwsze – listopad 2022