



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

WSTĘP	6
Pobieranie, transport i przechowywanie materiału diagnostycznego	7
Standardowe wyposażenie laboratorium parazytologicznego	8
Media i roztwory	10
1. BADANIA KOPROSKOPOWE	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

2. SEROLOGIA	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
3. BADANIE SKÓRY	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

4. RÓŻNE TECHNIKI	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

ZAŁĄCZNIK 1 – ZASADY PODSTAWOWE	41
ZAŁĄCZNIK 2 - SŁOWNICZEK, SKRÓTY I PRZYDATNE LINKI	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, niezbędne 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 wydalenie 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. Próbkę 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 słupkowców mogą wykluć 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. chemikalia (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 słupkowców 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 zeskrobiny 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, tęgoryjczy 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 kropeł roztworu flotacyjnego z powierzchni
- szkiełka mikroskopowe
- szkiełka nakrywkowe
- olej immersyjny
- szalka Petriego (szklana lub plastikowa, ze znakowanym liniami 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 zeszkrobów 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 dietylowy¹
- SAF (octan sodu-kwas octowy-formalina): 4,5 g octanu sodu, 6,0 ml stężonego kwasu octowego, 12,0 ml formaliny¹
- barwienie Ziehla-Neelsena: fuksyna karbolowa, zieleni malachitowa, kwaśny alkohol (15 ml HCl (37%) w 485 ml EtOH), metanol (użyj zestawu do barwienia)

¹ eter, formalina lub mertiolat-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 (mertiolat-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 ($ZnCl_2 + NaCl$)	275 g $ZnCl_2$ + 262 g NaCl	1000 ml	1,3
Roztwór chlorku cynku ($ZnCl_2$)	440 g $ZnCl_2$	1000 ml	1,3
Roztwór chlorku cynku ($ZnCl_2$)	660 g $ZnCl_2$	1000 ml	1,45
Roztwór siarczynu cynku ($ZnSO_4$)	760 g $ZnSO_4$	1000 ml	1,3
Roztwór siarczynu magnezu ($MgSO_4$)	350 g $MgSO_4$	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) μm (np. jaja *Fasciola hepatica*, pakiety jaj *Dipylidium caninum*), średni = około 60-80 (do 120) μm (jaja Ancylostomatidae, jaja Strongylidae), mały = około 40-60 μm (np. jaja *Strongyloides*, jaja Taeniidae) i bardzo małe = <40 μm (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 bezpośrednie 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 płynnego kału przez sedymentację przed koncentracją pasożytów za pomocą flotacji.

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 antygenu 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 antygenu, 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 pasożytów o stosunkowo wysokim ciężarze właściwym (np. jaja przywry, zwłaszcza *Fasciola hepatica* i *Opisthorchis felinus*, 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 kocięj 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. Przełać zawiesinę przez sitko (oczko 0,3 mm) do odpowiedniego pojemnika (np. zlewki lub podobnego naczynia) i przepłukać sitko silnym strumieniem wody z plastikowej elastycznej butelki, aż zlewka się napełni.
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 rozprowadzonej 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. W 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.

Stadia wyżej wymienionych pasożytów, tj. jaja *Trichuris*, *Capillaria*, 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.

Możliwy jest kilka modyfikacji standardowej techniki flotacji, z których niektóre opisano poniżej.

Wymagany materiał kałowy:

Małe zwierzęta: 4-5 g (w przybliżeniu wielkości orzecha włoskiego), pobrane w ciągu 3 kolejnych 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, wcześniej 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 zawiesziny 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 zawiesziny 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 zawieszynie. 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 mniejszym 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 (splukane, 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 należy następnie zdjąć, umieścić na szkiełku podstawowym 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 dopełnić 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 pierwotniaków i cyst pełzaków.

Wymagany materiał kałowy:

W przypadku psów i kotów biera 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. Zlać supernatant jednym ruchem bez przerwy (lub odessać pompą wodną), aż pozostanie maksymalnie 5 mm osadu.
5. Dopełnić próbówki roztworem flotacyjnym.
6. Wirować próbówki 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 próbówki 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 słupkowców 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. Przełąć 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):

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

- gdzie N to średnia liczba jaj/oocyst zliczonych na kratkę;
- n oznacza liczbę zliczonych kratek;
- objętość pod kratką = powierzchnia kratki (cm²) 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 kratkami**, dolna granica wykrywalności na szkiełku wynosi 50 epg/opg.

$$\text{epg/opg} =$$

liczone jaja	X	objętość zawiesiny kału (ml)
ilość kału (g) x rozmiar kratki (cm ²)		wysokość komory (cm) x liczba przeliczonych krutek

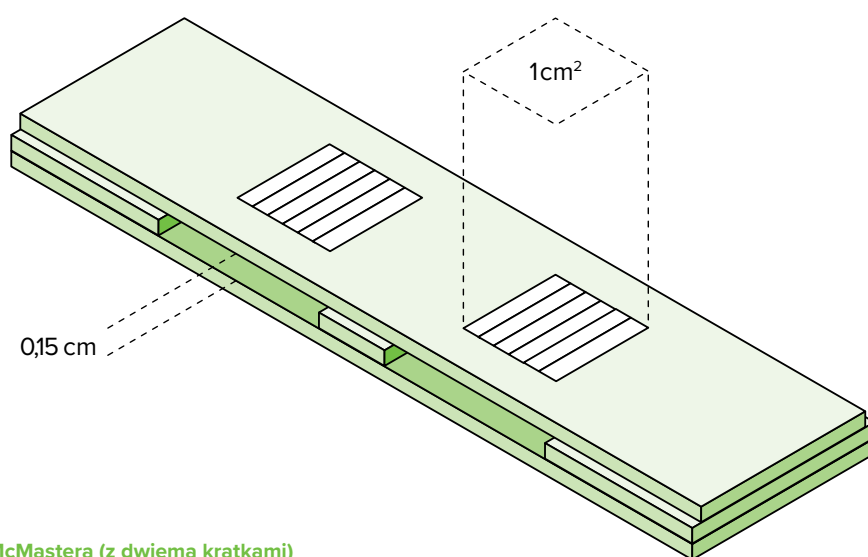
epg/opg = liczba jaj/oocyst na gram kału

rozmiar kratki: 1 x 1 cm = 1 cm²

wysokość komory = 0,15 cm

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

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



Rysunek 1: Komora McMastera (z dwiema kratkami)

1.2.5. Mini-FLOTAC

Zasada:

Mini-FLOTAC umożliwia wykrywanie i oznaczanie ilościowe pasożytów przewodu pokarmowego, w tym oocyst 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. Czułość Mini-FLOTAC wynosi 5 oocyst/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 procedurę 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, przesuwając 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, przesuwając 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 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, odciskając 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 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 wydalenie 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 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 napełniając go do połowy i luźno zamknąć wieczko (niezbędny jest dostęp powietrza).
3. Inkubować słoik przez 7-10 dni w ciemności w temperaturze 25°C, umożliwiając rozwiniętych 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 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 wody na szalce.
7. Zebrać pipetą płyn z szalki Petriego i zróznicować 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 szybką metodą, 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 odpowiednie 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. Wysuszyć na powietrzu.
12. Wykonać badanie mikroskopowe w powiększeniu 400–1000x (olejek immersyjny), szukając różowo zabarwionych, okrągłych tworów (średnica 4–6 μm).

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 koproantygénowe**

W handlu dostępne są różne zestawy do przeprowadzania procedury flotacji ułatwiające 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 zamknął 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 *Tritrichomonas fetus* w kocich odchodach. Masę kałową (0,03 g, odpowiadającą wielkości główki szpilki) wprowadza się za pomocą sterylnej bawełnianej wacika 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, a następnie 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. fetus*, 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 klinice, a także 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 wyższą precyzyjność, 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
Vet Expert Rapid Test CPV/CCV/Giardia Ag	Vet Planet Sp. z o.o., Polska	<i>Giardia</i>	immunochromatografia	pies
Vet Expert Rapid Test <i>Cryptosporidium</i> Ag	Vet Planet Sp. z o.o., Polska	<i>Cryptosporidium</i>	immunochromatografia	pies, kot
Vet Expert Rapid Test FPV/FCoV/Giardia Ag	Vet Planet Sp. z o.o., Polska	<i>Giardia</i>	immunochromatografia	kot
Vet Expert Rapid Giardia Ag	Vet Planet Sp. z o.o., Polska	<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, w których niska liczba pasożytów w materiale do wykrywania bezpośredniego obniża skuteczność diagnostyki, np. w babeszjozie lub neosporozie, albo w przypadkach, gdy nie ma możliwości pobrania zarażonej tkanki, a postacie pasożyta nie są bezpośrednio dostępne w płynach ustrojowych. Przykładem są pierwotniaki bytujące w tkankach, wywołujące przewlekłe zarażenia w takich narządach jak mózg czy oko - jak ma to miejsce w przypadku *Toxoplasma gondii* lub *Encephalitozoon cuniculi*. W diagnostyce leishmaniozy psów testy serologiczne stosuje się równolegle z metodami bezpośredniego wykrywania w celu wsparcia prawidłowej interpretacji stanu zarażenia i statusu immunologicznego zwierząt, monitorowania odpowiedzi na leczenie oraz przewidywania potencjalnego nawrotu choroby.

Wykrywanie przeciwciał

Podobnie jak testy koproantygennowe, które wykrywają antygeny w kale (patrz 1.2.13), serologiczne wykrywanie antygenów polega na bezpośrednim wykrywaniu w krwi lub surowicy części pasożyta (antygenów somatycznych) lub antygenów wydzielanych/wydalanych przez pasożyta. Podobnie jak w przypadku wykrywania DNA, stanowi to bezpośredni dowód obecności pasożyta w krwiobiegu, a tym samym dostarcza informacji o aktualnym stanie zarażenia. *Dirofilaria immitis* i *Angiostrongylus vasorum* to pasożyty krwi, których antygeny krążące mogą być wykrywane 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; www.laboklin.de; www.idexx.ch; uranovet.com i inne)

Analiza	Producent	Wykryte pasożyty lub bakterie przenoszone przez wektory	Postać	Gatunek żywiciela
Testy na wykrywanie antygenów				
Antigen Rapid CHW Ag Test Kit 2.0	BioNote, Korea	<i>Dirofilaria immitis</i>	Immunochromatografia	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	pies
Speed Diro™	BVT-Virbac, Francja	<i>Dirofilaria immitis</i>	Immunochromatografia	pies
Uranotest® Dirofilaria	Uranovet, Hiszpania	<i>Dirofilaria immitis</i>	Immunochromatografia	pies, kot
Vet Expert Rapid Test Heartworm Ag	Vet Planet Sp. z o.o., Polska	<i>Dirofilaria immitis</i>	Immunochromatografia	pies
WITNESS® Dirofilaria	Synbiotics Corp., Stany Zjednoczone*	<i>Dirofilaria immitis</i>	Immunochromatografia	pies
Testy na wykrywanie przeciwciał				
Anaplasma-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	pies
Babesia-ELISA DOG	Afosa, Niemcy	<i>Babesia canis</i>	ELISA	pies
Ehrlichia-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	pies
Uranotest® <i>Ehrlichia</i> -Anaplasma	Uranovet, Hiszpania	<i>Ehrlichia canis</i> , <i>Anaplasma platys</i>	Immunochromatografia	pies
Uranotest® <i>Ehrlichia</i>	Uranovet, Hiszpania	<i>Ehrlichia canis</i>	Immunochromatografia	pies
Uranotest® <i>Leishmania</i>	Uranovet, Hiszpania	<i>Leishmania infantum</i>	Immunochromatografia	pies
Vet Expert Rapid Test <i>Babesia gibsoni</i> Ab	Vet Planet Sp. z o.o., Polska	<i>Babesia gibsoni</i>	Immunochromatografia	pies
Vet Expert Rapid Test <i>Leishmania</i> Ab	Vet Planet Sp. z o.o., Polska	<i>Leishmania infantum</i>	Immunochromatografia	pies
Testy do wykrywania mieszanych antygenów (Ag) i przeciwciał (Ab).				
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
Vet Expert Rapid Test CaniVec-4	Vet Planet Sp. z o.o., Polska	<i>Dirofilaria immitis</i> (Ag) <i>Ehrlichia canis</i> (Ab) <i>Anaplasma</i> spp. (Ab) <i>Borrelia burgdorferi</i> (Ab)	Immunochromatografia	pies
Vet Expert Rapid Test CaniVec-4 <i>Leishmania</i>	Vet Planet Sp. z o.o., Polska	<i>Dirofilaria immitis</i> (Ag) <i>Ehrlichia canis</i> (Ab) <i>Anaplasma</i> spp. (Ab) <i>Leishmania infantum</i> (Ab)	Immunochromatografia	pies

* dystrybucja: Zoetis

Wykrywanie przeciwciał

Wykrycie swoistych przeciwciał przeciwko pasożytom w badanej próbce wskazuje, czy zwierzę wcześniej miało kontakt z tym antygenem/pasożytem. 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 ograniczyć liczbę fałszywych wyników, testy serologiczne można powtórzyć po pewnym czasie (zazwyczaj po 2-3 tygodniach), aby sprawdzić, czy wartości uległy zmianie. Jeśli u zwierzęcia, które wcześniej miało wynik ujemny lub niski, nastąpi wzrost wartości lub pojawi się wynik dodatni, można to interpretować jako aktywne/trwające zarażenie; jeśli wartość maleje lub zmienia się w wynik ujemny, oznacza to zakończenie zarażenia. Istnieją jednak wyjątki od tej reguły.

Aby zbadać zmiany poziomu przeciwciał, można zastosować ilościowe testy ELISA (z wartością jednostki lub stężenia) lub półilościowe testy IFA (miana). Szybkie testy w klinice mają charakter jakościowy i pozwalają jedynie na stwierdzenie, czy zwierzę jest serologicznie pozytywne, czy negatywne.

Metody wykrywania przeciwciał są podobne do tych, które służą wykrywaniu antygenów, z tą różnicą, że substrat do wykrywania jest odwrócony. Ponieważ większość analiz wykonywana jest w wyspecjalizowanych laboratoriach ze względu na konieczność użycia specjalistycznego sprzętu, nie są one szczegółowo opisane w niniejszym przewodniku - przedstawiono tu jedynie dostępne testy możliwe do wykonania w klinice.

Zazwyczaj wykrywanie przeciwciał stosuje się do oceny stanu zarażenia pierwotniakami pozajelitowymi powodującymi przewlekłą inwazję, takimi jak *T. gondii*, *E. cuniculi* (koty i psy), *Neospora caninum* (psy), *Sarcocystis neurona* (konie), a także wielu patogenów przenoszonych przez wektory, 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 przebiegu bąblowicy wielojamowej wykonywane jest w wyspecjalizowanych laboratoriach.

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

Niektóre laboratoria oferują „pakiety podrózne” dla psów, łączące różne testy (serologiczne, PCR, wykrywanie antygenów, test Knotta i inne) w kierunku różnych „egzotycznych” patogenów. Należy jednak wziąć pod uwagę różnice w okresach inkubacji oraz pojawienia się objawów klinicznych choroby. W niektórych przypadkach zalecane może być powtórzenie badań.

Niektóre kraje wprowadzają krajowe przepisy dotyczące testowania w kierunku piroplazmozy koni.

Zapewnienie jakości w systemach testów serologicznych

Podobnie jak w przypadku wszystkich testów diagnostycznych, testy serologiczne charakteryzują się różnym poziomem czułości i swoistości. Dobrą praktyką kliniczną jest zawsze uwzględnianie kontroli dodatnich i ujemnych w badaniu serologicznym. Wiele laboratoriów udostępnia informacje techniczne dotyczące jakości swoich testów oraz materiały pomocnicze do interpretacji wyników, zwłaszcza w kontekście czynników zakłócających, takich jak np. miana poszczepienne, reakcje krzyżowe z blisko spokrewnionymi patogenami oraz inne czynniki, które należy wziąć pod uwagę przy interpretacji wyników testu.

W zależności od obrazu klinicznego oraz wymagań konkretnego testu, zaleca się łączenie testu serologicznego z innymi metodami bezpośredniego wykrywania patogenów lub, jeśli nie jest to możliwe, z innym pośrednim systemem wykrywania przeciwciał. Western blot jest często stosowany jako test referencyjny w diagnostyce zarażeń u ludzi, jednak ze względu na koszty i czasochłonność jego zastosowanie w diagnostyce weterynaryjnej jest zazwyczaj ograniczone, z nielicznymi wyjątkami, do badań naukowych.

W razie potrzeby rozróżnia się immunoglobuliny produkowane podczas aktywnych, podostrych zarażeń (IgM) od tych, które dominują w zarażeniach przewlekłych (IgG).

W ocenie skuteczności leczenia leishmaniozy u psów sama serologia może być niewystarczająca, ponieważ przeciwciała mogą utrzymywać się przez kilka miesięcy, a nawet lat po ustąpieniu objawów klinicznych, gdyż pasożyt nie zostaje całkowicie wyeliminowany. Dlatego zaleca się przeprowadzanie dodatkowych badań laboratoryjnych oceniających stan immunologiczny i zdrowotny pacjenta. Ilościowy PCR pozwala oszacować obciążenie pasożytami w porównywalnych tkankach, co może być przydatne w monitorowaniu leczenia leishmaniozy psów, choć podejście to wymaga dokładnej oceny.

2.2. Ilościowe metody wykrywania przeciwciał

2.2.1. Pośredni test immunofluorescencji na obecność przeciwciał (IFAT)

Pośredni test immunofluorescencji (IFAT) opiera się na wykrywaniu swoistych przeciwciał, które wiążą się z antygenami (np. unieczynnionymi całymi pasożytami) unieruchomionymi na szkiełkach mikroskopowych, a następnie są wykrywane za pomocą przeciwciała wtórnego. Przeciwciała to wiążą się z niezmiennym regionem przeciwciała pierwotnego (obecnego w surowicy) i jest kowalencyjnie sprzężone z fluorochromem. Za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej wykrywa się fluorochrom przy odpowiedniej długości fali świetlnej. Technika ta jest bardzo dokładna, jeśli jest prawidłowo przeprowadzona, jednak jest czasochłonna i wymaga odpowiedniego przeszkolenia oraz doświadczenia. Mimo to, w diagnostyce małych zwierząt nadal jest szeroko stosowana, ponieważ jest mniej podatna na reakcje nieswoiste. Wadą testów IFAT jest to, że nie wszystkie antygeny są jednakowo dostępne dla przeciwciał, co może obniżyć czułość w porównaniu z innymi metodami. Ponieważ wyniki wyrażane są w mianach, test daje wynik półilościowy, co może być przydatne w badaniach kontrolnych.

2.2.2. Test immunoenzymatyczny (ELISA)

Test immunoenzymatyczny (ELISA) służy do wykrywania swoistych antygenów lub przeciwciał, które wiążą się z odpowiednio przygotowanym antygenem (np. lizat całych antygenów natywnych lub antygeny rekombinowane) lub przeciwciałami zaadsorbowanymi na powierzchni z tworzywa sztucznego (pośredni ELISA). W tym przypadku przeciwciała wtórne jest sprzężone z enzymem, który powoduje zmianę koloru substratu chromogennego. Zmiana ta może być mierzona i ilościowo oceniana poprzez pomiar gęstości optycznej. Bardziej zaawansowaną wersją tego testu jest ELISA kanapkowy (sandwich ELISA), w którym antygen nie jest wiązany bezpośrednio z powierzchnią z tworzywa sztucznego, ale wykorzystuje się przeciwciała połączone z tą powierzchnią, które „wychwytyją” swoiste antygeny z próbki. Metoda ta znajduje zastosowanie, gdy bezpośrednie wiązanie mieszaniny antygenów do powierzchni stałej powoduje obniżenie swoistości testu. Istnieją również inne formaty ELISA, dostosowane do różnych potrzeb diagnostycznych.

ELISA to bardziej znormalizowany format testu, ponieważ zwykle dostępny jest w postaci płytek 96-dołkowych i często zawiera w zestawie wbudowane kontrole, dzięki czemu do jego wykonania nie jest wymagana specjalistyczna wiedza na temat danego patogenu. Wyniki testu zazwyczaj wyrażane są jako wartości absorbancji, wyniki punktowe, stężenia lub jednostki przeciwciał. W większości przypadków do wykrywania swoistych przeciwciał używa się tylko jednej rozcieńczonej próbki materiału diagnostycznego, a w przypadku wykrywania antygenów stosuje się niskie rozcieńczenia. Z tego względu intensywność reakcji nie zawsze koreluje bezpośrednio 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 obserwacja mikroskopowa, ilościowy ELISA jest dokładniejszy niż IFAT do wykrywania zmian miana przeciwciał w czasie.

W szczególnych przypadkach do analizy można wykorzystać również inne materiały niż krew, jak w diagnostyce *Anoplocephala perfoliata* w ślinie koni (EquiSal®).

2.3. Metody jakościowe

2.3.1. Systemy szybkiego testowania

Szybkie testy enzymatyczne (z użyciem przeciwciał kowalencyjnie związanych z enzymem i etapem płukania) lub testy immunochromatograficzne (z przeciwciałami związanymi z koloidalnym złotem, bez konieczności płukania) są dostępne do szybkiej diagnostyki różnych chorób zakaźnych w klinice. Dostarczane są przez wyspecjalizowane firmy, które zapewniają kontrolę jakości oraz komplet materiałów potrzebnych do przeprowadzenia testu, w tym kontrolę dodatnie i ujemne. Testy te są łatwe i szybkie do wykonania i nie wymagają specjalistycznego przeszkolenia. Należy jednak pamiętać, że nie powinny być stosowane w przypadkach i dla żywicieli innych niż określone w specyfikacji testu. Poziom wykrywanych przeciwciał lub antygenów zazwyczaj nie jest wystarczająco dokładny, by umożliwić ocenę wzrostu lub spadku miana, dlatego testy te nie nadają się do monitorowania zmian w czasie.

3. BADANIE SKÓRY

3.1. Informacje ogólne

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

Pchły, wszy, roztocza i kleszcze powodują choroby pasożytnicze, zarówno poprzez swoje bezpośrednie działanie, jak i/lub przez 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 światła 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 predylekcyjnych dla ektopasożytów.

Zeskrobywanie wykonuje się ostrzem skalpela lub łyżeczki skórnej. 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 zeskrobin skóry. Pobrany materiał można następnie rozprowadzić na szkiełku, przykryć szkiełkiem nakrywkowym i obejrzeć pod mikroskopem w powiększeniu 40–100x. Na szkiełku należy również umieścić olej mineralny (lub kroplę glicerolu).

Najlepiej jest pobrać zarówno powierzchowne, jak i głębokie zeskrobiny 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 jesienno (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 zeskrobin skóry.
- W przypadku *S. scabiei* u psów należy pobrać głębokie zeskrobiny skóry z łokci, brzegów uszu i bocznych powierzchni stawów skokowych. Z doniesień wynika, że ponad 50% zeskrobin 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 zeskrobin *S. scabiei* u psów.
- W celu wykrycia roztoczy *Cheyletiella* można wykonać zeskrobiny ze skóry grzbietu i małżowin usznych; jednak zalecaną techniką diagnostyczną jest metoda przylepca (patrz 3.4.).
- Zeskrobiny skóry umożliwiają również wykrycie endopasożytów występujących w skórze, tj. larw nicieni *Pelodera*, *Uncinaria*, *Ancylostoma* lub stadiów promastigota *Leishmania*. Sporadycznie można również wykryć mikrofilarie *Dirofilaria*. W celu potwierdzenia gatunku należy przeprowadzić diagnostykę molekularną.

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

Głębokie zeskrobiny 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 łyżeczką skórną posmarowaną olejem mineralnym, w kierunku z włosiem, 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 monitorowania 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 wysoką 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 zastosowane 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 stronę taśmy dociska się kilkakrotnie do skóry. Następnie dociska się ją (również lepką stroną do dołu) do szkiełka. 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 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

Podobnie jak w przypadku endopasożytów, gdy morfologia stawonogów uniemożliwia ich jednoznaczną identyfikację, można zastosować techniki oparte na analizie DNA (zob. punkt 4.5). Do tego celu żywe stawonogi mogą być zakonserwowane w 70% alkoholu lub zamrożone.

4. RÓŻNE TECHNIKI

4.1. Rozmaz krwi

4.1.1. Informacje ogólne

Świeżo przygotowane rozmazy wykonane z próbek krwi pobranych z użyciem antykoagulantu mogą być wykorzystane do diagnostyki wielu inwazji pasożytniczych. Chociaż obecność pasożytów we krwi bywa rzadka, zwłaszcza w chorobach o przewlekłym przebiegu, to łatwość i szybkość wykonania rozmazu czyni go szybkim i niedrogim narzędziem diagnostycznym.

Wymagane materiały:

- dwa szkiełka przetarte alkoholem
- próbka krwi z antykoagulantem

Procedura:

1. Umieścić bardzo małą kroplę krwi blisko brzegu szkiełka podstawowego.
2. Umieścić brzeg 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 delikatnie dotknęła kropli krwi; w wyniku działania kapilarnego wzdłuż krawędzi szkiełka rozprzestrzeni się cienka linia krwi.
5. Szybkim płynnym ruchem przeciągnąć szkiełko wzdłuż całej długości szkiełka podstawowego (rozmaz powinien kończyć się „pierzastą krawędzią”).
6. Wysuszyć na powietrzu i barwić (Diff Quick).

Wysuszone na powietrzu preparaty utrwała 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 zwrócić uwagę na to, 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, infestacja 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 oraz obowiązkowych badań w kierunku 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 Przewodnik 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 nazwy *Theileria* / *Babesia annae* oraz *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, natomiast *Hepatozoon americanum* występuje u psowatych w Stanach Zjednoczonych. *Hepatozoon felis* i *H. silvestris* to rzadko spotykane pasożyty kotów. Sporadycznie *H. canis* może być również wykrywany u kotów. Gamonty występują głównie w granulocytach obojętnochłonnych i w rozmazach krwi widoczne są jako charakterystyczne cegiełkowate struktury.

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.).

Riketsje (*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. Bakterie te infekują odpowiednio płytki krwi (*A. platys*) lub głównie granulocyty obojętnochłonne (*A. phagocytophilum*), w których rozwijają się w postaci charakterystycznych mikrokolonii (tzw. morul), które można obserwować pod mikroskopem świetlnym w ostrej fazie choroby.

Mycoplasma spp. (syn. *Haemobartonella* spp.) to małe bakterie Gram-ujemne, które przyczepiają się do powierzchni erytrocytów, np. *Mycoplasma haemocanis* u psów i *M. haemofelis* u kotów. Inne, mniej patogenne gatunki opisano głównie u kotów: *Candidatus Mycoplasma haemominutum* i *Candidatus Mycoplasma turicensis*, a także u psów: *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*. Metody wykrywania DNA wspomagają diagnostykę oraz umożliwiają różnicowanie tych drobnoustrojów.

4.2. Metoda kożuszka

W tej procedurze probówkę mikrohematokrytową napełnia się krwią pobraną na 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 i umożliwiają wykrycie *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia* spp. lub *Hepatozoon* spp. Ponieważ *Babesia* spp. infekują głównie retikulocyty, a nie dojrzałe erytrocyty, ich wykrywalność w kożuszku leukocytnym jest wyższa niż w pełnej krwi. Do badania mikroskopowego rurkę hematokrytową zarysowuje się nożykiem do szkła na poziomie kożuszka leukocytnego i łamie tak, aby warstwę kożuszka leukocytnego i osocze można było przenieść na szkiełko. Do preparatu można dodać kroplę soli fizjologicznej lub wykonać rozmaz barwiony w celu uwidocznienia pasożytów.

4.3. Aspiraty cienkoigłowe

4.3.1. Informacje ogólne

Niektóre pierwotniaki i patogeny przenoszone przez wektory są obligatoryjnymi pasożytami wewnątrzkomórkowymi limfocytów, monocytów lub makrofagów. Z tego względu aspiracja tkanek układu krwiotwórczego (np. węzłów chłonnych, szpiku kostnego, śledziony) może być istotna zarówno dla ich identyfikacji morfologicznej w rozmazach, jak i/lub do 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). W przypadku pobierania materiału ze śledziony, aspirację należy wykonać bez podciśnienia, aby zminimalizować ryzyko 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 podłączyć strzykawkę do igły i użyć powietrza, aby przedmuchać próbkę z igły na jedno lub kilka szkiełek mikroskopowych.
6. Wykonać rozmaz, osuszyć i zabarwić próbkę zgodnie z procedurą przygotowywania rozmazu krwi (patrz punkt 4.1).

4.3.2. Patogeny wykrywane w aspiratach cienkoigłowych

Leishmania infantum

Aspiraty z węzłów chłonnych, zwłaszcza od zwierząt z limfadenopatią, są najwygodniejsze do pobrania, podczas gdy pobieranie szpiku kostnego i materiału ze śledziony jest bardziej inwazyjne, ale może być wskazane u zarażonych, ale klinicznie zdrowych psów.

Amastigoty, z typową strukturą jądra/kinetoplastu w kształcie litery „T”, mogą być widoczne w cytoplazmie monocytów/makrofagów, jak również wolne w rozmazie.

W przypadkach, gdy występuje kulawizna, amastigoty mogą być widoczne w aspiratach cienkoigłowych płynu stawowego.

Aspiraty ze zmian skórnych to także skuteczna metoda wykrywania zarażenia *Leishmania* poprzez cytologiczną identyfikację amastigotów w makrofagach.

Ehrlichia canis

Czułość badania mikroskopowego może być wyższa przy badaniu aspiratów cienkoigłowych z węzłów chłonnych, szpiku kostnego lub śledziony, a także 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 na podstawie 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 robaczycą 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 antygenu 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.

Pokrótkie, 1 ml krwi z EDTA rozcieńcza się w 9 ml 2% formaliny i roztwór miesza się przez kilka minut. Następnie próbkę odwirowuje się przy 390 x g przez 5 minut. Supernatant usuwa się i do osadu dodaje się jedną kroplę 1% błękitu w celu przeprowadzenia analiz morfometrycznych lub badania aktywności kwaśnej fosfatazy, chociaż obecnie powszechnie stosowane do identyfikacji mikrofilarii są metody biomolekularne (patrz 4.4.1.). Szkiełka mikroskopowe ogląda się pod powiększeniem 40x w celu wykrycia obecności larw oraz pod powiększeniem 100x w celu oceny cech morfologicznych. Dla uzyskania maksymalnej czułości należy przeanalizować cały osad.

4.4.3. Zmodyfikowany test Knotta

Alternatywnie, żywe mikrofilarie można wykryć szybciej, obserwując ich ruchliwość przy zastosowaniu zmodyfikowanego testu Knotta. W tym celu do 1 ml krwi z EDTA dodaje się cztery krople 2% roztworu saponiny oraz 5 ml wody destylowanej w celu zniszczenia erytrocytów. Otrzymaną zawiesinę można następnie badać pod mikroskopem, jak opisano wcześniej. Żywe larwy są ruchliwe i można je łatwo wykryć mikroskopowo (powiększenie 40x).

4.4.4. Metoda filtracji (Difil-Test®)

Ten komercyjny zestaw umożliwia zagęszczenie mikrofilarii z 1 ml krwi z EDTA na filtrze o powierzchni zbliżonej do wielkości małego szkiełka nakrywkowego. Przy użyciu tej techniki mikrofilarie zwykle przyjmują kształt prosty, a nie spiralny czy falisty.

Zestaw zawiera roztwór do lizy, barwnik, filtry oraz kasetę filtracyjną. W skrócie procedura wygląda następująco:

- Filtr umieszcza się na podstawie kasety filtracyjnej i montuje kasetę.
- 1 ml krwi dodaje się do 9 ml roztworu do lizy w dużej strzykawce i miesza. Powstałą hemolizowaną mieszaninę przepuszcza się przez filtr, podłączając strzykawkę do portu w kasecie filtracyjnej.
- Filtr przepłukuje się, przepuszczając taką samą objętość wody przez port w kasecie filtracyjnej.
- Kasetę filtracyjną otwiera się, filtr wyjmuje i umieszcza na szkiełku mikroskopowym.
- Na filtr nakłada się kroplę barwnika dostarczonego w zestawie.
- Nakłada się szkiełko nakrywkowe, aby rozprowadzić barwnik, i preparat jest gotowy do obserwacji pod mikroskopem.

4.4.5. Barwienie kwaśną fosfatą

Istnieje kilka cech morfologicznych, które pozwalają odróżnić mikrofilarie *D. immitis* od mikrofilarii *D. repens* (oraz od niepatogennych nicieni filarioidalnych). Ma to szczególne znaczenie w regionach, gdzie 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* wykazują trzy obszary aktywności enzymatycznej (otwór odbytowy, punkt zlokalizowany pośrodku ciała, otwór wydalniczy);
- Mikrofilarie *A. reconditum* barwią się w sposób **rozproszony, na jasnoczerwono**, bez wyraźnie zaznaczonych punktów.

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

4.4.6. Pomiary mikrofilarii

Alternatywnie, pomiary mikrofilarii mogą pomóc w ich różnicowaniu: w tym celu należy określić średnią długość na podstawie pomiaru 10 larw (patrz także Przewodnik ESCCAP nr 5: Zwalczanie chorób przenoszonych przez wektory u psów i kotów). Należy jednak pamiętać, że sposób przygotowania preparatu (szczególnie technika utrwalania) może znacząco wpłynąć na długość i cechy morfologiczne mikrofilarii.

Tabela 6. Morfologiczne różnicowanie mikrofilarii¹ na podstawie długości, szerokości i kształtu

Gatunek	Długość (μ)	Szerokość (μ)	Cechy
<i>Dirofilaria immitis</i>	301,77 ± 6,29 290–330	5–7	Brak pochwki, odcinek głowowy zaokrąglony, ogon prosty ze spiczastym końcem. APh-S: dwa punkty aktywności enzymatycznej w okolicy otworu wydalniczego i odbyowego.
<i>D. repens</i>	369,44 ± 10,76 300–370	6–8	Brak pochwki, odcinek głowowy tępy, ogon ostro zakończony i nitkowaty, często zakończony jak rączka parasola. APh-S: jeden punkt aktywności enzymatycznej w okolicy odbytu.
<i>Acanthocheilonema reconditum</i>	264,83 ± 5,47 260–283	4	Brak pochwki, odcinek głowowy tępy, z wydatnym haczykiem głowowym; ogon w kształcie haczyka, zagięty. APh-S: aktywność enzymatyczna rozproszona w całym ciele.
<i>A. dracunculoides</i>	259,43 ± 6,69 190–247	4–6,5	Obecna pochwka, odcinek głowowy tępy, odcinek ogonowy ostro zakończony i wydłużony. APh-S: trzy punkty aktywności enzymatycznej, w tym dodatkowy punkt w środkowej części ciała (oprócz okolicy otworu odbyowego i wydalniczego).

¹ Mikrofilarie (n=10) mierzone po zagęszczeniu testem Kotta; 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 popularnym i potężnym narzędziem diagnostycznym stosowanym do diagnozowania wielu schorzeń. 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 wysokiej czułości detekcji i/lub różnicowania wykraczającego poza zakres morfologii.

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

PCR przeprowadza się wyłącznie w wyspecjalizowanych laboratoriach. Dokładność wyników zależy zatem od prawidłowego pobrania, przechowywania i przesyłania próbek. Stosowanie dwóch różnych protokołów PCR może zwiększyć czułość i specyficzność.

Ogólne zalecenia są następujące:

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

Izotermiczna amplifikacja materiału genetycznego (LAMP) jest techniką amplifikacji DNA, która odbywa się w jednej próbówce. Ze względu na swoją prostotę i niskie koszty LAMP jest używany przez klinicystów do wykrywania niektórych patogenów, jako prosty test przesiewowy w terenie, jak i klinice. Odczynniki/zestawy są dostępne w handlu, dostarczane przez niektóre firmy. W przeciwieństwie do techniki PCR, w której reakcja przeprowadzana jest w cyklach ze zmieniającą się temperaturą, amplifikacja izotermiczna zachodzi w stałej temperaturze i nie wymaga termocyklera. LAMP okazał się bardziej niż PCR odporny na inhibitory w złożonych próbkach, takich jak krew lub kał, prawdopodobnie z powodu stosowania innej polimerazy DNA (zazwyczaj Bst – *Bacillus stearothermophilus* – polimeraza DNA zamiast polimerazy Taq, jak w PCR).

Izolację DNA można przeprowadzić praktycznie z każdego rodzaju materiału biologicznego, jednak krew i aspiraty tkanek należą do najczęściej analizowanych próbek.

Krew:

W przypadku wielu patogenów przenoszonych przez wektory, takich jak *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Bartonella* i *Babesia* diagnostyka może być przeprowadzona poprzez identyfikację ich DNA we krwi obwodowej. PCR stosuje się również do wykrywania i różnicowania gatunków filarioidalnych, które uwalniają mikrofilarie do krwiobiegu.

Istnieje wiele protokołów PCR dla próbek krwi, każde laboratorium stosuje własne procedury, w tym preferencje dotyczące najlepszego antykoagulantu. Większość preferuje EDTA, jednak zaleca się wcześniejszy kontakt z laboratorium, aby upewnić się co do wymagań. Zazwyczaj wystarcza 0,5–1 ml krwi.

Aspiraty tkankowe:

Leishmania infantum i *Ehrlichia* spp. występują w narządach limfatycznych, dlatego do diagnostyki metodą PCR można wykorzystać aspiraty cienkoigłowe z tych struktur. W przypadku *Leishmania* możliwe jest również pobranie biopsji skóry do analizy PCR. Po wykonaniu aspiracji, materiał można nanieść na bibułę filtracyjną lub wymazówkę z waty, a następnie przechowywać w sterylnej próbówce w temperaturze 4°C.

Rozmazy materiału na szkiełkach mikroskopowych wykazują niższą czułość.

Pasożyty:

W niektórych przypadkach może zaistnieć konieczność molekularnej identyfikacji pojedynczych pasożytów (helminatów, stawonogów).

Powinny one zostać zakonserwowane w 70% etanolu i wysłane w szczelnie zamkniętych pojemnikach.

Kał:

Próbki kału są również bezpośrednio wykorzystywane do wykrywania DNA stadiów pasożytniczych. Przykładowo, wykrywanie *Tritrichomonas foetus* w kale kotów jest obecnie zalecane zamiast hodowli kału (patrz 1.2.13). Obecnie technika copro-PCR jest stosowana do identyfikacji *E. multilocularis*, różnych kokcydiów (tj. *Toxoplasma* / *Hammondia*), *Cryptosporidium* i *Giardia*.

W przypadku pasożytów, dla których różnicowanie gatunków lub genotypów nie jest możliwe na podstawie cech morfologicznych, np. *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., oocysty *Toxoplasma/Hammondia*, jaja glist (Ascarididae) lub tasiemców (Taeniidae), genotypowanie (na podstawie próbek kału lub wyizolowanych pasożytów) może być pomocne w identyfikacji gatunków zoonotycznych lub określonych genotypów. W niektórych przypadkach, gdy liczba stadiów pasożyta w próbce jest niewielka, lub gdy izolacja DNA jest utrudniona (np. w przypadku jaj tasiemców lub glist – patrz poniżej), zaleca się wstępne zagęszczenie stadiów pasożyta w kale. Jako przykład, można zastosować metodę flotacji i przesiewania sekwencyjnego (szczegóły poniżej).

Flotacja i przesiewanie sekwencyjne:

Jaja helmintów można zagęścić z próbek kału poprzez połączenie flotacji w roztworze chlorku cynku z kolejnym przesiewaniem przy użyciu sit o malejących rozmiarach oczek (21-200 µm). Dzięki odpowiedniemu doborowi rozmiaru oczek ostatniego sita, możliwe jest skoncentrowanie jaj pasożytów (w szczególności jaj Taeniidae i *Toxocara*), co umożliwia np. izolację DNA do dalszych analiz genetycznych i różnicowania gatunków.

4.5.2. Informacje szczegółowe

Zasadniczo wszystkie istotne pasożyty można wykryć lub potwierdzić metodą PCR lub innymi metodami genetycznymi. Na rynku dostępne są urządzenia umożliwiające jednoczesne, zautomatyzowane wykrywanie czynników zakaźnych, jednak nie zostały one jeszcze zwalidowane w medycynie weterynaryjnej.

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

- specyficzne startery (primery) dla określonych gatunków pasożytów replikują wyłącznie docelowy rodzaj i/lub gatunek;
- multiplex PCR łączy różne (specyficzne) startery;
- tradycyjny PCR vs. PCR w czasie rzeczywistym;
- LAMP – izotermiczna amplifikacja DNA.

Po uzyskaniu produktu PCR, jego identyfikacja może odbywać się na podstawie: rozmiaru fragmentu DNA przy użyciu elektroforezy żelowej (z wcześniejszą fragmentacją przez enzymy restrykcyjne lub bez niej), lub sekwencjonowania – odczytu sekwencji nukleotydowej i porównania z dostępnymi sekwencjami genów w bazach danych.

Interpretacja:

Wszystkie wyniki PCR należy interpretować jako element całościowej oceny, obejmującej kryteria kliniczne oraz inne testy diagnostyczne.

Kilka przykładów, bez wymagań kompletności:

Pierwotniaki

Leishmania infantum

PCR może być wykorzystany zarówno do diagnozowania zarażenia, jak i do monitorowania psów poddawanych leczeniu leishmaniozy. Wiele laboratoriów oferuje również ilościowe testy PCR (np. real-time PCR), które umożliwiają określenie obciążenia pasożytem oraz ocenę wzrostu lub spadku tego obciążenia. Testy te są również przydatne w ocenie skuteczności terapii i postępów leczenia.

Mimo że preferowanym materiałem do badań w kierunku *Leishmania infantum* są aspiraty tkanek (węzły chłonne, śledziona, szpik kostny) lub bioptaty skóry (w przypadku zmian skórnych), to laboratoria wykonują również analizy krwi. Należy jednak brać pod uwagę występowanie wyników fałszywie ujemnych, spowodowanych brakiem we krwi leukocytów zawierających pasożyta, co skutkuje niską czułością testu. Pomimo tego, real-time PCR ukierunkowany na geny wielokrotnie kopiowane wykazuje zadowalającą czułość. Zalecane jest także pobieranie próbek nieinwazyjnych, takich jak wymazy spojówkowe. Do tego celu należy pobrać materiał z obu oczu, a wymazy powinny zawierać wystarczającą liczbę komórek.

Babesia

Czułość metody PCR okazała się wyższa niż badanie rozmazu krwi, szczególnie w diagnostyce psów przewlekłe zarażonych. Nie można jednak całkowicie wykluczyć wyników fałszywie ujemnych. Identyfikacja gatunku i podgatunków pasożyta ma istotne znaczenie zarówno dla wyboru odpowiedniego leczenia (duża vs. mała *Babesia*), jak i dla oceny rokowania.

Toxoplasma gondii

Oocysty *Toxoplasma gondii* wydalone przez koty są bardzo trudne do odróżnienia morfologicznego od oocyst niepatogennej *Hammondia hammondi* w rutynowej diagnostyce. W połączeniu z badaniami serologicznymi pozwalającymi na różnicowanie przeciwciał specyficznych w surowicy kotów i żywicieli pośrednich, można również wykonać PCR z oocyst, lub w celu identyfikacji cyst z bradyzoitami w mięsie. U psów i/lub kotów z objawami neurologicznymi sugerującymi toksoplazmozę, możliwe jest również wykonanie PCR z płynu mózgowo-rdzeniowego lub cieczy wodnistej oka.

Neospora caninum

Oocysty *Neospora caninum* są wydalone w kale psa przez bardzo krótki czas i w niskim zagęszczeniu. Podobnie jak w przypadku *T. gondii* / *H. hammondi*, oocysty *N. caninum* są praktycznie nie do odróżnienia morfologicznie od oocyst *Hammondia heydorni* (występujących w kale psów lub lisów) w rutynowej diagnostyce, a także od oocyst *T. gondii* / *H. hammondi* (w przypadku koprofagii kału kocięgo). Dlatego wskazane jest wykonanie analizy PCR w celu ich identyfikacji.

U psów z podejrzeniem wystąpienia objawów klinicznych, jako metody diagnostyczne można zastosować badania serologiczne, biopsję mięśni, badanie płynu mózgowo-rdzeniowego i/lub cieczy mózgowo-rdzeniowej metodą PCR.

Giardia

Klasyczne testy wykrywające zarażenia *Giardia* zazwyczaj nie są specyficzne gatunkowo. Jeśli istnieje potrzeba określenia potencjału zoonotycznego, można przeprowadzić PCR multilocusowy oraz sekwencjonowanie w celu identyfikacji odmiany genotypowej.

Tritrichomonas

PCR pozwalający na odróżnienie *Tritrichomonas foetus* w kale kota od innych rzęsistków eliminuje konieczność wykrywania pasożyta metodą hodowli (np. *InPouch*®, patrz 1.2.13.) oraz jej ograniczenia (wrażliwość na temperaturę, czasochłonność).

Bakterie przenoszone przez wektory-stawonogi

Bartonella

Mimo że złotym standardem w diagnostyce bartonellozy jest posiew krwi, metoda ta jest czasochłonna i kosztowna. Możliwe jest również wykrycie DNA *Bartonella* w próbkach krwi, tkanek, płynu mózgowo-rdzeniowego lub cieczy wodnistej oka. Połączenie hodowli wzbogacającej z amplifikacją DNA metodą PCR zwiększa czułość diagnostyczną.

Ehrlichia/Anaplasma

Dodatni wynik PCR zazwyczaj potwierdza obecność zakażenia wywołanego przez te bakterie przenoszone przez kleszcze. Jednak ujemny wynik PCR nie wyklucza obecności infekcji.

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

Helminy

Jaja tasiemców

Na terenach endemicznych dla *Echinococcus* zaleca się różnicowanie gatunków *Echinococcus* od innych jaj tasiemców z rodziny Taenidae w celu oceny potencjalnego ryzyka zoonotycznego. Jaja można izolować przy użyciu metod takich jak flotacja, technika przylepca stosowana w okolicy okołodbytovej lub flotacja i etapowe przesiewanie kału przy zachowaniu zasad bezpieczeństwa biologicznego (wyposażenie specjalistycznych laboratoriów). PCR przeprowadza się z użyciem specyficznych starterów, multiplex PCR nacełowany na różne gatunki Taenidae lub uniwersalny PCR dla helmintów, po którym następuje sekwencjonowanie.

Toxocara

Wykazano, że około jedna trzecia psów pozytywnych na *Toxocara* wydala jaja *Toxocara cati* (jako skutek koprofagii kału kotów). Jaja te można odróżnić od jaj *T. canis* poprzez pomiary wielkości lub, co jest bardziej wiarygodne, za pomocą PCR.

Robaki płucne

Aelurostrongylus abstrusus jest najczęściej występującym nicieniem płucnym u kotów. Jednak w niektórych krajach mogą również występować inne gatunki robaków płucnych, takie jak *Troglostrongylus* spp. czy *Oslerus rostratus*, ale morfologiczne różnicowanie larw L1 wymaga dużego doświadczenia. Alternatywnie, możliwe jest przeprowadzenie PCR z larw L1 wyizolowanych z kału lub za pomocą wymazów z tchawicy, bądź popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL), choć ta ostatnia metoda ma niższą czułość.

L1 najczęściej występujących nicieni płucnych u psów, *A. vasorum* i *C. vulpis* można łatwo rozróżnić morfologicznie. Jednak w niektórych przypadkach pomocne może być potwierdzenie za pomocą metod biomolekularnych.

Capillaria

Psy, koty i inne ssaki mogą być żywicielami różnych gatunków *Capillaria*, które mają odmienne cykle życiowe. Nie wszystkie gatunki zostały jednoznacznie sklasyfikowane taksonomicznie.

Nicienie filarioidalne

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

Niepasożytnicze helminty

W przypadkach gdy helminty są morfologicznie nie do odróżnienia lub muszą być pozyskane z próbek utrwalonych histologicznie, można przeprowadzić PCR, również z barwionych preparatów histologicznych lub zeszkrobiny skóry.

Stawonogi

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

Dermatofity

Dostępny komercyjnie panel zawiera testy real-time PCR o wysokiej czułości i swoistości, obejmujące *Microsporum* spp., *M. canis* oraz *Trichophyton* spp. Do badania należy pobrać zeszkrobinę skóry i/lub włosy, a następnie przesłać je do laboratorium. Wyniki są dostępne w ciągu kilku dni.

4.6. WYKRYWANIE DERMATOFITÓW

4.6.1. Informacje ogólne

Dermatofitozę diagnozuje się na podstawie kombinacji różnych i uzupełniających się testów, w tym lampy Wooda (tylko dla psów i kotów) i bezpośredniego badania mikroskopowego w celu potwierdzenia aktywnej infekcji włosa, hodowli mykologicznej, która pozwala zidentyfikować gatunek grzyba odpowiedzialny za zakażenie oraz monitorować odpowiedź na leczenie, a czasem również biopsji skóry, w przypadku zmian guzkowatych lub nietypowych prezentacji klinicznych. Obecnie wykrywanie dermatofitów metodą PCR jest już możliwe u psów i kotów w Europie (patrz 4.5.2.).

4.6.2. Bezpośrednie badanie włosów

Dermatofitozy mogą być wykrywane za pomocą mikroskopowego badania włosów. Jednakże technika pobierania próbek oraz doświadczenie osoby wykonującej badanie mają istotny wpływ na czułość tej metody. Co więcej, nawet przy optymalnym pobraniu materiału i dokładnym badaniu, nie można wykluczyć wyników fałszywie ujemnych (patrz 3.5.). Dlatego jedynie dodatni wynik trichogramu ma wartość diagnostyczną. Do lepszego uwidocznienia elementów grzybiczych można używać wodorotlenku potasu (KOH) lub oleju mineralnego, z dodatkiem barwników (np. błękitu laktofenolowego), względnie bez nich. Włosy zakażone przez grzyby dermatofitowe zazwyczaj są powiększone, obrzmiałe, o szorstkiej i nieregularnej powierzchni. Na powierzchni włosów często obserwuje się skupiska lub łańcuszki zarodników grzyba (arthroconidia) (2-4 μ m w przypadku *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 przez inne gatunki dermatofitów nigdy nie wykazują fluorescencji, a niektóre miejscowe leki mogą ją maskować. Dlatego wynik ujemny w badaniu z użyciem lampy Wooda nie wyklucza dermatofitozy. Zaobserwowaną fluorescencję należy potwierdzić mikroskopowym badaniem włosów (choć rozpoznanie zakażonych włosów może być trudne i często wymaga wprawnego oka) (patrz 4.6.2.).

4.6.4. Hodowla mykologiczna

Hodowla mykologiczna pozostaje najbardziej niezawodną metodą potwierdzania dermatofitozy u psów i kotów. Materiał do badania można pobrać poprzez zeszkrobiny skóry, wyrwanie włosów (najlepiej pod lampą Wooda), wyczesanie sierści sterylną szczoteczką do zębów, kawałkiem sterylnej wykładziny lub ściereczki pochłaniającej kurz. Do hodowli mykologicznej nadaje się kilka rodzajów podłoży (np. agar Sabourauda z dekstrozą). Kolonie dermatofitów, takich jak *Microsporum canis*, mogą rozwinąć się już po kilku dniach. Podłoża testowe dla dermatofitów (DTM) są regularnie stosowane w weterynarii, jednak niewiele badań oceniło ich skuteczność przy próbkach pobranych od zwierząt. Nie zaleca się stosowania wyłącznie DTM bez mikroskopowej identyfikacji makrokonidiów do diagnozy dermatofitoz u zwierząt. Idealnie, materiał powinien zostać wysłany do laboratorium specjalizującego się w mikologii weterynaryjnej. W laboratorium identyfikacja gatunkowa dokonywana jest poprzez badanie mikroskopowe kolonii grzyba. Liczba kolonii może pomóc w odróżnieniu nosicieli mechanicznych od zakażonych zwierząt: Nosicielstwo mechaniczne wynika z kontaminacji środowiskowej i zwykle wiąże się z niewielką liczbą kolonii dermatofitów. Zakażenie skutkuje masową produkcją zarodników (arthroconidia) i zwykle jest związane 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 zarażenia pasożytem, aby zapewnić najlepsze możliwe 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 stronach www.esccap.org oraz www.esccap.pl

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

Czułość	Odsetek próbek prawdziwie dodatnich (oceniany za pomocą testu uznanego za „złoty standard”) lub prawdopodobieństwo, że zarażone zwierzę może zostać wykryte jako pozytywne w teście.
Czułość [%]	$\text{Próbki prawdziwie dodatnie} / (\text{próbki prawdziwie dodatnie} + \text{próbki fałszywie ujemne}) \times 100$.
Specyficzność	Wskaźnik próbek prawdziwie ujemnych (oceniany na podstawie testu uznanego za „złoty standard”) lub prawdopodobieństwo, że niezarażone zwierzę zostanie wykryte jako negatywne przez test.
Swoistość [%]	$\text{Próbki prawdziwie ujemne} / (\text{próbki prawdziwie ujemne} + \text{próbki fałszywie dodatnie}) \times 100$.
Metody wykrywania bezpośredniego	Wykrycie obecności samego patogenu poprzez wizualizację (np. za pomocą mikroskopii), wykrywanie materiału genetycznego (np. PCR lub LAMP) lub wykrywanie cząsteczek specyficznych dla danego pasożyta (np. antygenów, zwykle składających się z białek w różnych wariantach).
Pośrednie metody wykrywania	Metody serologiczne, które określają wcześniejszy kontakt z pasożytami poprzez wykrywanie swoistych przeciwciał wywołanych zarażeniem. Ponieważ przeciwciała są zazwyczaj wytwarzane jakiś czas po początkowej inwazji i utrzymują się po usunięciu 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 odbywa się przy użyciu znakowanych przeciwciał wtórnych. Wiele z tych testów, choć nie wszystkie, umożliwia ilościowe określenie poziomu przeciwciał (miano), np. w badaniach kontrolnych podczas przebiegu zarażenia lub leczenia.

SKRÓTY

CME	monocytna erlichioza psów
DFA	bezpośredni test immunofluorescencji
DTM	podłoże testowe dla dermatofitów
EIA	test immunologiczny oparty na reakcji antygen-przeciwciało, w którym wykorzystywany jest enzym jako znacznik
ELISA	test immunoenzymatyczny służący do wykrywania obecności określonych antygenów lub przeciwciał w badanej próbce
EPG	liczba jaj na gram
FECRT	test redukcji liczby jaj w kale
ICT	immunochromatograficzny test paskowy
IFAT	pośredni test immunofluorescencji
KOH	roztwór wodorotlenku potasu
L1	larwy pierwszego stadium
L3	larwy trzeciego stadium
LAMP	Loop-Mediated Isothermal Amplification - izotermiczna amplifikacja materiału genetycznego
LPG	liczba larw na gram
MIFC	metoda koncentracji z użyciem mertiolatu-jodu-formaldehydu
OPG	liczba oocyst na gram
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy
SAF	octan sodu-kwas octowy-formalina
SAFC	metoda koncentracji z użyciem octanu sodu-kwasu octowego-formaliny

PRZYDATNE LINKI

Pomiary za pomocą mikroskopu:

www.youtube.com/watch?v=_CkcYrns-6I
www.youtube.com/watch?v=_eu9OrNM_wY
www.youtube.com/watch?v=GdRLPAo_j1Y
parazytologia.cvm.ncsu.edu/vmp930/m_keys.html

Zmodyfikowana metoda McMastera liczenia jaj:

youtu.be/rkSGe-L4Sec

Fotografie stadiów pasożytniczych można znaleźć na następujących stronach:

www.parasite.org.au/para-site/contents/toc.html
www.ksvdl.org/resources/news/diagnostic_insights_for_technicians/sierpnia2019/pasozyty-jelitowe-pt1.html
www.ncvetp.org/parasite-image-database.html
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