

4

Parazitológiai diagnózis macskákban, kutyákban és lófélékben

ESCCAP (European Scientific Counsel Companion Animal Parasites
/Európai Társállatok Parazitáival foglalkozó Tudományos Tanácsadó Egyesület/)
4. számú Irányelv (GL4), 1. kiadás – 2022. november

ESCCAP
Malvern Hills Science Park, Geraldine Road, Malvern,
Worcestershire, WR14 3SZ, Egyesült Királyság

Első kiadás közölve: ESCCAP által 2022-ben

© ESCCAP 2022

Minden jog fenntartva

Ezt a kiadványt azzal a feltétellel bocsátjuk rendelkezésre, hogy annak részben vagy egészben, bármilyen formában vagy bármilyen módon, elektronikus, mechanikus, fénymásolt formában, kép- vagy hangfelvétel formájában vagy egyéb módon történő terjesztése vagy sokszorosítása csak az ESCCAP előzetes írásbeli engedélyével lehetséges.

Ez a kiadvány az ESCCAP előzetes írásbeli engedélye nélkül kizárólag abban a borítóban terjeszthető, amelyben első alkalommal megjelent.

E kiadvány bejegyzésre került a Brit Nemzeti Könyvtár katalógusába.

ISBN: 978-1-913757-57-1

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	6
Mintavétel, és a diagnosztikai anyag szállítása és tárolása	7
Egy parazitológiai laboratórium szabványos berendezése	8
Tápoldatok és oldatok	10
1. BÉLSÁRVIZSGÁLAT	10
1.1. Általános információk	10
1.2. Koproszkópiás módszerek	12
1.2.1. Ülepítés vízben	12
1.2.2. Felszándúsítás centrifugálással	13
1.2.3. Kombinált ülepítéses – felszándúsítós módszer	14
1.2.4. Módosított McMaster-féle peteszámlálási technika	15
1.2.5. Mini-FLOTAC	16
1.2.6. Kettős centrifugálási technika <i>Anaplocephala</i> peték ló bélsárból történő kimutatására	17
1.2.7. SAFC technika	18
1.2.8. Telemann-Rivas módszer	19
1.2.9. Baermann technika	19
1.2.10. Lárvatenyésztés bélsárból	20
1.2.11. Bélsárkenet, festés	20
1.2.12. Ragasztószalag-módszer	21
1.2.13. Bélsárvizsgálatra való kereskedelmi vizsgálókittek/inPouch® TF Feline/bélsár antigén tesztek	21

4 Parazitológiai diagnózis macskákban, kutyákban és lófélékben

ESCCAP (European Scientific Counsel Companion Animal Parasites
/Európai Társállatok Parazitáival foglalkozó Tudományos Tanácsadó Egyesület/)
4. számú Irányelv (GL4), 1. kiadás – 2022. november

2. SZEROLÓGIA	23
2.1. Általános információ	23
2.2. Ellenanyag-kimutatás kvantitatív módszerei	26
2.2.1. Indirekt immunfluoreszcenciás ellenanyag-teszt (IFAT)	26
2.2.2. Enzimkapcsolt immunszorbens assay (ELISA)	26
2.3. Kvalitatív módszerek	27
2.3.1. Gyorsteszt-rendszerek	27
3. A BŐR VIZSGÁLATA	27
3.1. Általános információk	27
3.2. Bolhafésű	27
3.3. Bőrkaparékok	28
3.4. Ragasztószalag-módszer	29
3.5. Trichogram	30
3.6. Atka kimutatása fülzsírból	30
3.7. Biomolekuláris technikák	30

4. EGYÉB	30
4.1. Vérkenetek	30
4.1.1. Általános információk	30
4.1.2. A vérkeneteből kimutatható kórokozók	31
4.2. Buffy coat módszer	32
4.3. Vékonytű-aspirátumok	32
4.3.1. Általános információk	32
4.3.2. A vékonytű-aspirátumokból kimutatható kórokozók	33
4.4. Mikrofiláriák kimutatása és azonosítása	33
4.4.1. Általános információk	33
4.4.2. Knott-féle teszt	34
4.4.3. Módosított Knott-féle teszt	34
4.4.4. Szűréses módszer (Difil-Test®)	34
4.4.5. Savas foszfatáz festés	35
4.4.6. Mikrofilária méretek	35
4.5. Biomolekuláris kimutatási és differenciálási módszerek: polimeráz lánreakció (PCR) és a hurokközvetített izotermikus amplifikáció (LAMP)	36
4.5.1. Általános információk	36
4.5.2. Specifikus információk	37
4.6. Dermatophyton kimutatás	40
4.6.1. Általános információk	40
4.6.2. Szórszálak közvetlen vizsgálata	40
4.6.3. Wood lámpás vizsgálat	40
4.6.4. Gombatenyésztés	40

FÜGGELÉK

1. FÜGGELÉK – HÁTTÉR	41
2. FÜGGELÉK – SZÓTÁR, RÖVIDÍTÉSEK ÉS HASZNOS HIVATKOZÁSOK	42

BEVEZETÉS

Egy fertőzés és/vagy betegség korrekt diagnózisa a megfelelő kezelés és hatékony védekezés előfeltétele, és a parazitás megbetegedések diagnózisa sem képez ez alól kivételt. A klinikai tüneteken, hematológián, vérkémián, kórtanon vagy kórszövettanon alapuló tentatív diagnózis segíthet a specifikus diagnosztikai módszer kiválasztásában a paraziták közvetlen vagy közvetett (vagy a kettő kombinációja) kimutatásához.

A szabványos eljárások és jó laboratóriumi gyakorlat kialakítása alapvető jelentőségű az állategészségügyi szakember számára. Akár egy parazitás betegségnek megfelelő tüneteket mutató kedvencállat fertőzése diagnózisának megerősítéséről, akár egy szélesebb körű, megelőzési vagy védekezési program keretében történő társállat-szűrésről van szó, pontos és megbízható módszerekre van szükség.

Közvetlen kimutatás

A parazitológiai laboratóriumi módszerek gyakran teszik lehetővé a paraziták közvetlen alaktani kimutatását, vagy a parazitamolekulák, így parazita antigének vagy DNS közvetlen kimutatását.

A paraziták közvetlen kimutatása a következő módokon lehetséges:

- alaktani azonosítással (makroszkópos, mikroszkópos, közvetlenül vagy dúsítást követően, festés után vagy specifikus ellenanyagok hozzákötését követően, kórokozó gombákra történő tenyésztést követően);
- a parazita antigének immundiagnosztikai kimutatásával;
- a parazita DNS biomolekuláris kimutatásával;
- a parazita óriásmolekulák tömegspektrometriás kimutatásával; és
- az egyes parazita stádiumok szaporodását vagy kifejlődését szolgáló in vitro tenyésztésével.

A korlátozó tényezők közé tartoznak az alábbiak:

- szabálytalan parazita-eloszlás és -kiválasztás;
- nem megfelelő mintavétel, tárolás és szállítás;
- korlátozottan rendelkezésre álló genetikai/proteomikai információ; és
- egyes esetekben a gyenge érzékenység vagy specifitás.

Figyelmeztetés: a DNS vagy antigén biomolekuláris kimutatása alkalmanként fals pozitív eredményhez vezethet, mert a fertőzés megszűnése után ezek még egy ideig jelen lehetnek.

Közvetett kimutatás

Egyes parazitás megbetegedések esetén a közvetlen kimutatás nem mindig lehetséges. Ez lehet akár a testben való helyeződésük miatt, azért, mert a parazita nagyon kis számban (sűrűségben) van jelen, és ezért közvetlen módszerekkel megbízhatóan nem lehet őket kimutatni, vagy azért, mert a módszer technikailag túl munkaigényes, vagy invazív a páciens számára. Ezekben az esetekben a közvetett kimutatás a parazitákra adott immunreakciók diagnosztizálásával, nagy segítség lehet. A közvetett kimutatási módszerek közé tartozik a specifikus ellenanyagok kimutatása különböző szubsztrátokból.

A korlátozó tényezők közé tartoznak az alábbiak:

- változó és késleltetett immunreakciók (a fertőzést követő időponttól, intenzitástól, helyeződéstől és a reakció típusától függően);
- az ellenanyagok perzisztenciája és kereszt-reaktivitása; és
- egyes esetekben gyenge érzékenység vagy specifitás.

Az ellenanyagok változó hosszúságú ideig perzisztálhatnak a fertőzés megszűnése után, ezért a folyamatban lévő fertőzések kimutatására való alkalmasságuk korlátozott.

A jelen útmutató olyan állategészségügyi szakemberek számára készült, akik rutin diagnosztikai eljárásokat alkalmaznak gyakorlatukban a parazitás fertőzések diagnosztizálására, és azok számára, akik rendszeresen küldenek mintákat külső laboratóriumokba.

Az útmutató fejezetekre oszlik a vizsgálandó anyag és a rendelkezésre álló módszerek alapján. Tartalmaz általános információkat a mintavételről, -kezelésről és -tartósításról is.

MINTAVÉTEL, ÉS A DIAGNOSZTIKAI ANYAG SZÁLLÍTÁSA ÉS TÁROLÁSA

Általános szempontok

A diagnosztikai vizsgálat pontossága nagymértékben függ a korrekt mintavételtől és a vizsgálati anyagok megfelelő tárolásától és szállításától. Minden mintát megfelelő módon fel kell címkézni (beleértve a páciens és a tulajdonos azonosítását a mintavétel napjával együtt), szorosan lezárt, törhetetlen tárolóedényben kell szállítani (amelyet a potenciálisan fertőző anyag szállítására vonatkozó nemzeti és nemzetközi szabályozásnak megfelelően jelöltek meg), gyorsan a laboratóriumba kell szállítani és helyesen kitöltött kísérőiratot kell hozzá mel-lékelni, amely a laboratórium dolgozói számára lehetővé teszi a minta besorolását és a kívánt vizsgálat elvégzését. A vér/szérummintákat csavaros tetejű, szivárgásbiztos műanyag csőben kell beküldeni, hűtött csomagban, egynapos futáros szállítással. A csövet egy zárható zacskóba/mintavételi zacskóba kell helyezni arra az esetre, ha a cső megrepedne vagy eltörne, védőanyaggal kell körbevenni, és biztonságos szállítódobozba helyezni.

Sok laboratórium specifikus útmutatókat biztosít a mintavételre és szállításra. Ezen kívül az általános és különös biztonsági óvintézkedéseket meg kell tenni, és a toxikus anyagokat vagy fertőző anyagokat megfelelő módon meg kell semmisíteni.

Mintavétel és tárolás

1. Bélsár

A bélsármintákat a végbélből kell gyűjteni, vagy közvetlenül bélsárürítés után, hogy megakadályozzuk annak szennyeződését a környezetből származó anyagokkal, mert azokban szabadon élő nematodák lehetnek. Az elemzést friss mintából, vagy 4 °C-on történő tárolást követően kell végezni, mert egyes férgek és coccidium-oociszták tovább fejlődhetnek, amivel megváltoztatják diagnosztikai jellemzőiket. A régebbi bélsármintákban a tüdőféreg első stádiumú lárvái (L1) lehetséges, hogy nem lesznek eléggé életképesek, ha a Baermann technika-val vizsgálják a vándorlást. A *Strongyloides* spp. lárvái, illetve a strongylidák lehetséges, hogy órák, illetve napok alatt kikelnek a petéikből és a minták fals negatív eredményt adnak a petevizsgálat alkalmával. A fonálféregpeték továbbfejlődésének megakadályozása érdekében a mintákat és a tárolóedényeket szorosan zárva, és a lehető legkevesebb oxigénen kell tárolni.

Az állatorvosi parazitológiában a bélsármintákat általában nem tárolják hosszú ideig vizsgálat előtt. A hosszabb távú tárolás tartósítást igényelhet, pl. vegyi anyagokkal (lásd a tápfolyadékokról szóló szakirodalmat), vagy -20°C-on történő fagyasztással. Ezekben az esetekben meg kell jegyezni, hogy egyes parazita stádiumok, főleg a fonálféreg lárvák, így a strongylidák, és más, vékonyburkú féregpeték tartósított, vagy előzetesen fagyasztott mintából nem mutathatók ki megbízhatóan.

2. Szérum

A legtöbb esetben az antigének vagy ellenanyagok azonosítására és mennyiségi meghatározására szolgáló szérummintákat perifériás vérből vesznek. Ideális körülmények között a vérnek szabadon kell folynia az üvegbe; ez megakadályozza a hemolízist. Ha lehetséges, legalább 5 ml vért kell levenni, hogy a teljes vizsgálati panel számára 2 ml szérummennyiséget tudjanak előállítani. A legalább 20 perc véralvadást követően a szérumot centrifugálással elválasztják az alvadéktól, egy új csőbe helyezik át, és lehetőleg azonnal szállítják is. Szükség esetén a szérum 4°C-on maximum 24 óráig tárolható szállítás előtt. Ha hosszabban szükséges tárolni, az -20°C-on történjék. Megjegyzendő, hogy a teljes véralvadás előtti centrifugálás hemolízist okozhat, amely megzavarhatja a tesztet; ha pedig túl hosszú ideig hagyják a vért állni, az mikrobanövekedéshez vezethet, aminek következtében a minta bomlik. Ha szérum nem áll rendelkezésre, egyes vizsgálatok számára plazma is használható; ezt a vizsgálat előtt a laboratóriummal egyeztetni kell.

3. Teljes vér

A paraziták vagy parazita DNS teljes vérből történő mikroszkópos vagy molekuláris kimutatásához (közvetlenül, vagy dúsítást követően, pl. a Knott-féle tesztben), véralvadást gátlót tartalmazó mintavételi csöveket (EDTA, Li-heparin) kell használni. A teljesvér-minták 4°C-on tárolhatók, legfeljebb 4 napig. A minták -20°C-on történő fagyasztása megkönnyíti a hosszabb tárolást, és még mindig lehetővé teszi a DNS kimutatását, de a parazita stádiumok izolálása és azonosítása korlátozottan lehetséges.

4. Az izolált paraziták

Az élő ízeltlábúakat (és a bőrkaparákókat) szorosan zárt tárolóedényben kell tartani, hogy megakadályozzák a szökésüket. Nedves papírányagot lehet melléjük tenni a kiszáradás megelőzése érdekében. A további vizsgálathoz 70%-os etilalkoholban kell őket fixálni. A bélsárból, hányadékból, bőrről származó parazitákat külön-külön kell megmintázni, és vagy fiziológiás sóoldatban (rövid ideig), vagy 70%-os etilalkoholban kell tárolni őket.

EGY PARAZITOLÓGIAI LABORATÓRIUM SZABVÁNYOS FELSZERELÉSE

Mivel a mikroszkópia a minták vizsgálatának szabványos tech-nikája, egy jól karbantartott fénymikroszkóp nélkülözhetetlen a parazitológiai diagnózishoz. Mikroszkópos méretek gyakran szükségesek az azonosításhoz, ezért olyan berendezés szükséges, amellyel pontos, szabványos méretek vehetőek fel. A pusztán szemmel látható objektumok esetén általában egy sztereomikroszkóp a legjobb választás a részletes vizsgálathoz (lásd. 1. táblázat).

1. táblázat: Ajánlott nagyítások és a parazitastádium azonosításának kritériumai

Stádiumok	A nagyítás mértéke*
Féregpeték és -lárva, kis ízeltlábúak	Kis nagyítás a szűréshez: 40–100x; részletekhez: 400x
Egysejtűek	Közepes – nagy nagyítás: 400 – 650x Vérkenetekhez, a bélsárban lévő nagyon kis objektumokhoz: 1000x (olajos immerziós)
Nagy ízeltlábúak, kifejlett férgek (vagy azok testrészei, pl. proglottisok)	Kis nagyítás (sztereomikroszkóp)

* Megjegyzendő, hogy a nagyítást az okulár nagyítása (általában 8 -10x) és az objektív nagyítása alapján számítják ki egy fénymikroszkópnál, míg a sztereomikroszkópok csak egy nagyító lencse-készlettel rendelkeznek.

A különböző tulajdonságokat így a méretet, alakot, színt és a felület, vagy a burok alakját, valamint a belső részeket kell tekintetbe venni, amikor mikroszkóp alatt parazita stádiumokat diagnosztizálnak. Fonálféreg lárva (tüdőféreg, lovak strongylidái, kutyák és macskák kampósfergei vagy *Strongyloides* spp.) azonosításakor a mobilitást is meg kell vizsgálni, ha azok élnek. Ezen kívül specifikus struktúrák, például az elülső testfél alakja, a nyelőcső és a farki vég segíthet az azonosításban.

A parazitológiai diagnosztikai laboratóriumok további felszerelésesei közé tartoznak általában az alábbiak:

(A) koproszkópiához:

- mérleg
- dörzscsésze és törő
- műanyag tárolóedény és spatula, nyelvlapoc, műanyag kanál vagy hasonló
- műanyagbot vagy karcsú spatula
- vattatampon
- műanyag rázópalack
- centrifugacsövek (12-15 ml; 50 ml)
- asztali centrifuga kilendülő rotorral
- tölcséres pohár (ún. csúcsos fenekű ülepítő pohár, 250 ml), vagy egyéb, ülepítésre alkalmas edény
- tölcsér
- 0,5 – 1 mm-es résméretű teaszűrők (felszindúsítás, vagy ülepítés – felszindúsítás számára) és 0,3 mm-es (ülepítéshez)
- dróthurok (megfelelő szögben hajlított, körülbelül 6 mm-es átmérőjű) vagy egyéb eszköz (pl. csiszolt végű üvegbot) a cseppek eltávolításához a felszindúsító oldat felületéről
- tárgylemezek
- fedőlemezek
- immerziós olaj
- Petri-csésze (üveg vagy műanyag, rácsozott fenékkal a könnyebb mikroszkópos vizsgálat érdekében)
- metilénkék oldat (tinta)
- vízpumpa (vagy 10 – 20 ml-es pipetták)
- pamutgézlap (20 x 20 cm)
- műanyag vagy üveg Pasteur pipetták
- féregpete- vagy oocysta-számláló kamra (pl. McMaster, FLO-TAC)

Ezen kívül a Baermann technikához:

- tölcsérrögztítő felszerelés
- gumicső és csőelzáró csipesz
- kalibrált mérőhengerek (100 ml-es és nagyobb)
- mágneses keverő és keverőmágnes

Bélsártenyésztéshez ezen kívül:

- 500 ml-es lekvárosüveg (vagy hasonló)
- Petri-csésze, amelynek átmérője kicsit nagyobb, mint az üvegedényé
- tenyésztőkamra 25°C-os, sötét
- autoklávozott fűrészpor, szén, vagy vermikulit (vagy steril tőzegmoha)

(B) hematológiához és szerológiához

- Eltérő felszerelés kell a formátumtól és a leolvasási módszertől függően, pl. fluoreszcens feltétellel ellátott mikroszkóp az IFAT-hoz, vagy lemezolvasó az ELISÁ-hoz, stb., emellett laboratóriumi pipetták és festőfelszerelés.

(C) bőrkaparékokhoz:

- 10%-os KOH oldat vagy laktofenol
- ásványolaj vagy glicerin

TÁPOLDATOK ÉS OLDATOK

- 0,9%-NaCl (fiziológiás sóoldat)
- felszindúsító folyadék (lásd. 2. táblázat):
- Lugol oldat (10 g káliumjodid, 5 g jód 200 ml desztillált vízhez.)
- dietiléter¹
- SAF (nátrium-acetát – ecetsav – formalin): 4,5 mg nátriumacetát, 6,0 ml tömény ecetsav, 12,0 ml formalin
Ziehl-Neelsen festék: karbolfuxin, malachitzöld, savas alkohol (15 ml HCl /37%/ 485 ml etanolban), metanol (használjon festőkészletet)

¹ étert, formalint vagy mertiolát-jód-formaldehidet (higanyt tartalmaz) használnak a SAF dúsító technikához (lásd 1.2.7). a Telemann-Rivas módszerhez (lásd 1.2.8), és/vagy a MIFC (mertiolát-jód-formaldehides dúsítás) technikához (a jelen útmutatóban nem szerepel). A választandó módszer kiválasztását, egyebek között, az oldatokra vonatkozó különböző szabványos laboratóriumi biztonsági előírások határozzák meg.

2. táblázat: Koprozskópiás parazitológiai vizsgálathoz való felszindúsító oldatok összetétele és tulajdonságai (válogatás)

Felszindúsító oldat	Mennyiség	A víz térfogata (mennyisége)	Fajsúly*
Telített sóoldat (NaCl)	340–360 g NaCl	1000 ml	~1,18–1,2
Cinkklorid – sóoldat (ZnCl ₂ + NaCl)	275 g ZnCl ₂ + 262 g NaCl	1000 ml	1,3
Cinkklorid oldat (ZnCl ₂)	440 g ZnCl ₂	1000 ml	1,3
Cinkklorid oldat (ZnCl ₂)	660 g ZnCl ₂	1000 ml	1,45
Cinkszulfát oldat (ZnSO ₄)	760 g ZnSO ₄	1000 ml	1,3
Magnéziumszulfát oldat (MgSO ₄)	350 g MgSO ₄	1000 ml	1,28
Szaharóz oldat**	550 g szaharóz	440 ml	1,28
Telített sóoldat 50% glukózzal	375 g glukóz + 250 g NaCl	1000 ml-ig	1,27
Szaharóz – sóoldat**	50 g szaharóz + 100 ml telített sóoldat		1,33

* szobahőmérsékleten, **hidrométerrel (sűrűségmérővel)** mérendő

** adjon 0,7 ml formalint (37%) vagy 1 g kristályos fenolt minden 100 ml-hez a baktérium- és gombanövekedés megakadályozására, és tárolja 4°C-on.

1. BÉLSÁRVIZSGÁLATOK

1.1. Általános információk

Makroszkópos vizsgálat

Feldolgozás előtt minden bélsármintát makroszkóposan meg kell vizsgálni, vannak-e benne kiürített férgek (pl. orsóférgesek, galandféreg ízek, hegyesfarkú férgek), vagy vér (az izolált paraziták tartósítása tekintetében lásd a Bevezetést).

Mikroszkópos vizsgálat

Lehetővé teszi a kiürített peték, petecsomók, lárvák, oociszták, trophozoiták (csak friss bélsárból, amely tartósító oldattal nem lett összekeverve), és ciszták kimutatását.

A féregpetéket és az egysejtűek (oo)cisztáit az alábbiak alapján lehet megkülönböztetni:

- alak: kerek, ovális, sokszögletű, citrom alakú
- méret: nagy = megközelítőleg 80 – 150 (-300) µm (pl. *Fasciola hepatica* peték, *Dipylidium caninum* petecsomók), közepes = megközelítőleg 60 – 80 (-120) µm (Ancylostomatidae peték, Strongylidae peték), kicsi = körülbelül 40 – 60 µm (pl. *Strongyloides* peték, Taeniidae peték) és nagyon kicsi = körülbelül <40 µm (pl. coccidium és *Cryptosporidium* oociszták, *Giardia* ciszták;
- burok/fal: vastagság, felület (azaz: sima, recés, fogazott), szín, meghatározó jellemzők, például csúcsi kupak vagy mikrobolyhok; és
- tartalom (a bélsárürítés óta eltelt időhöz képest): szegmentálatlan sejtek, blasztomérák, embrió vagy lárva a féregpetében, sporociszták, sporozoiták és egyéb struktúrák a coccidiumok és egyéb egysejtűek esetében.

A fonálféreg lárvákat teljes hosszuk, a kutikuláris burok, az emésztőtraktus és feji, valamint farki végük alaktana alapján különböztethetjük meg. A szabad fonálféreg lárváktól a járulékos burkok hiánya alapján különíthetők el. A szabadonélő fonálféreg lárváknak jól megkülönböztethető szájnílásuk van, és színük sötétebb, mint a fertőző lárvastádiumoké; rendelkezhetnek nyelőcsőtágulattal és számos egyéb sajátos tulajdonságuk is van.

A működési elvtől függően az elkülönítés különböző koproszkópiás módszerekkel történik: közvetlen eljárásokkal, dúsítás nélkül (pl. bélsárkenetek festés nélkül, a mozgó stádiumok kimutatása, vagy megfestett kenetek), vagy ellenkezőleg, a parazitastádiumok dúsítására szolgáló módszerekkel:

- ülepítéssel
- felszindúsítással (centrifugálással vagy anélkül)
- kombinált ülepítéssel – felszindúsítással
- Baermann technikával
- specifikus dúsítási módszerekkel, így pl. a Telemann-Rivas eljárással, SAFC-cal, stb.

A koproszkópiás vizsgálatok megbízhatósága

A felsorolt módszerek gyakran mutatják ki különböző paraziták sorát; azonban nincs egyetlen olyan módszer, amely egyformán alkalmas a jelen lévő összes parazita és stádium kimutatására. A választandó módszert a várható parazita stádiumok alapján kell megválasztani, és többféle módszerre lesz szükség ahhoz, hogy a lehetséges fertőzések teljes skáláját sikerüljön lefedni.

Általánosságban, minél nagyobb a bélsár mennyisége, annál valószínűbb, hogy parazita stádiumokat lehet kimutatni (jobb érzékenység, azaz kevesebb fals negatív). Azonban a vizsgált bélsár mennyiségét a feldolgozandó minta szennyezettségének mértéke korlátozza: a túl sok törmelék csökkenti az érzékenységet (azaz több lesz a fals negatív), és a specifitást is.

Mivel a nagyobb mennyiségű bélsár **kombinált ülepítéses – felszindúsításos eljárással** dolgozható fel, az érzékenységi szint jobb, különösen akkor, ha egyébként kisebb mennyiséget ürít az állat. Ezért ez a rutinvizsgálatok esetében **kívánatos módszer**. A felszindúsításhoz és ülepítéshez hasonlóan ez a módszer félkvantitatívnak tekintendő, ha konzisztens módon és meghatározott bélsárminta-mennyiséggel végzik el. A centrifugálással elősegített aktív felszindúsítás előnyösebb a passzív felszindúsításnál. Hasonlóképpen a felszindúsító oldat megválasztása, és így az adott oldat fajsúlya alapvető, mert egyes paraziták nem mutathatók ki nagy fajsúlyú oldattal, míg mások kis fajsúlyúval.

A koproszkópiás módszerek érzékenységét az alábbi tényezők korlátozzák:

- A fertőzésnek patens fázisban kell lennie, azaz különböző stádiumoknak (peték, lárvák, (oo)ciszták) kell az anyagban jelen lenniük egy fennálló fertőzést jelezve, ahol szaporodás/ivadékok kialakulása is folyik. A pre-vagy posztpatens fertőzés a bélsár mikroszkópos vizsgálatával nem mutatható ki.
- Nem minden parazita/stádium ürül folyamatosan; egyes állatoktól több minta (pl. 3 egymást követő napon) vizsgálata, vagy egy ismételt mintavétel lehet szükséges.
- Gyakran az enyhébb fertőzések csak kevés kimutatható stádiumot produkálnak. A bélsár mennyiségének a növelése vagy állatonként többféle vizsgálat elvégzése, ahogy azt fentebb már részleteztük, előnyös lehet.

A hasmenés felhígíthatja a mintákat, mert megnő a bélsár térfogata, ezért csökkenti az érzékenységet. Ez elkerülhető, ha kombinált ülepitéses-felszindúsításos eljárást alkalmaznak, amely a folyékony bélsarat ülepitéssel besűríti, mielőtt felszindúsítással dúsítaná.

A bélsár mikroszkópos vizsgálatának csekély érzékenysége következtében a **negatív eredményeket** óvatosan kell kezelni. Az a tény, hogy parazita stádiumokat nem sikerült a bélsárban kimutatni, nem zárja ki a parazitás fertőzést, ha a jellegzetes klinikai tünetek fennállnak (pl. a fertőzés még mindig a prepatens stádiumban van). Az ilyen esetek további vizsgálatot igényelnek. Egyes esetekben alternatív módszereket is lehet alkalmazni (pl. antigén- vagy ellenanyag-kimutatást).

Másrészt a parazita stádiumok közvetlen kimutatásának általában jó a specifitása, és ritkák a fals pozitív eredmények, ha a vizsgálatot korrekt módon végezték. Fals pozitív eredményeket okozhat a kutyák koprofágiája (pl. kutyafélék bélsármintáiban *Toxocara cati* (syn. *mystax*) vagy *Toxoplasma gondii* bélpaszszázát figyelték meg). Ezért a tulajdonosoknak fontos tanácsolni, hogy próbálják ezt a viselkedést megakadályozni, főleg a bélsárminta-vételét megelőző napokban, hogy a kiürülő parazita stádiumok okozta fals pozitív eredményeket elkerüljék. Az antigén-kimutatás, amely kereskedelmileg rendelkezésre áll egyes kutya fonálféregfajoknál, ezt a problémát megoldhatja.

Annak érdekében, hogy az eredményeket klinikai összefüggésükben értelmezhessék, a parazitológiai leleteket egyéb diagnosztikai leletekkel együttesen kell kiértékelni (pl. klinikai vizsgálat, hematológia, stb.) és zoonotikus parazita stádiumok esetén ezek emberi egészségre gyakorolt hatását is tekintetbe kell venni.

1.2. Koproszkópiás (bélsárvizsgálati) módszerek

1.2.1. Ülepítés vízben

Alapelv:

Ezzel a módszerrel az aránylag nagyobb fajsúlyú parazita stádiumok (pl. trematoda peték, főleg a *Fasciola hepatica* és az *Opisthorchis felineus*, de az *Eimeria leuckarti* oocisztái is) és a nehéz bélsár-részecskék gyorsan leülepednek a vízben. Ismételt ülepitéssel és a felülúszó dekantálásával a könnyebb bélsárrészecskék eltávolíthatóak. Ezt a módszert általában májmételey-peték lóbélsárból vagy macskabélsárból történő kimutatására használják.

A szükséges bélsármennyiség:

5-10 g bélsár (az érzékenységet fokozza az ismételt mintavétel).

Procedure:

1. Keverje el a bélsármintát vízben spatulával, amíg homogén oldatot kap. Ha az állaga nagyon kemény, keverje össze vízzel, mielőtt a dörzscsészét és a mozsártörőt használná.
2. Öntse a bélsár/víz szuszpenziót egy teaszűrőn át (hálóméret 0,3 mm) egy megfelelő edénybe (csúcsos pohárba vagy hasonlóba), és öblítse le a szűrőt erős vízszugárral egy műanyag spriccflasskából, amíg a csúcsos pohár meg nem telik.
3. Hagyja állni 3 percig.
4. Egy megszakítás nélküli mozdulattal öntse le a felülúszót (vagy szívja le vízszívó pumpával)..
5. Töltse fel újra a csúcsos poharat vízzel.
6. Ismétlje meg összesen háromszor az ülepitést. Az utolsó felülúszónak csaknem teljesen átlátszónak kell lennie.
7. Adjon 1-3 csepp metilénkék (tintát) az utolsó üledékhez, és keverje össze alaposan körkörös mozdulatokkal.
8. Öntse a teljes üledéket egy osztásos Petri-csészébe.
9. Vizsgálja meg az üledéket mikroszkóp vagy sztereomikroszkóp alatt (20 – 50x-es nagyítás).

A *Fasciola*-peték lóbélsárból történő szabványos kimutatására a kereskedelemben rendelkezésre áll a FlukeFinder® berendezés.

1.2.2. Felszindúsítás centrifugálással

Alapelv:

A felszindúsítást a felszindúsító oldaténál kisebb fajsúlyú féregpeték, egysejtű ciszták és oociszták kimutatása érdekében végzik. Egy ismert sűrűségű felszindúsító oldattal kevert bélsár-szuszpenzióban a könnyebb parazita stádiumok a felszínen gyűlnek össze, míg a nehezebb részecskék lesüllyednek, vagy a szuszpenzióban maradnak.

Számos különböző felszindúsító oldalt alkalmazható (lásd. 2. táblázat). A kiválasztott oldatot a vizsgálat előtt legalább egy nappal el kell készíteni és a fajsúlyt hidrométerrel (fajsúlymérő) ellenőrizni.

Telített nátriumklorid oldattal a *Strongyloides*- (friss bélsárból), strongylidák, ascaridák, oxyuridák petéi, coccidium-oociszták és egyéb egysejtű-ciszták mutathatók ki. Ezzel a módszerrel a parazita stádiumok kisebb fajsúlyok következtében a nagyobb fajsúlyú sóoldat felszínén lebegnek. A *Trichuris*, *Capillaria*, *Taeniidae*, *Spiruroidea* vagy *Oxyuridae* peték és az *Eimeria leuckartii* oociszták kimutatása bizonytalan lehet, mert azok nagyobb fajsúlyú felszindúsító oldatot igényelnek. A *Giardia* ciszták deformálódnak, míg a trematoda peték nem kimutathatóak. Ha a hipertóniás sóoldatban sokáig tárolják a féregpetéket vagy különböző egysejtűstádiumokat, az az egyes stádiumok deformálódásához vezet, ami bonyolítja a diagnózist. A felszindúsított készítményekben időnként található fonálféreglárvák, azonban ezek általában gyorsan leülepsznek, és az alaktani diagnózis ezzel szinte lehetetlenné válik.

A fentebb említett stádiumokon kívül *Trichuris*, *Capillaria*, *Taeniidae* és spirurida peték és *Giardia* ciszták (deformáltan) mutathatók ki cinkszulfát, cinkklorid, magnéziumszulfát vagy szacharóz/szacharóz-sóoldatokkal. A cinket (nehézfém) tar-talmazó használt oldatokat speciális hulladékban kell megsemmisíteni. A szabványos felszindúsítási technikának számos változata lehetséges, ezek közül párat alább ismertetünk.

A szükséges bélsárminta:

Kisállatok: 4-5-g (nagyjából egy dió mérete), lehetőleg 3 egymást követő napon gyűjtve, a poolozott minta almintájaként vizsgálva; lovaknál maximum 20 g bélsár.

Procedure:

1. Készítse elő a felszindúsító oldatot szobahőmérsékleten és ellenőrizze a fajsúlyát fajsúlymérővel (ha ez nem lehetséges, addig keverje, míg a só csaknem teljes mértékben feloldódik).
2. Keverje össze a bélsármintát 10-szeres mennyiségű felszindúsító oldattal egy homogén oldattá. Ha a bélsár kemény, áztassa elő a mintát vízben.
3. Öntse át a bélsársuszpenziót egy teaszűrőn egy tölcser segítségével két centrifugacsőbe mintánként. Minden cső tetejénél maradjon 1 cm, hogy ne szennyeződjön be a centrifuga.
4. Centrifugálja a csöveket 300 x g-n 3 – 5 percig.
5. Egy dróthurokkal (vagy hasonló eszközzel) távolítson el 3-5 cseppet a szuszpenzió felszínéről, és tegye mikroszkópos tárgylemezre.
6. Fedje le a tárgylemezt fedőlemezzel, és vizsgálja meg a mintát mikroszkóppal, 40x-es nagyítással kezdve. Fókuszáljon a megfelelő optikai szintre, ehhez referenciának használja a kis légbuborékokat vagy részecskéket. A fedőlemez teljes területe megvizsgálható nagyobb nagyítással (100 – 400x). Ha a minták csupán enyhén szennyezettek, a fedőlemez nélküli vizsgálat kis nagyítással növelheti az érzékenységet, mert a peték és ciszták a cseppek konvex felületén koncentrálnak.

Számos lehetőség van a minták felületén úszó parazita stádiumok mikroszkópos vizsgálatára:

- A bélsárszuszpenzió felületéről egy megfelelő szögben meghajlított dróthurok segítségével több csepp anyag átvihető tárgylemezre és utána vizsgálható (fedőlemezzel vagy anélkül) a mikroszkóp alatt. Figyeljen oda, hogy a szuszpenzió felületén ne hatoljon át a cseppek kiemelésekor, és a hurokrészt feltétlenül tisztítsa meg a minták között (mossa le, és égesse le).
- helyezzen el egy fedőlemezt a tele centrifugacső tetején (a fedőlemeznek érintkeznie kell a felszindúsító oldat felületével) és centrifugálja úgy, hogy a fedőlemez a helyén maradjon. A fedőlemez ezután eltávolítható, egy tárgylemezre helyezhető és vizsgálható mikroszkóp alatt. A felszínen úszó parazita stádiumok a tárgylemezre kerülnek a fedőlemez aljához tapadt folyadékkal együtt. A fedőlemezzel történő centrifugálás legjobban a szacharóz oldatnál működik.
- helyezzen egy fedőlemezt a csőre centrifugálást követően (ahhoz, hogy ezt megtehesse, a csőnek teljesen tele kell lennie, hogy a szuszpenzió domború felületet képezzen), és várjon néhány percet, hogy az egyes parazitastádiumok a felületen úszhassanak.

1.2.3. Kombinált ülepitéses – felszindúsításos módszer

Ezzel a módszerrel elsők a különböző parazita-stádiumok gyűlnek össze, üledéket formálva a vízben, majd kis fajsúlyuk következtében a nehezebb fajsúlyú felszindúsító oldat tetején lebegni fognak. E kombinációs módszer előnye a nagyobb érzékenysége, mert nagyobb mennyiségű bélsár (akár 20 g) is vizsgálható.

A módszer használható mindenféle féregpete, és a legtöbb egysejtű oocisza és ciszta pontos meghatározására. A fonálféreglárvák és trematoda peték kimutatása szakértelmet igényel, mert ezek deformálódnak. Az egysejtű trophozoitákat és az amőbacisztákat ennek a módszernek az alkalmazásával nem lehet kimutatni.

A szükséges bélsármennyiség:

Kutyák és macskák esetében minimum 4-5 g bélsár (mintegy dió méret) szükséges. Egyes esetekben a kimutatás valószínűségének javítása érdekében hasznos, ha 3 egymást követő napon vesznek bélsármintát és a poolozott minta egy almintá-ját elemzik. Lovak esetében legfeljebb 20 g bélsár.

Eljárás:

1. Helyezze a mintát egy dörzscsészébe és mozsártörő segítségével alaposan keverje el vízzel.
2. Öntse a bélsár/víz szuszpenziót egy teaszűrőn át tölcser segítségével két centrifugacsőbe. Öblítse le a bélsarat a szűrőről erős vízszugárral egy műanyag spriccflaskából (az eljárás folyamán nem veszíthet anyagot).
3. Centrifugálja 8 percig, megközelítőleg 500 – 700 x g-n az ülepitéshez.
4. Öntse le egyetlen, megszakítás nélküli mozdulattal a felülúszót (vagy szívja le vízszívó pumpával), amíg maximum 5 mm üledék marad.
5. Töltse fel a csöveket felszindúsító oldattal.
6. Centrifugálja a csöveket 3-5 percig, 300 x g-n.
7. Dolgozza fel a felszindúsító technikánál leírtak szerint (lásd. 1.1.2.)

A másik lehetőség, ha centrifuga nem áll rendelkezésre, hogy összekeveri a bélsármintát vízzel és a csöveket szobahőmérsékleten hagyja 30 perc – egy óráig, leönti a felülúszót és az üledéket felszindúsító oldattal keveri össze, amíg domború felületet nem lát. Helyezzen rá egy fedőlemezt, és várjon 10-20 percig (a felszindúsító oldattól függően), helyezze a fedőlemezt egy üveg tárgylemezre és vizsgálja mikroszkóp alatt. Ez a módszer kevésbé érzékeny, mint a centrifuga-alapúak, és általában csak a nagyobb számban jelen lévő parazita stádiumokat mutatja ki.

1.2.4. A módosított McMaster peteszámoló technika

Alapelv:

A technikát féregpeték és coccidium oociszták bélsárból történő **kvantitatív** kimutatására alakították ki. Meghatározott mennyiségű bélsár úszik egy kamrában és megjelölt mezőnként végzik a számolást mikroszkóposan. A parazitastádiumok megszámlált számából kiszámítható a mennyiségük 1 g bélsárban, amit PPG-ben (pete per gramm) vagy OPG-ben (grammonkénti oociszta-szám) fejeznek ki. A peteszámolást gyakran alkalmazzák strongylida peték ló bélsárban történő kvantitatív meghatározására, de alkalmas egyéb lebegő parazitastádiumokra is. Általában telített NaCl felszindúsító oldatot használnak; nagyobb fajsúlyú felszindúsító oldatok használatával nehezebb peték mutathatók ki.

Amikor gyógyszerrezisztenciára végeznek üzemi kísérletet, ezt a technikát alkalmazzák az anthelmintikus kezelések előtt és után (bélsárpete-csökkenési teszt, FECRT). Az FECRT a kezelés hatékonyságát mérő szűrővizsgálat.

A célzott, kiválasztott kezeléssel végrehajtott védekezési programokban az PPG-számok az egyes állatok legelő-szennyezettségre gyakorolt hatásáról adnak információt, és a lovak szelektív kezelési technikái esetében a döntéshozatal alátámasztására használhatók (lásd ESCCAP 8. sz. Irányelv: A lovak gastrointestinalis parazitákkal való fertőzéseinek kezelésére és megelőzésére vonatkozó irányelvek).

A kimutathatósági korlátok (lásd lejjebb) következtében a módosított McMaster peteszámolási technika nem ajánlott állati paraziták, főleg nagyon jelentős endoparaziták (pl. *Echinococcus* spp. ragadozóknak, vagy *Parascaris* spp. lovakban) szűrésére.

A szükséges bélsármennyiség:

Legalább 4 g bélsár

Eljárás:

1. Keverjen össze legalább 4 g bélsarat körülbelül 30 ml felszindúsító oldattal egy dörzscsészében, mozsártörővel.
2. Öntse a bélsársuszpenziót egy szűrő és tölcser segítségével egy mérőhengerbe; a szűrőből a maradékot a mozsártörő segítségével nyomja át; öblítse át a dörzscsészét és a mozsártörőt felszindúsító oldattal.
3. Távolítsa el a szűrőt és a tölcserét és töltsen fel a hengert felszindúsító oldattal 60 ml-re.
4. Öntse át a szuszpenziót egy csőrös pohárba és folyamatos keveréssel, pl. mágneses keverővel alaposan keverje össze.
5. Gyorsan vegyen ki pipettával egy mintát és legalább 0,15 ml-t helyezzen a számlálólemez első rekeszébe. A számlálórácsnak teljesen tele kell lennie; légbuborékok nem lehetnek benne.
6. Keverje meg a szuszpenziót ismét, és egy második mintával töltsen fel a lemez második rekeszét.
7. Hagyja állni a lemezt 5-10 percre, hogy a peték/oociszták felúszhassanak.
8. Helyezze a számlálólemezt a mikroszkópba és a számlálórácson belül lévő összes parazitastádiumot számolja meg (40 –100x-os nagyítás).

Az PPG/OPG kiszámítása:

PPG/OPG = a megszámlált rácsmezőkből található pete/oociszta-számok (N)/ bélsár mennyisége (g) x a megszámlált rácsmező terület (cm²) x a bélsársuszpenzió térfogata (ml)/a számlálókamra magassága (cm) x a megszámlált rácsmező száma (n),

- ahol N a rácsmezőnként megszámlált átlagos pete/oociszta-szám;
- n a megszámlált rácsmező száma;
- a rácsmező alatti térfogat = a megszámlált rácsmező terület (cm²) x a számlálókamra magassága (cm).

Például:

Ha a bélsár mennyisége = 4 g és a szuszpenzió mennyisége = 60 ml és a rácsmező alatti térfogat = 0,15 ml, a technikailag legalacsonyabb kimutathatósági szint 100 PPG/OPG. Kétkamrás lemezek esetén, amikor **mindkét rácsmezőben** megszámlálják az összes petét, a technikailag legalacsonyabb kimutathatósági szint 50 PPG/OPG.

PPG/OPG =

megszámolt peték		a bélsársuszpenzió térfogata (ml)
bélsár mennyisége (g) x a rácsmező mérete (cm ²)	x	a kamra magassága (cm) x a megszámlolt rácsmezők száma

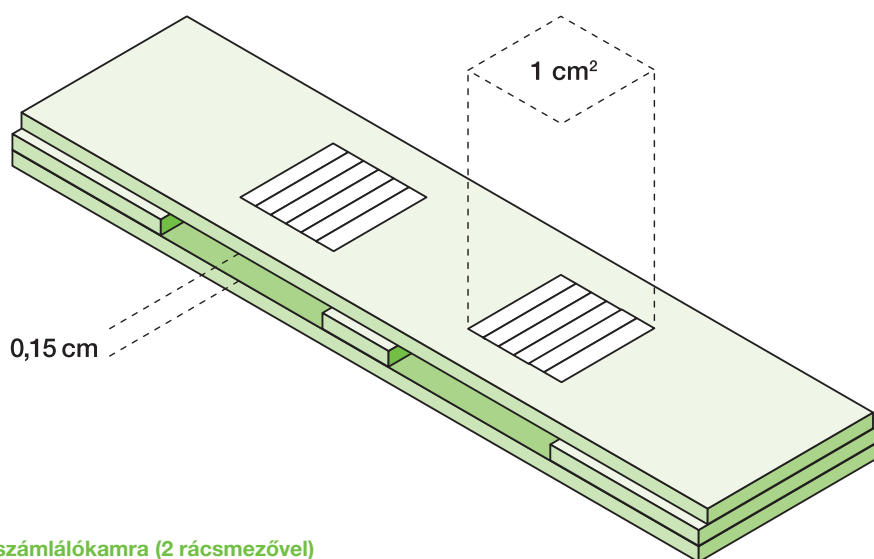
PPG/OPG = pete/oociszta bélsár grammonként

a rácsmező mérete: 1 x 1 cm = 1 cm²

a kamra magassága = 0,15 cm

A rácsmező alatti térfogat = 0,15 ml (a kamra magassága és a rácsmező mérete alapján számítva)

a megszámlolt rácsmezők száma: változhat, ezért ez is szerepel az egyenletben



1. ábra: McMaster számlálókamra (2 rácsmezővel)

1.2.5. Mini-FLOTAC

Alapelv:

A Mini-FLOTAC lehetővé teszi a gyomor-bélparaziták kimutatását és kvantifikálását, ideértve a coccidium oocisztákat, fé-regpetéket és fonálféreglárvákat is. Az eredeti FLOTAC készülék változata, de azzal a plusz előnnyel bír, hogy nem igényel centrifugálós lépést. A Mini-FLOTAC friss vagy fixált bélsár-mintákon is alkalmazható, ami lehetőséget ad arra, hogy a mintákat laboratóriumba szállításuk után napokkal vagy hetekkel dolgozzák fel. A Mini-FLOTAC érzékenysége 5 oociszta/pete/lárva/coccidium per gramm bélsár.

A Mini-FLOTAC két összetevőt egyesít: az alapot és a leolvasólemezt. Van benne két 1 ml-es felszindító kamra, amelyet bélsársuszpenzió vizsgálatára terveztek, és maximum 400x-os nagyítást tesz lehetővé.

A Fill-FLOTAC 2 és 5 egyszer használatos mintavevő eszközök, amelyek a FLOTAC és a Mini-FLOTAC készletekhez tartoznak. Egy tartályból, egy gyűjtőedényből (2 g vagy 5 g) és egy szűrőből állnak. Ezek a készletek megkönnyítik a Mini-FLOTAC technikák első négy egymást követő lépését, azaz a mintavételt (beleértve a súlymérést), a homogenizálást, a szűrést és a feltöltést. A készlet és a Mini-FLOTAC leírása alább található.

Kutyák és macskák esetében:

A szükséges bélsármennyiség:

Legalább 2 g bélsár

Eljárás:

1. Tegyén 18 ml felszindúsító oldatot a Fill-FLOTAC 2 tartályába.
2. Egy spatula segítségével a Fill-FLOTAC csúcsos gyűjtőedényét töltsen meg 2 g bélsárral és simítsa le a felületet.
3. Homogenizálja a mintát a csúcsos gyűjtőedény fel-lemozgatásával.
4. Helyezzen egy pipettahegyet a Fill-FLOTAC-ra, röviden homogenizálja, majd töltsen fel a Mini-FLOTAC műszer két kamráját, amíg kis domború folyadékfelület nem keletkezik.
5. 10 perc múlva fordítsa el a leolvasó lemezt az óramutató járásnak megfelelően, és helyezze a berendezést a készlethez adott adapterrel ellátott mikroszkóp alá. A Mini-FLOTAC legfeljebb 400x-os nagyítással vizsgálható.
6. Vizsgálja meg a mintát a Mini-FLOTAC mindkét kamrájának leolvasásával. Szorozzon meg minden megszámlált petét 5-tel, hogy a grammonkénti pete/lárva/oociszta-számot megkapja.

Megjegyzés: a Taeniidae peték megbízható kimutatása érdekében nagyobb fajsúlyú felszindúsító oldatot kell használni (lásd 2. táblázat).

Lovak esetében:

A szükséges bélsármennyiség:

Legalább 5 g bélsár

Eljárás:

1. Tegyén 45 ml felszindúsító oldatot (pl. telített NaCl-oldatot) a Fill-FLOTAC 5 tartályába.
2. Egy spatula segítségével a Fill-FLOTAC csúcsos gyűjtőedényét töltsen meg 5 g bélsárral és simítsa le a felületet.
3. Homogenizálja a mintát a csúcsos gyűjtőedény fel-lemozgatásával.
4. Helyezzen egy pipettahegyet a Fill-FLOTAC-ra, röviden homogenizálja, majd töltsen fel a Mini-FLOTAC műszer két kamráját, amíg kis domború folyadékfelület nem keletkezik.
5. 10 perc múlva fordítsa el a leolvasó lemezt az óramutató járásnak megfelelően, és helyezze a berendezést a készlethez adott adapterrel ellátott mikroszkóp alá. A Mini-FLOTAC legfeljebb 400x-os nagyítással vizsgálható.
6. Vizsgálja meg a mintát a Mini-FLOTAC mindkét kamrájának leolvasásával. Szorozzon meg minden megszámlált petét 5-tel, hogy a grammonkénti peteszámot megkapja.

1.2.6. Kettős centrifugálási technika *Anoplocephala* peték ló bélsárból történő kimutatására

A galandféreg-petek ló bélsárból történő, szabványos felszindúsítási módszert alkalmazó kimutatása csak korlátozott érzékenységű. Egy kombinált ülepítéssel – felszindúsítással eljárás, amelynek során két centrifugálási lépést alkalmaznak 15 g bélsárral, jobb kimutatási eredményt ad.

A szükséges bélsármennyiség:

15 g

Eljárás:

1. Alaposan keverje össze a bélsármintát (minimum 15 g-ot) legalább 40 ml vízzel, egy spatula segítségével.
2. Helyezze a szűrőt a 250 ml-es főzőpohárra és tegye át a bélsármintát a szűrőre. A spatulával történő préseléssel juttassa át a szűrőn az összes folyadékot.
3. A szűrletet öntse át 50 ml-es csövekbe.
4. Centrifugálja 10 percig 400 x g-n.
5. Távolítsa el a felülúszót szívópumpával vagy pipettával.
6. Oszlassa el az ott maradt pelletet 1-2 ml szacharóz-oldatban, és öntse a szuszpenziót egy 15 ml-es csőbe.
7. Töltse fel szacharóz oldattal.
8. Centrifugálja 10 percig 200 x g-n.
9. Egy dróthurok segítségével helyezzen át cseppeket a centrifugált bélsárszuszenzió (teljes) felületéről egy tárgylemezre és fedje le fedőlemezzel.
10. Mikroszkóppal vizsgálja meg a fedőlemez alatti teljes területet az 1.2.2. fejezetben leírtak szerint.

1.2.7. SAFC technika**Alapelv:**

A **SAFC** (Nátriumacetát-ecetsav-formalinós koncentráció) technika egysejtűek (pl. *Giardia*) tisztás és vegetatív stádiumainak, és egyes trematoda peték pl. *Opisthorchis* és *Metorchis* kimutatására alkalmas. Friss bélsár, előzetesen SAF oldatban tartósított mintáit használják. A minta feldolgozásával a zsíros komponenseket étterrel távolítják el, és a parazitastádiumok koncentrálnak. A SAFC-technika változatai a Telemann-Rivas módszer (lásd. 1.2.8.) és a MIFC technika (jelen útmutatóban nem szerepel).

SAF oldat:

20 ml tömény ecetsav
40 ml formaldehid (37%)
15 g nátriumacetát
1 l desztillált vízhez

A szükséges bélsármennyiség:

Legalább 1 g friss bélsár, 10 ml SAF oldatot tartalmazó mintavételi csövekbe téve.

Eljárás:

1. Rázza fel a bélsarat és SAF oldatot tartalmazó mintavételi csövet.
2. Öntse a szuszpenzió felét gézen át egy centrifugacsőbe, és centrifugálja 2 percig (500 x g).
3. Dekantálja a felülúszót, adjon 8 ml fiziológiás sóoldatot a kémcsőbe, és keverje el az üledékkel egy műanyag spatulával vagy bottal.
4. Adjon hozzá 3 ml dietilétert, zárja le a csövet és finom rázással keverje el a tartalmat.
5. Távolítsa el a dugót és centrifugálja 5 percig (500 x g), amely számos réteg kialakulását eredményezi.
6. Törölje le a törmeléket a cső faláról egy pálcával és dekantálja a felülúszót.
7. Az üledékből két vagy több cseppet tegyen tárgylemezre. Opcionálisan adható hozzá Lugol oldat, ezután fedje le a cseppeket fedőlemezzel.
8. Mikroszkóposan vizsgálja meg a fedőlemez alatti teljes területet, az 1.2.2. fejezetben leírtak szerint.

1.2.8. Telemann-Rivas módszer

Alapelv:

Ez a módszer a SAFC technika egy változata. Ez a módszer koncentrálna a petéket, cisztákat és lárvákat a nagy zsírtartalmú bélsármintákban (mint amilyen a ragadozóké).

A szükséges bélsármennyiség:

1 g, friss.

Eljárás:

1. Mérjen ki 1 g friss bélsarat.
2. Helyezze a bélsarat egy üvegedénybe és adjon hozzá 5 ml ecetsavat (legalább 5%-osat).
3. Homogenizálja alaposan egy pálcával és szűrje át dupla gézrétegen.
4. Tegye át a bélsároldatot egy centrifugacsőbe (12 ml).
5. Adjon hozzá azonos mennyiségű dietilétert és ke-verje össze rázogatóssal.
6. Centrifugálja 5 percig (300 x g). A keverék 4 rétegre válik szét (tetejétől az aljáig): dietiléter/törmelék (beleértve a zsírkomponenseket)/ecetsav/üledék. Az üledék gyakran nagyon ke-és.
7. Szívja le az üledéket pipettával és tegye egy tárgy-lemezre. Opcionálisan adjon hozzá Lugol-oldatot egyes parazitastádiumok (pl. *Giardia* ciszták) kimutatása ér-dekében, és fedje le a cseppeket fedőlemezzel.
8. Mikroszkóposan vizsgálja meg a fedőlemez alatti teljes területet, az 1.2.2. fejezetben leírtak szerint.

1.2.9. Baermann technika

Alapelv:

Ezt a módszert általában a mozgó fonálféreg lárvák elkülönítésére alkalmazzák (tüdőférgek, *Strongyloides* L1 lárváinál). A Baermann technika emellett használható a strongyloidák harmadik stádiumú lárváinak (L3) bélsártenyészetből történő kinyerésére. Az alapelv a lárvavándorlás (pozitív hidrotaxis) és a súlyon alapul, ezért csak élő lárvák friss bélsárból történő kinyerésére alkalmas. A bélsár megmérésével és minden jelen lévő larva megszámolásával (vagy reprezentatív aliquotok vizsgálatával) lehetséges a kvantitatív vizsgálat is.

A szükséges bélsármennyiség:

Legalább 4-10 g bélsár; három egymást követő napon történő mintavétel segíthet megoldani a tüdőférgek L1 lárvái szakaszos ürülésének problémáját.

Eljárás:

1. Készítse elő a Baermann készüléket úgy, hogy a tölcsért a tölcsértartóba helyezi, a gumicsövet a tölcsér csövére, rajta egy csipesszel, amely párhuzamos a gumicső vágott végével és a csipesz első, nyitórésze közelebb legyen a készülék aljához. Öntsön némi csapvizet a tölcsérbe. Ellenőrizze, hogy a csipesz nem ereszt-e oly módon, hogy az apparátust használat előtt egy nappal feltölti.
2. Keverje össze a bélsarat alaposan (fűrészpor használható a bélsár fellazítására, ha a minta száraz és tömör), és tegye a homogén keveréket egy gézbe.
3. A bélsarat tartalmazó gézt tegye a tölcsérbe és adjon hozzá vizet, amíg csaknem teljesen elfedi.
4. Hagyja állni a mintát legalább 12 óráig szobahőmérsékleten. A lárvák kivándorolnak a bélsárból a csőbe és lesüllyednek (súlyuk miatt) a tölcsér végébe.
5. A gumicső csipeszének felnyitásával az első cseppek mikro-szkóp alatt vizsgálhatóak (40-400x-os nagyítással). Ha a lárvák mozognak, 1 csepp Lugol oldat hozzáadható, ami elpusztítja a lárvákat, és megkönnyíti azok alaktani azonosítását. A másik megoldás, hogy 10 – 14 ml folyadékot összegyűjt egy csőbe, 2 percig centrifugálja (500 x g), eltávolítja a felülúszót és az üledék 0,5 – 1 ml-ét vizsgálja meg.

A lárvák grammonkénti számának (LPG) kvantitatív meghatározása érdekében előzetesen meg kell mérni a bélsarat, megszámolni az összes lárvát (vagy aliquotot) az üledékben és extrapolálni az LPG-t.

1.2.10. Bélsár lárvatenyésztés

Alapelv:

Bélsárkultúrát lóbélsárból szoktak csinálni a gyomor-bélnematodák harmadik stádiumú lárváinak (L3) kinyeréséhez: a trichostrongylidák és strongylidák petéit addig tenyésztik, amíg kialakulnak az L3 stádiumok, ami lehetővé teszi a faji szintű azonosítást.

A szükséges bélsármennyiség:

Legalább 50 g bélsár, közvetlenül a végbélből vagy közvetlenül bélsárürítés után, hogy a minta ne szennyeződjön talajnematodákkal.

Eljárás:

1. Keverje össze a bélsarat sterilizált fűrészporral egy nedves, morzsás masszává (szükség esetén adjon hozzá csapvizet, de úgy, hogy az összes víz felszívódjon; ha a keverék túl nedves, a lárvák nem fognak kifejlődni).
2. Tegye a keveréket egy csavaros tetejű üvegedénybe, töltsen meg félig és lazán tegye rá a fedelét (a levegőnek be kell jutnia az edénybe).
3. Inkubálja az edényt 7-10 napig sötét helyen, 25°C-on, ami lehetővé teszi, hogy a kifejlődött lárvák az edény üvegfalán felvándoroljanak.
4. Nyissa ki az edényt és egy mozsártörővel vagy kanállal nyomja le a bélsarat.
5. Töltsen fel az edényt óvatosan a pereméig csapvízzel anélkül, hogy a bélsárkultúrát felkeverné.
6. Nyomja egy üveg Petri-csészé fedelét szorosan az üvegedény szájához, és fordítsa a kultúrát fejjel lefelé.
7. Félig töltsen fel a Petri-csészét vízzel és hagyja az edényt és a csészét 12 órát állni, ami elősegíti a lárvák átvándorlását a tenyésztőüvegből a Petri-csészébe lévő folyadékba.
8. Gyűjtse össze a Petri-csészében lévő folyadékot egy pipettával és mikroszkóp alatt különítse el a lárvákat (lásd. 1.2.9.).

A másik lehetőség, hogy az inkubálást és a harmadik stádiumú lárvák kialakulását követően (3. pont), ezek a Baermann módszerrel koncentrálhatóak (lásd. 1.2.9.).

1.2.11. Bélsárkenetek, festés

Alapelv:

A közvetlen bélsárkenet mikroszkópos tárgylemezen gyorsabb módszer lehet, pl. nagyszámú tüdőféreg-lárva vagy egysejtű trophozoita kimutatására. Azonban dúsitás nélkül ennek az eljárásnak az érzékenysége kicsi, és a legtöbb esetben a megbízható parazita-kimutatásnak nem elégséges módszere. Az egyetlen kivétel az alább leírt festés a *Cryptosporidium* kimutatására.

A *Cryptosporidium* oocisztái vékony bélsárkenetekben kimutathatóak festést követően. Módosított Ziehl-Neelsen festés (saválló festés) követően az oociszták rózsaszínű kerekded képletként tűnnek fel (átmérőjük 4-6 µm) türkiz háttérben. Heine szerinti karbolfuxin festés után az oociszták szintelen képletként mutatkoznak vöröses háttérben. Más festések, pl. a Kinyoun festés is megfelelő ezeknek az oocisztáknak a kimutatására.

A szükséges bélsármennyiség:

1 g bélsár, félfolyékony vagy folyékony állagú (ha túl szilárd, vízzel keverve).

A festési eljárás (Ziehl-Neelsen):

1. Oszlassa el a bélsáryanyagot vékony rétegben egy mikroszkópos tárgylemezen, vattatampon segítségével.
2. Szárítsa meg levegőn, szobahőmérsékleten, körülbelül 30 percig.
3. Fixálja metilalkoholban 5 percig, festőküvetében.
4. Szárítsa meg levegőn.
5. Fesse meg karbolfuxinnal 4 percig, festőküvetében.
6. Öblítse le hideg folyóvízzel.
7. Vonja ki savas alkohollal festőküvetében, amíg már több festék nem oldódik ki.
8. Öblítse le hideg folyóvízzel.
9. Végezzen kontrasztfestést malachitzölddel 4 percig, festőküvetében.
10. Öblítse le hideg folyóvízzel.
11. Szárítsa meg levegőn.
12. Végezzen mikroszkópos vizsgálatot 400 – 1000x-os nagyítással (olajos immerziós lencsével), kerekded, rózsaszín képleteket keressen (4-6 µm átmérővel),

Eljárás (Heine festés):

1. Keverjen el egy csepp bélsarat karbolfuxinnal és vékonyan oszlassa el egy mikroszkópos tárgylemezen.
2. Hagyja levegőn száradni, amíg a felszíne mattnak látszik, és azonnal vizsgálja meg mikroszkóppal olajos immerziós lencsével, a fentebb leírtaknak megfelelően.

1.2.12. Ragasztószalagos eljárás

A közvetlen lenyomati eljárás átlátszó ragasztószalagot használ (kb. 1 cm széleset és 4 cm hosszút) a lovak végbélnyílása körüli részen az anyaggyűjtésre, hogy az *Oxyuris equi* kimutathassák. Ugyanez a módszer alkalmazható *Echinococcus* és egyéb Taeniidae peték gyűjtésére kutyák perianális területeiről. A szalag ragasztós felét többször a bőrre kell nyomni. Ezután (szintén a ragasztós felével lefelé) tárgylemezre kell nyomni. A ragasztószalag szolgál fedőlemezként. és a minta vizsgálható is mikroszkóppal.

1.2.13. Bélsárvizsgálatra szolgáló kereskedelmi vizsgálókészletek/InPouch™ TF Feline/koproantigén tesztek

A felszindúsítási eljárás alkalmazására különböző készletek kaphatók a kereskedelemben, hogy megkönnyítsék a bélsárvizsgálatot (pl. Parasite Diagnosis System®, ParaTest®, Fecalyzer®, Ovatec® Plus); ezek a készletek használatra kész felszindúsító oldattal (fajsúlya 1,2) és vizsgálóedényekkel működnek.

Általánosságban ezek a készletek kutyák és macskák bélsárvizsgálatában teljesítenek a legjobban. Vonzóak, mert felhasználóbarátok, és a bélsárkezelés és -vizsgálat higiénikus módját teszik lehetővé.

Azonban számításba kell venni, hogy ezek a készletek csak kismennyiségű bélsár feldolgozására alkalmasak, mert az edény kicsi, és az eljárás során előfordulhat, hogy a bélsárminta a szűrőbetét alsó felére kerül. Ezért a készletek csak ragadozóktól vett bélsárminták vizsgálatára alkalmasak, és enyhe fertőzés esetén a kimutathatósági érzékenység gyengébb (kevesebb bélsarat vizsgál, kisebb fajsúlyú felszindúsító oldattal, nincs centrifugálással történő dúsítás), a fentebb leírt kombinált ülepítéssel – felszindúsítással eljárásához képest. Emellett általában nem lehetséges makroszkóposan megvizsgálni a mintát (pl. ízék jelenlétére), ha az állat tulajdonosa már lezárta a bélsármintát tartalmazó edényt mielőtt bevitte volna vizsgálatra. A hagyományos módszerekkel összehasonlítva, a készletet alkalmazó eljárások drágábbak, és több műanyag hulladékot termelnek, mert egyszer használatos komponenseket tartalmaznak.

InPouch™ TF Feline

Az eljárást *Tritrichomonas foetus* macskabélsárból történő tenyésztésére és kimutatására használják. A bélsármennyiséget (0,03g, ami túlhevényi mennyiség) steril vattatamponnal helyezik a tápfolyadékot tartalmazó, kereskedelemben kapható zacskóba (InPouch™ TF Feline). A zacskót felcímkézik és dátummal látják el, majd lezárják és tenyésztésre függőleges helyzetbe teszik 37°C-on 24 órára, majd szobahőmérsékleten, sötétben tartják. A zacskót 24 óra, 48 óra után, majd ezt követően 12 napig minden második nap megvizsgálják trophozoiták jelenlétére, mikroszkóp alatt.

Bár a vizsgálatot specifikusnak tartják *T. foetus*-ra, nem kórokozó ostorosok, így a *Pentatrichomonas* is megjelenhet a tenyészetben, ami molekuláris differenciálást tehet szükségessé.

Koproantigén tesztek és egyéb ellenanyagra irányuló parazitakimutató vizsgálatok

A koproantigén tesztek kvalitatív módon mutatják ki a parazita antigéneket a bélsárban, és leggyakrabban a gyakorlatban helyszíni (ambuláns) vizsgálatként alkalmazzák őket, de az erre szakosodott laboratóriumokban is, mert ha a megfelelő gazdafaj vizsgálatára használják, érzékenységük nagy. A koproantigén-kimutató formátuma lehet közvetlen immunfluoreszcens assay (DFA) lemezen, ELISA vagy enzim immunoassay (EIA) – formátumú antigén-kimutató teszt 96 vájulatós lemezekeken, vagy immunkromatográfiás “dipstick” (merülőpálcás) (ICT) vizsgálat (lásd még a 3. táblázatban). Mivel ma kutyákon és macskákon történő használatra tervezett tesztek lehet kapni, inkább ezeket érdemes alkalmazni, nem a humán bélsárminták számára tervezetteket, az egyre fontosabb minőségbiztosítási okokból, főleg a specifitásuk miatt.

Giardia esetében megjegyzendő, hogy a koproantigén kimutató nem mindig van korrelációban a betegséggel, és a teszteredményeket a klinikai tünetekkel együttesen kell értelmezni.

3. táblázat: Kereskedelemben kapható koproantigén tesztek – példák (nem teljes lista)

Vizsgálat	Gyártó	Kimutatott parazita	Formátum	Gazdafaj*
Anigen Rapid CPV/CCV/Giardia Ag 2.0	BioNote, Korea	<i>Giardia</i>	immunkromatográfia	kutya, macska
FASTest® GIARDIA Csik	Megacor, Ausztria	<i>Giardia</i>	immunkromatográfia	kutya, macska
FASTest® CRYPTO-GIARDIA Csik	Megacor, Ausztria	<i>Giardia</i> / <i>Cryptosporidium</i>	immunkromatográfia	kutya, macska
SNAP® Giardia	IDEXX, USA	<i>Giardia</i>	ELISA	kutya, macska
Merifluor® <i>Cryptosporidium</i> / <i>Giardia</i>	Meridian Bioscience, UK	<i>Giardia</i> / <i>Cryptosporidium</i>	direkt immunfluoreszcens kimutató	kutya
PetChek™ IP Fecal Dx™**	IDEXX, USA	<i>Giardia</i> , orsóféreg Trichuridae kampóféreg	ELISA	kutya, macska***
Speed Giardia™	BVT-Virbac, Franciaország	<i>Giardia</i>	immunkromatográfia	kutya, macska
Uranotest® Giardia	Uranovet, Spanyolország	<i>Giardia</i>	immunkromatográfia	kutya, macska
WITNESS® GIARDIA	Operon S.A., Spanyolország****	<i>Giardia</i>	immunkromatográfia	kutya, macska

* A gyártó utasítása szerint; egyes vizsgálatok kiterjeszhetőek más fajokra is az irodalom alapján.

** A PetChek™ IP gyűjtőkészletet állatorvosi praxisok számára árulják, a mintákat a gyártóhoz kell beküldeni vizsgálatra. A Fecal Dx™ ugyanazt a készletet és ugyanazt a gyártót jelöli.

*** Kutyákban történő használatra javasolt.

**** A Zoetis forgalmazza.

2. SZEROLÓGIA

2.1. Általános információk

A szerológiai tesztek idült fertőzések esetén kedvezőbbek a közvetlen kimutatásnál, amikor a szubsztrátban a kis parazitaszámok csökkentik a sikerarányt, pl. babesiosisnál vagy neosporosisnál, vagy azokban az esetekben, amikor a fertőzött szövetből nem lehet mintát venni, és a parazita-stádiumok nem közvetlenül férhetőek hozzá a testfolyadékokban. Az ilyen szövetekben élő, a szövetekben, pl. az agyban vagy a szem szöveteiben idült fertőzést okozó egysejtűekre példa a *Toxoplasma gondii* vagy az *Encephalitozoon cuniculi*. Kutya leishmaniosis diagnosztizálásakor szerológiai assay-eket használnak a közvetlen kimutatás mellett, hogy a fertőzés megfelelő értékelését és az állat immunstátuszát megerősítsék, a kezelésre adott reakciót figyelemmel kövessék, és a potenciális visszaesést előre jelezhessék.

Antigén-kimutatás

Hasonlóan a koproantigén-tesztekhez, amelyek a bélsárban mutatják ki az antigént (lásd. 1.2.13.), az antigének szerológiai kimutatása azt jelenti, hogy a paraziták részeit (testi antigének), vagy a parazita által termelt külsőleg/belsőleg elválasztott antigéneket közvetlenül mutatják ki a vérben vagy a szérumban. A DNS-kimutatáshoz hasonlóan ez közvetlen bizonyítékot szolgáltat a parazita jelenlétére a véráramban, és így a fertőzés jelen állapotáról is információt ad. A *Dirofilaria immitis* és az *Angiostrongylus vasorum* vérparaziták, amelyek keringő antigénjei szerológiailag kimutathatóak (lásd 4. táblázat).

4. táblázat: Válogatás a kereskedelemben kapható, kutyák, macskák és lovak parazitáinak vagy vektor közvetítette kórokozóinak kimutatására szolgáló szerológiai tesztek közül.

(Forrás: www.megacor.at; www.laboklin.de; www.idexx.ch; uranovet.com és mások, a teljesség igénye nélkül)

Assay	Gyártó	Kimutatható paraziták vagy vektor közvetítette baktériumok	Formátum	Gazdafaj
Antigén kimutatására irányuló tesztek				
Anigen Rapid CHW Ag 2.0	BioNote, Korea	<i>Dirofilaria immitis</i>	Laterális áramlásos immunkromatográfia	kutya
DiroCHEK®	Zoetis, USA	<i>Dirofilaria immitis</i>	ELISA	kutya
FASTest® HW Antigen	Megacor, Ausztria	<i>Dirofilaria immitis</i>	ELISA	kutya
Angio Detect™ Test	IDEXX, USA	<i>Angiostrongylus vasorum</i>	Laterális áramlásos immunkromatográfia	kutya
Speed Diro™	BVT-Virbac, Franciaország	<i>Dirofilaria immitis</i>	Laterális áramlásos immunkromatográfia	kutya
Uranotest® Dirofilaria	Uranovet, Spanyolország	<i>Dirofilaria immitis</i>	Laterális áramlásos immunkromatográfia	kutya, macska
WITNESS® Dirofilaria	Zoetis, USA	<i>Dirofilaria immitis</i>	Laterális áramlásos immunkromatográfia	kutya
Ellenanyag kimutatására szolgáló tesztek				
ANAPLASMA-ELISA Kutya	Afosa, Németország	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	ELISA	kutya
Anigen Rapid Leishmania Ab	BioNote, Korea	<i>Leishmania infantum</i>	Laterális áramlásos immunkromatográfia	kutya
BABESIA-ELISA Kutya	Afosa, Németország	<i>Babesia canis</i>	ELISA	kutya
EHRlichIA-ELISA Kutya	Afosa, Németország	<i>Ehrlichia canis</i>	ELISA	kutya
Diagnosteq	University of Liverpool, UK	<i>Anoplocephala perfoliata</i>	ELISA	horse
EquiSal	Austin Davis Biologics, UK	<i>Anoplocephala perfoliata</i>	ELISA (nyálból)	horse
LEISHMANIA-IgG ELISA Kutya	Afosa, Németország	<i>Leishmania infantum</i>	ELISA	kutya
SARCOPTES-ELISA 2001 Kutya	Afosa, Németország	<i>Sarcoptes scabiei</i> var. <i>canis</i>	ELISA	kutya
SNAP® <i>Leishmania</i>	IDEXX, USA	<i>Leishmania infantum</i>	ELISA	kutya
Speed Leish K™	BVT-Virbac, Franciaország	<i>Leishmania infantum</i>	Laterális áramlásos immunkromatográfia	kutya
Uranotest® Ehrlichia-Anaplasma	Uranovet, Spanyolország	<i>Ehrlichia canis</i> , <i>Anaplasma platys</i>	Laterális áramlásos immunkromatográfia	kutya
Uranotest® Ehrlichia	Uranovet, Spanyolország	<i>Ehrlichia canis</i>	Laterális áramlásos immunkromatográfia	kutya
Uranotest® Leishmania	Uranovet, Spanyolország	<i>Leishmania infantum</i>	Laterális áramlásos immunkromatográfia	kutya
Vegyes antigen (Ag)- ellenanyag (Ab) kimutatási tesztek				
SNAP® 4Dx® Plus	IDEXX, USA	<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	kutya
Uranotest® Quattro	Uranovet, Spanyolország	<i>Dirofilaria immitis</i> (Ag) <i>Leishmania infantum</i> (Ab) <i>Ehrlichia canis</i> (Ab), <i>A. platys</i> (Ab)	Immunkromatográfia	kutya

Ellenanyag-kimutatás

A paraziták elleni specifikus ellenanyagok egyetlen mintából történő kimutatása azt jelzi, hogy az állat korábban találkozott-e ezzel az antigénnel/parazitával. Mivel az ellenanyagok késleltetve alakulnak ki, általában csak 2-3 héttel az elsődleges fertőzés után mutathatók ki. Az ellenanyagok a kórokozó kiürülése után is perzisztálnak, számos esetben akár hónapokig/évekig is, nagy egyedi és kórokozó-specifikus variációkkal. Fontos azzal számolni, hogy a nem egy előzetes fertőzésből, hanem pl. egy korábbi vakcinázásból (pl. *Leishmania* vagy *Babesia* ellen) származó ellenanyagok, a nagyon fiatal állatokban pedig maternális ellenanyagok is jelen lehetnek. A szerológiai tesztek specifitását korlátozhatják a más szervezettel való keresztreakciók vagy a nem specifikus reakciók.

A fals eredmények elkerülése érdekében a szerológiai vizsgálatok egy bizonyos idő elteltével ismételhetőek (általában 2-3 héttel később), hogy lássuk, az érték változott-e. Ha egy állatnál, amely előzőleg negatív volt, vagy alacsony értékeket mutatott, növekvő vagy pozitív értéket mutatnak ki, ez aktív/folyamatban lévő fertőzésként értékelendő; ha az érték csökkenő vagy negatívba fordul, a fertőzés lezajlott. Vannak azonban kivételek is e szabály alól.

Az ellenanyag-fluktuációk vizsgálatára vagy kvantitatív ELISÁ-k, (egység, pont- vagy koncentráció-értékekkel), vagy félkvantitatív IFA assay-k (titerek) használhatóak. A klinikákon végzett gyors tesztek kvalitatívak, és csak ezek alapján csak arról lehet dönteni, hogy az állat szerológiailag pozitív vagy negatív.

Az ellenanyag-kimutatás formái hasonlítanak az antigén-kimutatáséihoz, kivéve, hogy a kimutatás szubsztrátja az ellenkező. Mivel a legtöbb formátum specializált laboratóriumokra korlátozódik, hiszen specifikus berendezés szükséges a vizsgálatok kivitelezéséhez, a jelen dokumentumban a módszereket nem ismertetjük részletesen, és csak a különböző formátumokat és a gyakorlat számára elérhető teszteket listáztuk.

Jellemzően az ellenanyag-kimutatást az idült fertőzést okozó, bélrendszeren kívüli paraziták, így a *T. gondii*, *E. cuniculi* (macskák és kutyák), *Neospora caninum* (kutyák), *Sarcocystis neurona* (lovak) valamint számos vektor közvetítette kórokozó így a *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Dirofilaria immitis* (macskák), *Angiostrongylus vasorum* (kutyák), *Babesia caballi* és *Theileria equi* (lovak) státuszának értékelésére alkalmazzák. Kutyák esetében a metacestodák elleni ellenanyag kimutatása alveoláris echinococcosisnál, specializált laboratóriumokban végezhető.

Ezen kívül a lovak *Anoplocephala perfoliata* fertőzése diagnosztizálható a szérumban vagy a nyálban megjelenő ellenanyagok kimutatásával. Kutyák esetében a *Sarcoptes rühatka* közvetlen kimutatása szerológiai ellenanyag-kimutatással erősíthető meg.

Egyes laboratóriumok "úticsomagokat" ajánlanak kutyák számára, amelyek különböző vizsgálatokat kombinálnak (szerológia, PCR, antigen-kimutatás, Knott-féle teszt és mások) "egzotikus" kórokozók csoportjának a kimutatására. Azonban tekintetbe kell venni a lappangási idők és a betegség klinikai tüneteinek megjelenésének különbségeit. Egyes esetekben tanácsos lehet az ismételt vizsgálat.

Egyes országok nemzeti szabályozást vezettek be a lófélék piroplasmosisának vizsgálatára.

A szerológiai vizsgálati rendszerek minőségbiztosítása

Ahogy minden diagnosztikai vizsgálat esetében, a szerológiai assay-k érzékenysége és specifitása változó szintű. Jó klinikai gyakorlat, ha a szerológiai tesztekhez mindig tesznek negatív és pozitív kontrollt is. Számos laboratórium ajánl háttérinformációt tesztjeik technikai minőségéről és nyújtanak segédkezet értelmezésükhöz, különös tekintettel a vakcinációs titerekkel való interferenciájukra, keresztreaktivitásukra más, szoros rokonságban lévő kórokozókkal és más, a vizsgálat értelmezésekor figyelembe veendő tényezőkre.

A kinikai kisereléstől és a tesztel szembeni kívánalmaktól függően ajánlatos lehet a szerológiai teszteket egyéb, közvetlen kimutatási technikákkal, vagy ha ez nem lehetséges, ellenanyag-kimutatásra irányuló, más közvetett tesztrendszerrel kombinálni. A Western blot technikát gyakran használják referenciaként humán fertőzések esetén, de költsége és az időbeli korlátok miatt az állatorvosi diagnosztikában használata általában a kutatásra szorítkozik, néhány kivétellel.

Ahol ez megoldható, a heveny és félheveny fertőzések során termelődő immunglobulinok (IgM) elkülöníthetőek az idült fertőzések során leggyakoribbaktól (IgG).

Kutya leishmaniosis esetében a kezelés sikerességének értékelésére a szerológia nem biztos, hogy elegendő, az ellenanyagok a klinikai gyógyulást követően még hónapokig, évekig jelen lehetnek, mert a parazitától teljesen nem lehet megszabadulni. Ezért további laboratóriumi vizsgálatokkal ajánlatos a páciens immunológiai és egészségügyi helyzetét értékelni. A kvantitatív PCR lehetővé teszi a parazitaterhelés értékelését az egymással összevethető szövetekben, ami hasznos lehet a kutya leishmaniosis kezelése során a követésre, de ez a megközelítés alapos vizsgálatot igényel.

2.2. Az ellenanyag-kimutatás kvantitatív módszerei

2.2.1. Indirekt fluoreszcens ellenanyag-teszt (IFAT)

Az indirekt fluoreszcens ellenanyag teszt az antigénekhez (azaz inaktivált teljes parazitákhoz) kötődő specifikus ellenanyagok kimutatásán alapul, amelyeket üveg tárgylemezeken rögzítenek és ezt követően egy második ellenanyaggal kimutatják őket. Ez az ellenanyag az elsődleges (szérum) ellenanyag nem variábilis régiójához kötődik, amely kovalens kötéssel kapcsolódik egy fluoroforhoz. Fluoreszcens fénymikroszkópiával a megkötött ellenanyag fluoroforja a megfelelő hullámhosszon kimutatható. Ha megfelelően kivitelezik, a technika rendkívül pontos, de időigényes, és gyakorlást és szakértelmet igényel. Ennek ellenére kisállatok esetében még most is széles körben alkalmazzák, mert kevésbé hajlamos nonspecifikus reakciókra. Az IFAT hátránya az, hogy nem minden antigen hozzáférhetősége azonos az ellenanyagok számára, tehát más vizsgálatokhoz képest az érzékenység kicsi lehet. Mivel az eredményeket titerben fejezik ki, félkvantitatív eredményt adnak, amely a követő vizsgálatok során hasznos lehet.

2.2.2. Enzimkapcsolt immunszorbens assay (ELISA)

Az enzimkapcsolt immunszorbens assay (ELISA) azokat a specifikus antigéneket vagy ellenanyagokat mutatja ki, amelyek egy feldolgozott antigénhez (pl. natív antigén teljes lizátumához, vagy rekombináns antigénekhez) vagy ellenanyaghoz kötődtek, egy műanyag felületre abszorbeálva (indirekt ELISA). A másodlagos ellenanyag, ebben az esetben enzimmel jelölt, ez a kromofor szubsztrát színváltozását idézi elő, amely mérhető és kvantifikálható az optikai sűrűség mérésével. Ennél bonyolultabb forma a szendvics ELISA, amelynél az antigén nem kötődik közvetlenül a műanyag felülethez, viszont ellenanyagokat alkalmaz ehhez a felülethez kapcsolva, hogy azok "elkapják" a specifikus antigéneket. Ezt a módszert akkor alkalmazzák, amikor az antigén-keverékek szilárd fázishoz történő közvetlen kötése a teszt specifitásának csökkenését eredményezi. Más ELISA-formátumok is léteznek.

Az ELISA egy sokkal szabványosabb vizsgálati formátum, mert 96 vájultatos lemezekon végzik, és gyakran kontrollt is alkalmaznak, tehát nem szükséges a vizsgálat kivitelezéséhez kórokozó specifikus szakértelem. A teszteredményeket általában abszorbancia-értékben, tesztpontszámokban, ellenanyag egység-koncentrációban fejezik ki, és legtöbbször a diagnosztikai anyagnak csak egy hígítását használják a specifikus ellenanyag kimutatására, és a kisebb hígításokat antigén-kimutatásra. Ezért a reakció intenzitása nincs mindig korrelációban a jelen lévő ellenanyagok szintjével (erős pozitív reakció esetén lehetséges, hogy a rendszer telített).

Mivel a különböző ELISA-formátumok jobban szabványosítottak, mint az IFAT-ok, és az optikai leolvasás kevésbé szubjektív, mint a mikroszkópia, az ellenanyag-titernek időbeli változásának kimutatására az ELISÁ-k kedvezőbbek, mint az IFAT.

Egyes esetekben a vértől eltérő szubsztrátok vizsgálhatók, például *Anoplocephala perfoliata* esetében a lónyal a szubsztrát (EquiSal®).

2.3. Kvalitatív módszerek

2.3.1. Gyorsteszt-rendszerek

Enzim alapú gyorstesztek (enzimhez kovalens kötéssel kötött ellenanyagokat használnak, és tartalmaznak egy lemosási lépést is), vagy az immunkromatográfiás tesztek (kolloid aranyhoz kötött ellenanyagokat használnak és nincs lemosási lépés) állnak rendelkezésre a különböző fertőző betegségek gyors helyszíni diagnózisához. Ezeket erre szakosodott cégek állítják elő, amelyek tesztjeik minőségbiztosításáért is felelnek, és minden anyagot biztosítanak, beleértve a tesztekhez tartozó pozitív és negatív kontrollokat. A tesztek könnyűek és gyorsan kivitelezhetőek, nem igényelnek specifikus képzést. Azonban nem használhatóak más esetekben és más célállat-fajokon, mint amelyeket a teszt dokumentumai specifikálnak. Az ellenanyagok vagy antigének becsült szintje általában nem elég pontos a titeremelkedés vagy –csökkenés meghatározásához.

3. BŐRVIZSGÁLAT

3.1. Általános információk

Ez a fejezet a kutyák, macskák, lovak és kistestű házikedvenc emlősök bőrén, jelenlétük következtében közvetlenül betegséget okozó külső paraziták azonosításáról szól.

A bolhák, tetvek, atkák és kullancsok mind parazitás megbetegedést okoznak, vagy közvetlen hatásukkal, és/vagy kórokozók átvitele révén.

A kisebb külső élősködők, például atkák okozta bőrfertőzés diagnosztizálása és az izolált minták differenciálása általában a parazita egy vagy több életstádiumának mikroszkópos azonosítását igényli. A diagnózis sikeressége a megfelelő mintavételtől, és a szükséges feldolgozást követően a fénymikroszkóp alatti vizsgálattól függ, ez utóbbi lehetőleg lesüllyesztett kondenzorral és csökkentett erősségű fényforrással végzendő.

A következő fejezet a külső élősködők izolálására alkalmazott leggyakrabban használt módszereket írja le.

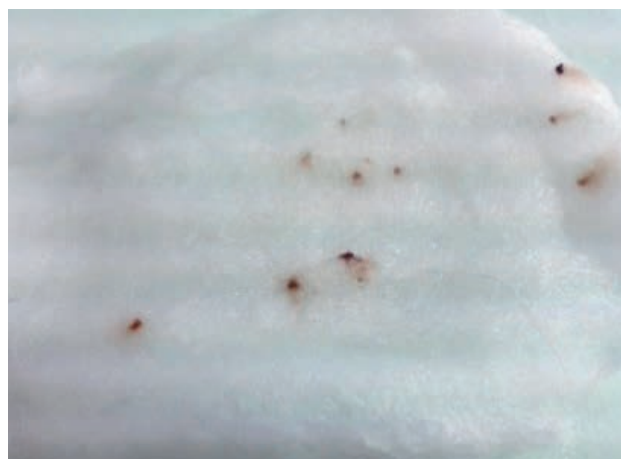
3.2. Bolhafésű alkalmazása

A "bolhafésű" egy finom fogazatú fésű, amellyel az állat bundájáról gyűjtik össze a törmeléket.

Erősen mozgó bolhák feltűnő jelenlétének hiányában a bolhaürülék mutatható ki az állat megfésülésével, és az összegyűjtött anyag nedves, fehér papírra, anyagra vagy pamutvattára helyezésével: a bolhaürülék fekete foltjait emésztetlen vérből álló vörös gyűrű veszi körül.



2. ábra: Bolhafésű alkalmazása



3. ábra: A vért tartalmazó bolhaürülék víz hozzáadásával azonosítható.

A fésülés hasznos lehet a *Cheyletiella* és tetűfertőzés diagnosztizálására is. Az összegyűlt törmeléket Petri-csészébe lehet helyezni, és sztereomikroszkóppal vizsgálni: az atkák a törmelékben járkálva láthatóak ("sétáló korpa"). A tetvek vagy *Cheyletiella* atkák azonosításának másik módja az, ha a fésűről ragasztószalaggal gyűjtik össze a korpát (lásd 1.2.12). A natív mikroszkópos vizsgálat lehetővé teszi a paraziták vagy peték azonosítását.

3.3. Bőrkaparékok

A bőrkaparékok lehetővé teszik az epidermisz első rétegei (felületes) vagy az összes rétege (mély) megmintázását a bőr felületén maradó, vagy a mélyebb struktúrákban, pl. szőrtüszőkben rejtőzködő külső élősködők (ektoparaziták) kimutatása érdekében. A mintavételt a bőrelváltozás határáról, vagy a külső élősködő kedvelt helyeiről kell végezni.

A kaparékvételt szikepengével vagy kaparókanállal végzik. A szikepengét és a bőrt ásványolajjal kell bekenni, hogy a törmelék és a paraziták a pengére tapadhassanak. Ha szőrt kell vágni, csak olló használható, és lehetőleg olyan helyről kell a bőrkaparékot venni, amelyet az erős vakaróztatás nem károsított.

A mintát széles szájú, átlátszó, jól zárható műanyagcsőbe kell helyezni.

Először a bőryanag és a műanyag tárolóedény falai sztereomikroszkóppal vagy nagyítóüveggel vizsgálhatóak, mert az atkák és egyéb ízeltlábúak szeretnek kivándorolni a bőryanagból. Az összegyűjtött anyag ezután tárgylemezre vihető kenetnek, fedőlemezrel lefedhető és 40–100x-os nagyítással vizsgálható. Ásványolajat (vagy egy csepp glicerint) szintén kell a lemezre tenni.

Ideális körülmények között **mind a felületes, mind a mély bőrkaparékot** a test aránylag nagy részéről, a gyanús területek határaitól **kell** levenni.

Kutyák és macskák esetében ajánlatos bőrkaparékot venni rüh-atka-fertőzés (pl. *Sarcoptes scabiei*, *Notoedres cati*), demodicosis (*Demodex* spp.), cheyletiellosis (*Cheyletiella* spp.) vagy bársonyatka-fertőzés (*Trombicula autumnalis* lárvák) diagnosztizálása céljából. Elsősorban:

- Gyanított *Demodex canis* fertőzés esetén érdemes trichogrammal kezdeni (lásd. 3.5.): ha a *Demodex* atkák jelen vannak és a szőrön függenek, szükségtelen a bőrkaparék vétele.
- Kutyák esetében *S. scabiei*-nél mély bőrkaparékot kell venni a könyökökről, fül pereméről és a térdhajlat oldalsó részéről. Beszámolók szerint a *Sarcoptes*-rühösség esetén kutyáknál a bőrkaparékok 50%-a negatív; ezért, az érzékenység javítása érdekében több mintát (6 – 10) érdemes venni az állat különböző valószínűsíthető pontjairól. Másik megoldás, hogy egyes laboratóriumok ELISÁ-kat javasolnak a *S. scabiei* elleni ellenanyagok kimutatására, a diagnózis elősegítésére (lásd. 4. táblázat).
- Macskák *Demodex gatoi*-ja esetében ugyanaz a technika alkalmazható, mint a kutyák *S. scabiei*-re történő bőrkaparék-vételénél.
- *Cheyletiella* atka kimutatására a hát és a fül "zsebe" kaparható meg; azonban itt az ajánlott módszer a ragasztószalag-technika (lásd 3.4.).
- A bőrkaparékok kimutatják a bőrben tanyázó belső élősködőket (endoparazitákat), így a *Pelodera*, *Uncinaria*, *Ancylostoma* fonálférgék lárváit, vagy a *Leishmania* promastigota stádiumait. Alkalmanként *Dirofilaria* mikrofiláriák is találhatóak. További biomolekuláris differenciálás végezhető a faj megerősítésére.

A bőrkaparék-vétel alkalmazható a **kistestű házikedvenc emlősökön** előforduló atkák kimutatására is.

Mély bőrkaparékok vétele ajánlott a szőrtüszőkben mélyen élő, follicularis *Demodex* atkák kimutatására. Az ilyen *Demodex* atkák kimutatására az alopeciás területeket kell megkaparni egy ásványi olajjal fedett szikepengével vagy kaparókanállal a szőrnövekedés irányában, amíg a kapilláris vérzés meg nem jelenik. A kaparékvétel alatt a bőrt össze kell nyomni, hogy serkentsék a *Demodex* atkák kipréselődését a szőrtüszőkből.

A különböző életstádiumok számának és vitalitásának értékelése hasznos a kezelésre adott reakció becslése szempontjából. Míg gyakran arról számolnak be, hogy egészséges kutyák kis számban tartalmaznak *Demodex*-et, a klinikailag érintett állatok esetében az atkaterhelés általában nagy, és ez utóbbi esetekben a közvetlen diagnózis érzékenysége jó. Azonban arról is beszámoltak, hogy a mély bőrkaparékok fals negatív eredményt adhatnak *Demodex*-re, főleg a nehezen megkapható területeken (szem, ujj közötti területek), és egyes fajták esetében (Bobtail, skót terrier, shar-pei). Ezekben az esetekben a trichogram (lásd 3.5.) hasznosabb lehet a megfelelő mennyiségű diagnosztikai anyag kinyerésére. Nemrégiben kimutatták, hogy a ragasztószalag-módszer adaptálásának jobb a diagnosztikai sikeraránya *Demodex* esetében, mint a mély bőrkaparéknak; ez az eljárás emellett kevésbé fájdalmas is a kutyák és macskák számára.

Lófélékben mély bőrkaparékok használhatók a *Demodex* és a fonálférges stádiumok (*Pelodera*, *Strongyloides* és *Habronema*) kimutatására.

Felületes bőrkaparékok

Kutyákban a felületesebben élő, rövid testű *Demodex* atkák kimutatására felületes bőrkaparékvételt lehet alkalmazni a ragasztószalagos mintavétel (lásd 3.4.) és a trichogram (3.5.) helyett.

Lófélékben felületes bőrkaparékvétel alkalmazható a *Chorioptes*, *Psoroptes*, *Sarcoptes* atkák, *Trombicula* lárvák és a takarmányon szabadon élő atkák (*Pediculoides ventricosus*, *Pyemotes tritici*, *Acarus farinae*) azonosítására.

A felületes bőrkaparékok (és a ragasztószalag-módszer) a tetvek kimutatására is alkalmas.

Bőrminta feldolgozása káliumhidroxid-oldattal (KOH) vagy laktofenollal

A kaparék minta feldolgozható úgy, hogy legalább 2-3 órára, de általában egy éjszakára 10%-os KOH oldatot vagy laktofenolt adnak hozzá, szobahőmérsékleten. Másik megoldás szerint a KOH megfelelő edényben történő felmelegítése lerövidíti az eljárást. A KOH oldat és a laktofenol lemacerálja a keratint a bőrről, és érintetlenül hagyja az ízeltlábúak kitines külső vázát. A szuszpenzió vizsgálható Petri-csészében sztereomikroszkóp alatt, vagy üveg tárgylemezen mikroszkóp alatt (40 – 100x-os nagyítással). A pontos azonosításhoz az ízeltlábúakat tárgylemezre kell helyezni és differenciálni. Az azonosítandó potenciális ízeltlábúak: rágó- és vérszívótetvek, atkák (*Cheyletiella*, *Trombicula*, *Demodex*, *Sarcoptes*, *Notoedres*).

3.4. Ragasztószalagos módszer

A közvetlen lenyomatvételi technika (ezért hívják acetátszalagos lenyomati módszernek is) átlátszó ragasztószalagot használ (kb. 1 cm széleset és 4 cm hosszút) a törmelék összegyűjtésére a bőr és a szőrtakaró felületéről, ahogy az az 1.2.12.-ben szerepel. A szalag ragasztós felét többször rányomják a bőrre. Ezután (szintén a ragasztós felével lefelé) egy tárgylemezre nyomják. A szalag fedőlemezként működik (nagyítás: 40 – 100x)

Általában a bőr különböző területeiről több mintát vesznek le. A technika különösen hasznos *Cheyletiella* atkák és rövid testű *Demodex* atkák azonosítására, mert egy nagyobb felületű területről lehet nagyon gyorsan mintát venni.

Lófélékben az acetátszalagos lenyomati technika a *Chorioptes equi*, *Dermanyssus gallinae* és tetvek kimutatására használható. A szőrtüszőkben élő *Demodex* esetében mély bőrkaparék vétele helyett a szalagot egy kiválasztott lézióra lehet helyezni. A bőrt ezután össze kell nyomni az acetátszalag alatt, és utána a szalagot üveg tárgylemezre ragasztani.

3.5. Trichogram

A trichogram a kitépett szőr mikroszkópos vizsgálata. A pozitív kihúzott szőrök helyettesíthetik a bőrkaparék-vételt azokon a helyeken, amelyeket nehéz megkaparni, így a szemhéjakon, a szem körüli területeken, a pofán vagy a lábvégeken, vagy akkor, ha a léziók nagyon fájdalmasak. Csipesz segítségével lehet a szőröket a szőrnövekedés irányában erőteljesen kihúzni. Ha lehetséges, a bőrt össze kell nyomni a mintavétel előtt és alatt. Legalább 40 (ideális körülmények között 50 – 100) szőrszálát ásványolajjal egy tárgylemezre kell helyezni, fedőlemezzel lefedni és kis nagyítással kiértékelni. Ha *Demodex* fertőzés gyanúja áll fenn, érdemes a vizsgálat érzékenysége miatt trichogrammal kezdeni: ha a *Demodex* atkák jelen vannak és a szőrszálakon függenek, a továbbiakban a bőrkaparék-vétel nem szükséges.

3.6. Atkák kimutatása a fülzsírból

Kutyák és macskák fülzsírjának megmintázása gyakran kiváló eredményt ad az *Otodectes cynotis* által érintett állatok esetében. A fülatkák gyakran otoszkópos vizsgálattal is megfigyelhetőek, és jellemző a nagy mennyiségű, sötétbarna háttér, a törmelék. A törmelék vagy vattatamponnal gyűjthető össze (ha zsíros), vagy kaparókanállal (ha megszáradt és pörkös), és szikepengével történő feldarabolás és ásványolajjal való összekeverés után mikroszkóp alatt vizsgálható.

Ugyanez a módszer alkalmazható **nyúl**fülre, a *Psoroptes cuniculi* kimutatására, bár egy ilyen fertőzés esetén a keletkezett törmelék vizsgálatához lehetséges, hogy káliumhidroxidos (KOH) emésztésre vagy laktofenolos kezelésre lesz szükség az atkák kiszabadításához.

3.7. Biomolekuláris technológiák

Ugyanúgy, mint belső élősködők esetében, azokban az esetekben, ahol az ízeltlábú alaktana nem teszi lehetővé az azonosítást, DNS-alapú technikák alkalmazhatóak (lásd 4.5.) Ehhez az eljáráshoz az élő ízeltlábúakat 70%-os alkoholban lehet tartósítani, vagy lefagyasztani.

4. EGYÉB

4.1. Vérkenetek

4.1.1. Általános információk

Véralvadásgátlót tartalmazó csőbe levett vérmintákból készült frissen készült kenetek használhatóak számos parazitás fertőzés diagnosztizálására. Jóllehet a paraziták ritkán vannak jelen a vérben, főleg a betegség idült formájában, a vérkenet könnyű volta és gyorsasága gyors és olcsó diagnosztikai megközelítést tesz lehetővé.

Szükséges anyagok:

- két tárgylemez, alkohollal letörölve
- véralvadásgátlót tartalmazó vérminta

Eljárás:

1. Cseppentsen egy nagyon kis csepp vért egy tárgylemez egyik végéhez.
2. Helyezze rá egy másik tárgylemez végét az elsőre úgy, hogy a tárgylemez rövidebbik oldala közvetlenül a vércsepp alatt legyen.
3. Tartsa a második tárgylemezt 30°-os szögben.
4. Tolja a második tárgylemezt úgy, hogy az éle alig érintse a vércseppet; kapillárishatás révén egy vékony vércsík fog végigterjedni a tárgylemez élén.
5. Gyorsan tolja a kenetet készítő lemezt végig a mintát tartalmazó lemez teljes hosszában egy folyamatos mozdulattal (a kenetnek egy "hullámos véggel" kell végződnie).
6. Szárítsa meg levegőn és fesse meg (Diff Quick).

A levegőn megszáritott tárgylemezeket metanolban fixálják 5 – 10 percig, azután Giemsa, Diff-Quick, Hemocolor vagy egyéb, a kereskedelemben kapható, előregyártott oldattal festik meg, hogy az egysejtű tulajdonságai felismerhetőek legyenek. Megjegyzendő, hogy a rosszul tárolt festékből eredő műtermékek fals pozitív eredményekhez vezethetnek.

4.1.2. A vérkenetekben kimutatható kórokozók

Piroplasmafélék

Az egysejtű a vörösvértestekben helyeződik. A fülkagylóból vagy a fark végéből vett perifériás kapilláris vér, vagy egy buffy coat készítmény (lásd 4.2.) nagyobb mennyiségű parazitát tartalmazó sejtet eredményezhet, és a heveny betegség gyorsabb diagnosztizálását teszi lehetővé már a beteg állat első vizsgálatakor. Idült esetekben a parazitémia általában gyenge. A vörösvértesteken belül lévő merozoiták mérete alapján - nagy (>3 µm) és kicsi (<3 µm) – a *Babesia* és a *Theileria* fajok elkülöníthetőek (lásd 5. táblázat), de molekuláris vizsgálat szükséges a hiteles differenciáláshoz, mert a nagy *Babesia* atípusos, kis formákban is jelen lehet. A különböző *Babesia* fajok általában alaktani alapon elkülöníthetőek egymástól a merozoiták száma, az általuk bezárt szög és a vörösvértestben elfoglalt helyzetük alapján (lásd az 5. táblázatot). Az eset körtörténete (az endémiás területen töltött idő, kullancsfertőzés), a klinikai tünetek és egyéb diagnosztikai eljárások, például a szerológiai áthangolódás és a DNS kimutatása (lásd 4.5.) alátámaszthatja a diagnózist.

Egyes országok nemzeti szabályozást írnak elő a lovak importjára és a lovak piroplasmosisának vizsgálatára.

5. táblázat: Kutyák, macskák és lovak piroplasma-féleségeinek alaktani azonosításához szükséges diagnosztikai jellemzők.

A kórokozóképesség, vektorok és az előfordulási gyakoriság részleteiért lásd az ESCCAP 5. Irányelvét:
A kutyák és macskák vektor közvetítette betegségei elleni védekezés.

Piroplasma-félék kutyákban			
	Méret (merozoitáké)	Helyeződés a vörösvértestben	Szög/egyéb
<i>Babesia canis</i>	nagy	középen	heveny
<i>B. vogeli</i>	nagy	középen	heveny
<i>B. rossi</i>	nagy	középen	heveny
<i>B. gibsoni</i> és <i>gibsoni</i> -szerű	kicsi	középen	-
<i>B. conradae</i>	kicsi	középen	-
<i>B. vulpes</i> *	kicsi	középen	-
Piroplasma-félék macskákban			
<i>B. felis</i>	kicsi	középen	Máltai kereszt
<i>Babesia</i> spp.	nagy	középen	-
<i>Cytauxzoon</i> spp.	kicsi	változó	pálca- vagy vesszőalakú
Piroplasma-félék lovakban			
<i>B. caballi</i>	nagy	középen	heveny
<i>Theileria equi</i>	kicsi	változó	pleomorf (1-4-merozoita, közte máltai kereszt)

* A *Babesia vulpes*-hez tartozik a korábban használt *Theileria/Babesia annae* és a *Babesia microti*-szerű.

Hepatozoon spp.

A *Hepatozoon* spp. vektor közvetítette (fertőzött kullancsok száján át történő felvételével) egysejtű ágensek. Európa meleg éghajlatú területein a *Hepatozoon canis* a kutyák közösleges parazitája, míg a *Hepatozoon americanum* az USA-ban fordul elő kutyákban. A *Hepatozoon felis* és *H. silvestris* ritka macskaélősködők. Ritkán a *H. canis* is megtalálható macskákban. A gamonták főleg a neutrophyl granulocytákban találhatók, a vérkenetben jellegzetes, téglalakú szerkezetként tűnnek fel.

A *Dirofilaria* és egyéb filarioida fonálférgék lárvái (mikrofiláriái)

A kórokozó (*D. immitis*, *D. repens*) és nem kórokozó filarioida fonálférgék mikrofiláriái megtalálhatóak a vérkenetekben, ezért differenciálni kell őket (lásd. 4.4.).

Rickettsiák (Anaplasmataceae)

Az *Ehrlichia* spp. vektor közvetítette, Gram-negatív, obligát intracelluláris baktériumok. Európában az *Ehrlichia canis* a kutyák monocytás ehrlichiózisének (CME) kórokozója. Ez a kórokozó főleg monocytákat fertőz meg, ahol a jellegzetes, de ritkán megfigyelhető mikrokolóniák (morulák) fejlődnek. A *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* a kutyák neoehrlichiosisának kórokozója. További *Ehrlichia* spp. (*E. chaffeensis*, *E. ewingii*) endémiásak a trópusi és dél-amerikai területeken és ritkán azonosítják őket Európában. Az *Ehrlichia canis* vagy közeli rokon fajtát leírták macskákban, de ennek állategészségügyi jelentősége nincsen.

Az *Anaplasma* spp. vektor közvetítette, Gram-negatív obligát intracelluláris baktériumok. Európában az *A. platys* írták le házi kutyákban és az *A. phagocytophilum*ot kutyákban, macskákban, lovakban és másokban. A vérlemezkéket (*A. platys*), vagy elsősorban a neutrophyl granulocytákat (*A. phagocytophilum*) fertőzik meg, és jellegzetes mikrokolóniákat (morulákat) képeznek, amelyek a heveny szakaszban fénymikroszkóp alatt megfigyelhetőek.

A *Mycoplasma* spp. (más néven *Haemobartonella* spp.) kicsi, Gram-negatív baktériumok, amelyek a vörösvértestek felületéhez csatlakoznak, így a *Mycoplasma haemocanis*, illetve a *M. haemofelis* kutyákban, illetve macskákban. További nem kórokozó fajokat is leírtak, főleg macskákban: a *Candidatus Mycoplasma haemominutum*ot és a *Candidatus Mycoplasma turicensis*et, de kutyában is írtak le: a *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*ot. A DNS-azonosítási eljárások segítik a kimutatást és lehetővé teszik a differenciálást.

4.2. Buffy coat módszer

Ehhez az eljáráshoz egy mikrohematokrit csövet feltöltenek EDTÁ-s vérrel, egyik végén lezárják és egy hematokrit centrifugában centrifugálják 5 percig. A trypanosomák és a mikrofiláriák a buffy coat ("határ réteg") és a plazma közötti zónában halmozódnak fel. A fehérvérsejtek az *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia* spp. vagy *Hepatozoon* spp. körül koncentrálnak. Mivel a *Babesia* spp. inkább reticulocytákat fertőz, mint érett vörösvértesteket, kimutatásuk a buffy coat-ból érzékenyebb, mint teljes vérből. A mikroszkópos vizsgálathoz a hematokritcsövet a buffy coat magasságában megkarcolják egy kis üvegvágóval és eltörik, hogy a buffy coat réteget és a plazmát tárgylemezre tudják tenni. Hozzáadnak egy csepp fiziológiás sóoldatot, vagy festett kenetet készítenek, hogy a parazitákat láthatóvá tegyék.

4.3. Vékonytű-aspirátumok

4.3.1. Általános információk

Egyes egysejtűek és vektor közvetítette kórokozók obligát intracelluláris lakói a lymphocytáknak/ monocytáknak/ macrophagoknak. Így a hematopoietikus szövetek (pl. nyirokcsomók, csontvelő, lép) aspirálása fontos lehet kenetekben történő alaktani azonosításukhoz és/vagy biomolekuláris elemzés céljára történő anyaggyűjtéshez. A belső szervekből, pl. májból történő vékonytű-aspiráció is használható az *Echinococcus* spp. (alveoláris és cisztás echinococcosis) metacestodáival kialakult fertőzés diagnózisára. Ha erre a célra a lépet használják, az aspirációt negatív nyomás nélkül kell végezni a vérzés elkerülése érdekében.

Szükséges anyagok:

- 15 ml-es fecskendő
- 22 – 20 g-s tű
- üveg tárgylemezek

Eljárás:

1. Vezesse be a tűt a szövetbe és képezzen negatív nyomást a fecskendőben a dugattyú 5-10 ml-rel történő visszahúzásával.
2. Tartsa fenn a negatív nyomást, számos irányba irányítsa a tűt anélkül, hogy a hegyét kihúzná a szövetből.
3. Engedje fel a fecskendő dugattyúját és húzza ki a tűt a szövetből (ne húzza ki a tűt a szövetből anélkül, hogy a dugattyút elengedné, mert különben az összes összegyűjtött anyag beszívódik a fecskendőbe).
4. Vegye le a fecskendőt a tűről és szívja tele levegővel.
5. Újra tegye rá a fecskendőt a tűre és használja a levegőt arra, hogy a mintát egy vagy több tárgylemezre kinyomja a tűből.
6. Készítsen kenetet, szárítsa és fesse meg, ahogy a vérkenet esetében (lásd 4.1.).

4.3.2. Vékonytű-aspirátummal kimutatható kórokozók

Leishmania infantum

A nyirokcsomó-aspirátumok, főleg lymphadenopathiás állatok esetében a legmegfelelőbbek, míg a csontvelő- és lép-mintavétel invazívabb, de megokolt lehet fertőzött, de klinikailag egészséges kutyák esetében.

Amastigoták a jellegzetes "T" alakú maggal/kinetoplast-struktúrával láthatóak a monocyták/macrophagok citoplazmájában, és a kenetben szabadon is előfordulnak.

Amikor sántítás is van, az amastigoták az ízületi folyadékból vett vékonytű-aspirátumban is láthatóak.

A bőrléziókból vett vékonytű-aspirátum is megfelelő módja a *Leishmania* amastigota-fertőzés citológiai kimutatására macrophagokban.

Ehrlichia canis

A mikroszkópos kimutatás érzékenysége jobb lehet a nyirokcsomókból, csontvelőből vagy lépből vett vékonytű-aspirátumokban vagy a buffy coat preparátumokban a vérkenethez képest, de jelenleg a diagnózis ajánlott módja a PCR-rel történő DNS-kimutatás.

4.4. Mikrofiláriák kimutatása és azonosítása

4.4.1. Általános információk

A társállatok filarioida fonálféreg okozta fertőzöttségének diagnosztizálása történhet a keringő mikrofiláriák izolálásával és alaktani azonosításával. A vérminták dúsítást követően Knott-féle teszttel vizsgálhatóak, vagy szűréses módszerrel (kereskedelmi vizsgálókészlet: Difil-Test®). A nedves vérkenetek nem teszik lehetővé a faji szintű azonosítást és igen gyenge az érzékenységük.

Fontos kiemelni, hogy a keringő mikrofiláriák száma nincs szükségszerűen korrelációban a kifejtett féregterheléssel, így az erősen mikrofiláriás kutyákban lehetséges, hogy csak kevés kifejtett féreg van. Ezen kívül a vérvétel időpontja is befolyásolhatja a mikrofiláriák kimutatásának érzékenységét: Mind *D. repens*, mind *D. immitis* esetében leírták, hogy az éjszakai órákban erősebb a microfilaraemia.

A mikrofiláriák morfometriás mérésekkel elkülöníthetők savas foszfatáz festéssel vagy, főleg a kétes esetekben, biomolekuláris módszerekkel, amelyek lehetővé teszik a faji szintű azonosítást a teljes vérből történő DNS-izolálással és a mikrofiláriák centrifugálással történő dúsításával. A keringő mikrofiláriák alaktani azonosításának vannak bizonyos korlátai. Ezek közé tartozik a különböző fixálási technikák lárvaméretre gyakorolt hatása, a rossz saválló festési technika egy mintában lévő lárvá alikuot esetén, és különböző fajtájú, aránytalan számú lárvák okozta társfertőzések esetén. A fajtaspecifikus (valós idejű) PCR a fajták elkülönítésére választandó módszer.

Végül, jóllehet a szívféreg-fertőzés (*D. immitis*) megbízhatóan diagnosztizálható szerológiával, mindig ajánlatos keringő mikrofiláriákra is vizsgálni.

Amicrofilaraemiás vagy antigen-kimutatással negatív, de a dirofilariosisnak megfelelő klinikai képet produkáló macskákban az ellenanyag-kimutatás a fertőzés bebizonyításának egy alternatív módszere.

4.4.2. A Knott-féle teszt

Ez a módszer centrifugálással bekonzentrál minden mikrofiláriát, ami 1 ml EDTÁ-s vérben jelen van. Ezeket aztán metilénkékkel megfestik.

Lényegében 1 ml EDTÁ-s vért 9 ml 2%-os formalinnal hígítanak, és az oldatot percekig keverik. Ezután 390 x g-n 5 percig centrifugálják. A felülúszót eltávolítják és egy csepp 1%-os metilénkékkel adnak az üledékhez a morfometriás elemzéshez, vagy a savas foszfatáz aktivitását vizsgálják, jóllehet a mikrofilária azonosítás általános módszere jelenleg biomolekuláris (lásd 4.4.1.) A tárgylemezeket 40x-es nagyítással nézik lárvák jelenlétére, és 100x-os nagyítással az alaktani sajátságokra. A maximális érzékenység érdekében a teljes üledéket vizsgálni kell.

4.4.3. Módosított Knott-féle teszt

A másik lehetőség, hogy az élő mikrofiláriák gyorsabban kimutathatóak mozgásuk alapján, amikor a módosított Knott-féle tesztet használják. Ehhez négy csepp 2%-os szaponin oldatot és 5 ml desztillált vizet adnak az 1 ml EDTÁ-s vérhez, hogy a vörösvértesteket roncsolják. A szuszpenzió mikroszkóp alatt vizsgálható, ahogy az fentebb szerepel. Az élő lárvák mozognak és mikroszkóposan könnyen kimutathatóak (40x-es nagyítás).

4.4.4. Szűrési módszer (Difil-Test®)

Ez a kereskedelemben kapható kit az 1 ml EDTÁ-s vérben található mikrofiláriákat egy olyan szűrőre koncentrálja be, amelynek területe körülbelül akkora, mint egy fedőlemez. Ezzel a technikával a mikrofiláriák sziluettje inkább egyenes mint összetekeredett vagy hullámos.

A kit tartalmaz lizáló oldatot, festéket, szűrőket és egy kazettát. Lényegében az eljárás a következő:

- A szűrőt a szűrőkazetta aljára kell helyezni, és a kazettát össze kell állítani.
- 1 ml vért adnak a 9 ml lizáló oldathoz egy nagy fecskendőben, és elkeverik. A hemolizált vért keresztülprésselik a szűrőkazetta szájadékára helyezett szűrőn.
- A szűrőt leöblítik oly módon, hogy a szűrőkazetta szájadékán azonos mennyiségű vizet nyomnak át.
- A szűrőkazettát kinyitják, a szűrőt kiveszik, és mikroszkóp tárgylemezre helyezik.
- A kithoz mellékelt festékből egy cseppet a szűrőre tesznek.
- A festék eloszlása érdekében fedőlemezt tesznek a szűrőre és a tárgylemez leolvasásra kész.

4.4.5. Savas foszfatáz festés

Számos különböző tulajdonság van, amely a *D. immitis* és a *D. repens* (és a nem kórokozó filarioida nematodák) mikrofiláriáinak elkülönítésére alkalmas. Ez különösen fontos azokon a területeken, ahol mind a *D. immitis*, mind a *D. repens* jelen van (Lásd ESCCAP 5. Irányelv: A kutyák és macskák vektor közvetítette betegségei elleni védekezés).

A különböző filarioida nematodák mikrofiláriái foszfatáz-festődési mintázatuk alapján különíthetők el (lásd 6. táblázat).

- A *D. immitis* mikrofiláriája két foltot mutat (az excretoros és a végbélpórus);
- A *D. repens* mikrofiláriáján csak egy folt van (végbélpórus);
- Az *Acanthocheilonema dracunculoides* mikrofiláriája három enzimaktivitásos területet mutat (végbélpórus, belső test, excretoros pórus); és
- Az *A. reconditum* mikrofilária diffúz világosvörös mintázatot mutat.

Kereskedelmi kitek kaphatóak laboratóriumi vizsgálatra. Azonban a festési módszereket ma már fokozatosan kiváltja a bekonzentrált mikrofiláriákból végzett DNS-izoláció.

4.4.6. Mikrofilária méretek

Fentiek mellett a mikrofiláriák méretei segíthetnek elkülönítésükben: e célból az átlagos hosszat 10 lárva alapján kell meghatározni (Lásd még ESCCAP 5. Irányelv: A kutyák és macskák vektor közvetítette betegségei elleni védekezés). Megjegyzendő, hogy az előkészítés (főleg a fixálási technika) jelentős mértékben megváltoztathatja a mikrofiláriák hosszát és tulajdonságait.

6. táblázat: Mikrofiláriák alaktani elkülönítése hossz, szélesség és alak alapján

Faj	Hosszúság (μ)	Szélesség (μ)	Jellemzők
<i>Dirofilaria immitis</i>	301,77 ± 6,29 290–330	5–7	Nincs hüvely, a feji vég hegyes, a fark egyenes hegyes véggel. APh-S: két aktivitási folt van a végbél- és az excretoros pórus körül.
<i>D. repens</i>	369,44 ± 10,76 300–370	6–8	Nincs hüvely, a feji vég tompa, a fark éles és fonalszerű, gyakran esernyőnyélszerű végződéssel. APh-S: egy folt a végbélpórus körül.
<i>Acanthocheilonema reconditum</i>	264,83 ± 5,47 260–283	4	Nincs hüvely, a feji vég tompa egy kiugró feji hurokkal, a farki gomb hurokszerű és hajlott. APh-S: aktivitás a teljes testben.
<i>A. dracunculoides</i>	259,43 ± 6,69 190–247	4–6,5	Hüvely, a feji vég tompa, a farki vég éles és megnyúlt. APh-S: három folt, közötte egy, amelyik a test középső részén van.

¹ Mikrofiláriák (n=10) amelyeket a Knott-féle teszthez elvégzett koncentrált követően megmértek; amikor a Difil® tesztet alkalmazzák, a testhosszak rövidebbek. APh-S: savas foszfatáz festés.

4.5. Biomolekuláris kimutatási és differenciálási módszerek: polimeráz láncreakció (PCR) és hurokközvetített izotermikus amplifikáció (LAMP)

4.5.1. Általános információk

A polimeráz láncreakció (PCR) egy egyre növekvő népszerűségű és hatékony laboratóriumi módszer számos betegség diagnosztizálására. Specifikus, és a vizsgálati anyagtól és a fertőzés stádiumától függően nagymértékben érzékeny is, és segíteni tudja a gyakorló orvost az aktív fertőzések diagnosztizálásában, amikor a klinikai tünetek felkeltik a gyanúját. Javallott vektor közvetítette kórokozók és paraziták esetében, amelyek érzékeny kimutatást és/vagy differenciálást igényelnek az alaktani vizsgálatokon felül.

Ha PCR-eket diagnosztikára és nem differenciálásra használnak, az érzékenység, egyebek között a célgén kópiaszámától függ.

PCR-t csak erre szakosodott laboratóriumokban végeznek. A pontos eredmények ezért a korrekt mintavétel, tartósításon és mintaküldésen múlnak. Ha két különböző PCR-protokollt alkalmaznak, az fokozhatja az érzékenységet és a specifitást.

Az általános útmutatáshoz az alábbiak tartoznak:

- Mivel a PCR rendkívül érzékeny, a minták keresztfertőzése elkerülendő. Amikor csak lehetséges, a mintákat egyszer használatos felszerelésben kell szállítani és tárolni.
- A mintákat hűtve kell tárolni (4°C-on), és jégakkumulátorral postázni, vagy folyamatosan fagyasztva kell tartani -20°C-on vagy hidegebben.
- A mintáknak a mintavételt követően legfeljebb 3 napon belül a laboratóriumba kell érniük.

A hurokközvetített izotermikus amplifikáció (LAMP) egy egycsöves technika a DNS amplifikálására. Egyszerűsége és olcsósága miatt a LAMP-et már klinikusok is alkalmazzák egyes kórokozók kimutatására, akár egyszerű szűrővizsgálatként a terepen, akár az állat mellett. Egyes cégek gyártanak reagenseket/kiteket, amelyek a kereskedelemben kaphatóak. A PCR technológiával szemben, ahol a reakció egymást váltó hőmérsékletű lépések vagy ciklusok során alakul ki, az izotermikus amplifikáció állandó hőmérsékleten történik, és nem igényel ciklikus fűtő/hűtőberendezést. Megfigyelték, hogy a LAMP kevésbé érzékeny a komplex mintákban, így vérben vagy bélsárban lévő gátlóanyagokra, mint a PCR, valószínűleg a más típusú DNS-polimeráz (általában Bst – *Bacillus stearothermophilus* – DNS-polimeráz a PCR-ben használt Taq-polimeráz helyett) alkalmazása miatt.

A DNS-kivonást gyakorlatilag bármilyen szubsztrátból el lehet végezni, de a leggyakrabban vizsgált minta vér és szöveti aspirátum.

Vér:

Számos vektor közvetítette kórokozó, így az *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Bartonella* és *Babesia* diagnosztizálható DNS-ük perifériás vérből történő meghatározásával. A PCR-t arra is használják, hogy kimutassák és differenciálják a filarioida fajokat, amelyek mikrofiláriákat bocsáthatnak a véráramba.

Sok PCR-protokoll van vérről és minden laboratóriumnak megvan a sajátja, beleértve a legjobb véralvadást gátló használatát. A legtöbben az EDTA-t kedvelik, de ezt jobb a kiválasztott laboratóriumnal megbeszélni. Legfeljebb 0,5 – 1 ml vér általában elegendő.

Szöveti aspirátumok:

A *Leishmania infantum* és az *Ehrlichia* a nyirokszervekben van jelen, és a PCR-vizsgálathoz vékonytű aspiráció használható. Vezető emellett bőrbioopszia a *Leishmania* PCR-vizsgálatához. Az aspirálást követően az aspirátum szűrőpapírra vagy vattatamponra fecskendezhető, amely azután steril kémcsőben 4°C-on tárolható. Ha tárgylemezre helyezik az anyagot kenet készítve, a vizsgálat érzékenysége gyengébb lesz.

Paraziták:

Lehetnek olyan alkalmak, amikor egyedi élősködők molekuláris azonosítása szükséges (férgek, ízeltlábúak). Ezeket 70%-os etilalkoholban kell tárolni és levegőtől elzárt edényzetben szállítani.

Bélsár:

Bélsármintákat közvetlenül is használnak az egyes parazita stádiumok DNS-ének kimutatására. Például a *Tritrichomonas foetus* kimutatása macskabélsárból ajánlottabb módszer, mint a bélsártenyészetből történő dúsítás (lásd 1.2.13.). Jelenleg koproPCR-t használnak az *E. multilocularis*, a különböző coccidiumok (pl. *Toxoplasma/Hammondia*), *Cryptosporidium* és *Giardia*) kimutatására.

Azon fajta- vagy genetikai elkülönítést igénylő paraziták esetében, amelyeknél az alaktani vizsgálat nem segít, pl. *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Toxoplasma/Hammondia* oociszták, orsóféreg vagy Taeniidae peték esetében, a genotipizálás (bélsárból vagy az izolált parazitákon) segíthet a zoonotikus faj vagy genotípus, stb. meghatározásában. Bzonyos esetekben, amikor a parazitastádiumok kis számban vannak jelen, vagy amikor a DNS kivonása nehéz (pl. Taeniidae vagy orsóféreg peték, lásd alább), a bélsárban lévő parazita stádiumokat ideális esetben előtte be kell dúsítani. Például a felszindúsítás vagy az sorozatos szűrési módszer alkalmazható (lásd lentebb).

Felszindúsítás és sorozatos szűrés:

A féregpeték a bélsárból dúsíthatók a cinkklorid oldattal történő felszindúsítás és az azt követő sorozatos szűrés technikájával, amikor csökkenő résméretű szűrőket alkalmaznak (21–200 µm). Így, ha a megfelelő résméretű szűrőt alkalmazzák utolsónak, a peték (főleg a Taeniidae peték és a *Toxocara* peték elkülönítéséhez) bekoncentrálhatók, ami pl. DNS-izolálást tesz lehetővé.

4.5.2. Specifikus információk

Elvben minden releváns parazita kimutatható vagy megerősíthető PCR-rel, vagy más genetikai módszerekkel. Számos, fertőző ágensek egyidejű automatizált kimutatását ajánló gép van már a piacon, de állategészségügyi téren nem validálták őket.

Az irodalom szerint, parazitától függően, a következő lehetőségek állnak rendelkezésre:

- specifikus primerek meghatározott parazitafajok számára, amelyek csak az érintett nemzetséget és/vagy fajt replikálják;
- különböző (specifikus) primereket kombináló multiplex PCR;
- hagyományos PCR, illetve valós idejű PCR; és
- LAMP.

Amikor egy PCR-terméket megkapnak, a termék mérete alapján gélelektroforézissel azonosítható (restrikciós enzimmel végzett előzetes fragmentálással vagy anélkül), vagy a nukleotidasorrend szekvenálásával és összehasonlításával a rendelkezésre álló génszekvenciákkal.

Értelmezés:

Minden PCR-eredményt értelmezni kell, a klinikai kritériumokkal és egyéb diagnosztikai tesztekkel összefüggésben.

Néhány példa a teljesség igénye nélkül:

Protozoa

Leishmania infantum

PCR használható mind a fertőzés diagnosztizálására, mind a kutya leishmaniosisra kezelt kutyáknál a folyamatban lévő kezelés nyomon követésére. Számos laboratórium emellett ajánl kvantitatív PCR-t (valós idejű, stb.), amely utalhat a parazitamennyiségre, és a parazitaterhelés növekedésére/csökkenésére. Ezek szintén hasznosak a kezelésre adott válasz monitorozására.

Jóllehet szöveti aspirátumok (nyirokcsomók, lép, csontvelő) vagy bőrminták (bőrléziók esetén) a *L. infantum* esetén választandó minták, a laboratóriumok vérminták elemzését is végzik. Van bizonyos aggodalom a fals negatívok tekintetében (a parazitát rejtő vérben nincsenek fehérvérsejtek) a gyenge érzékenység miatt, bár a sok kópiában jelen lévő géneket megcélzó valós idejű PCR-ek érzékenysége kielégítőnek tűnik. A nem invazív technikákat, pl. kötőhártya-tamponokat ma szintén ajánlják. Ebből a célból mindkét szemből mintát kell venni, és a tamponmintáknak elegendő számú sejtet kell tartalmazniuk.

Babesia

A PCR érzékenysége jobbnak bizonyult, mint a vérkenet-vizsgálaté, különösen az idült fertőzésben szenvedő kutyák esetében. Azonban a fals negatív eredményeket nem lehet teljes mértékben kizárni. A faj és alfaj meghatározása (nagy vagy kis *Babesia*) fontos lehet a kezelési lehetőségek és a prognózis szempontjából.

Toxoplasma gondii

A macskák által ürített *Toxoplasma gondii* oociszták alaktanilag jószerével nem különböztethetők meg a rutin diagnosztika során a nem kórokozó *Hammondia hammondi* oocisztáitól. A macskák és köztigazdák szérumban lévő specifikus antigének szerológiai eljárásokkal történő differenciálása mellett PCR alkalmazható az oocisztákból, illetve a *T. gondii* húsból található bradyzoita cisztáiból. A toxoplasmosisnak megfelelő neurológiai tüneteket mutató kutyákban és/vagy macskákban az agy-gerincvelői folyadékából, illetve a csarnokvízből végezhető PCR.

Neospora caninum

A *N. caninum* oocisztái rendkívül rövid ideig és kis számban ürülnek a kutya bélsárral. Ugyanúgy, ahogy *T. gondii*/*H. hammondi* esetében, a *N. caninum* oocisztái alig különböztethetők meg a *Hammondia heydorni* (kutyák és rókák bélsarában fordul elő) oocisztáitól rutin diagnosztikával, és a *T.gondii*/*H.hammondi* oocisztáktól (macskabélsár-koprofágia esetén). Ezért PCR-vizsgálat javallott azonosításukra.

Klinikailag gyanús kutyákban szerológiai vizsgálat, izombiopsziával, liquor és/vagy agy-gerincvelői folyadék PCR-vizsgálata a diagnosztikai lehetőségek.

Giardia

Giardia-fertőzések esetén a klasszikus tesztek általában nem fajta-specifikusak. Ha a zoonotikus potenciál meghatározása érdekében meg kell határozni, multilokuszos PCR és szekvenálás végezhető.

Tritrichomonas

A *T. foetust* a macskabélsárban az egyéb trichomonas-féléktől PCR-rel érdemes megkülönböztetni, nem tenyésztéses parazita-kimutatási módszerekkel (InPouch[®], lásd 1.2.13.), azok hátrányai (hőmérséklet-érzékeny, idő) miatt.

Ízeltlábú vektorok közvetítette baktériumok

Bartonella

Jóllehet a bartonellosis diagnosztizálásának arany sztenderdje a hemokultúra, ez időigényes és drága lehet. A *Bartonella* DNS vér, szövet, agy-gerincvelői folyadék vagy csarnokvíz-mintákban is kimutatható. Ha a dúsító tenyésztést egy PCR amplifikáció követi, a kombináció érzékenysége jobb lesz.

Ehrlichia/Anaplasma

A pozitív PCR-eredmény általában megerősíti egy fertőzés jelenlétét ezeknek a kullancs közvetítette baktériumoknak az esetében. Azonban a negatív PCR-eredmény nem zárja ki a fertőzés fennállását.

Ahogy vércitológiával, az érzékenység jobbnak tűnik az *Ehrlichia* esetében PCR-rel, ha azt nyirokcsomó-, lép-, csontvelő-aspirátumból vagy buffy coat preparátumból végzik.

Férgék

Taeniidae peték

Echinococcus endémiás területen ajánlatos az *Echinococcus* spp-t differenciálni az egyéb Taeniidae petéktől a zoonotikus átviteli potenciál tisztázása érdekében. A peték izolálhatók felszindúsítással, ragasztószalagos technikával a végbélnyílás körül, a bélsár felszindúsításával majd sorozatos szűrésével, feltéve, hogy a járványvédelmi előírásokat betartják (felszerelés erre szakosodott laboratóriumokban). A PCR-t specifikus primerekkel végzik, a multiplex PCR különböző Taeniidae fajokat céloz meg, illetve széles skálájú féreg PCR is végezhető, amelyet szekvenálás követ.

Toxocara

Kimutatták, hogy a *Toxocara*-pozitív kutyák mintegy egyharmada *Toxocara cati* (syn. *mystax*) petéket ürít (koprofágiát követően). Ezek a peték elkülöníthetőek a *T. canis* petéktől peteméret meghatározással, vagy még megbízhatóbb módon, PCR-rel.

Tüdőférgék

Az *Aelurostrongylus abstrusus* a leggyakrabban előforduló macska tüdőféreg. Egyes országokban azonban, más tüdőférgék, így *Troglostrongylus* spp. és *Oslerus rostratus* is jelen lehet, és az L1-ek alaktani elkülönítése szakértelmet igényel. Másik megoldás lehet a bélsárból izolált L1-ek PCR-vizsgálata, vagy a légcsőtamponok vagy bronchoalveolaris lavage folyadék vizsgálata (gyengébb érzékenység).

A kutyák leggyakoribb tüdőférgének, az *A. vasorum*nak és *C. vulpis*nak az L1 lárvái alaktanilag könnyen elkülöníthetőek. Azonban alkalmanként segíthet, ha a megerősítésre biomolekuláris eljárásokat alkalmaznak.

Capillaria

A kutyák, macskák és egyéb emlősök különböző *Capillaria*-fajokat tartalmazhatnak, amelyek életciklusa is különböző. Taxonómiailag nincs mindegyikük véglegesen besorolva. A PCR segíthet a fajta meghatározásában.

Filarioida fonálférgék

Az EDTÁ-s vérből végzett fajspecifikus PCR a választandó módszer a mikrofiláriák faji differenciálásához (lásd 4.4.1.) bár az alaktani elemzés és a savas foszfátáz festés még mindig használatban lehet.

Aberráns férgék

Amikor az aberráns férgék alaktanilag nem elkülöníthetőek, vagy szövettanilag fixált mintákból kell azokat kivonni, alkalmazható PCR, ahogy szövettani festett készítmények vagy bőrkaparékok esetében is.

Ízeltlábúak

Azokban az esetekben, amikor az ízeltlábú alaktana kizárja azonosítását, DNS-alapú technikák alkalmazhatók.

Dermatophytonok

Egy kereskedelemben elérhető panel tartalmazza a *Microsporum* spp-t., *M. canis* és *Trichophyton* spp-t is, valós idejű PCR-teszttel, és mind érzékenysége, mind specifitása jó. Bőrkaparékok és/vagy szőr vehető és küldhető a laboratóriumba. Az eredmény néhány napon belül várható.

4.6. DERMATOPHYTON-KIMUTATÁS

4.6.1. Általános információk

A dermatophytosist különböző vizsgálatok és kiegészítő tesztek kombinációjával diagnosztizálják, így Wood lámpával (csak kutyák és macskák esetében) közvetlen vizsgálattal, hogy kimutassák az aktív szőrfertőzést, gombatenyésztéssel, hogy a részt vevő gombafajt azonosítsák, és a kezelésre adott válaszreakciót nyomon kövessék, és alkalmanként bőrbioopsziával a csomós vagy atípusos megjelenések esetében. A dermatophytonok PCR-rel történő kimutatása ma kutyák és macskák esetében lehetséges Európában (lásd 4.5.2.)

4.6.2. Szőrszálak közvetlen vizsgálata

A dermatophytosisok a szőrszálak mikroszkópos vizsgálatával kimutathatóak. Azonban a mintavételi technika és a vizsgáló szakértelme erősen befolyásolja az eljárás érzékenységét. Emellett, az optimális mintavétel és vizsgálat ellenére a fals negatív trichogramok (lásd 3.5.) nem zárhatóak ki. Ezért csak egy pozitív trichogram bír jelentőséggel. Káliumhidroxid (KOH) vagy ásványi olaj festékek (pl. laktofenol pamutkék) hozzáadásával vagy anélkül használható a gombaelemek job kimutathatósága érdekében. A dermatophyton gombákkal fertőzött szőrszálak általában megnagyobbodott és duzzadt szerkezetként tűnnek fel, durva, rendellenes felülettel. A szőrszál felülete általában gombaspóra klasztereket vagy láncokat (arthroconidiumok) mutat (2–4 µm a *Microsporum canis* esetében).

4.6.3. Wood lámpás vizsgálat

A szőrtakaró ultraibolya lámpás (Wood lámpa) vizsgálata kutyák és macskák dermatophytosisának jó szűrővizsgálati módszere. Amikor fénynek van kitéve a valamilyen dermatophyton fajttal, például a *M. canis*szal fertőzött szőrszál, zölden ragyog. A más dermatophyton fajtákkal fertőzött szőrszálak soha nem fluoreszkálnak és néhány helyileg alkalmazott kezelés elfedheti a fluoreszcenciát. Ezért a Wood lámpás vizsgálat után a negatív eredmények nem zárják ki a dermatophytosist. A fluoreszcencia jelenlétét meg kell erősíteni a szőrszálak mikroszkópos vizsgálatával (még akkor is, ha a fertőzött szőrszálak felismerése nem mindig könnyű, és tapasztalt szemet igényelhet) (4.6.2.).

4.6.4. Gombatenyésztés

A gombatenyésztés marad a legmegbízhatóbb technika a kutyák és macskák dermatophytosisának megerősítésére. A mintavétel történhet bőrkaparék-vétellel, szőrszálak kihúzásával (Wood lámpa alatt), vagy a szőrtakaró steril fogkefével, egy kis darab steril textillel vagy portörlővel történő végigkefélésével. Számos táptalaj (például a Sabouraud dextróz agar) megfelelő a gombatenyésztésre. A dermatophyton fajták, pl. *M. canis* telepei néhány nap alatt nőhetnek ki. Az állatgyógyászatban gyakran használnak dermatophyton teszt táptalajt (DTM). Azonban csak igen kevés alkalommal próbálták meg e táptalaj teljesítményét értékelni állatokról gyűjtött minták esetében, és a DTM használata önmagában, a makrokonidiumok mikroszkópos vizsgálata nélkül nem ajánlott az állati dermatophytosisok diagnosztizálására. Ideális körülmények között az állatokról levett anyagot állatorvosi mikológiában szakértő laboratóriumba érdemes küldeni. A laboratóriumban a gombatelepek mikroszkópos vizsgálatával specifikus azonosítást végeznek. A telepek száma segíthet különbséget tenni a mechanikai hordozó és a fertőzött állat között. A mechanikai hordozás szennyeződés és/vagy környezeti eredetű, és általában a tenyésztésben csak korlátozott számú dermatophyton teleppel jár. A fertőzést nagyszámú gombaspóra (arthroconidium) termelődéséhez vezet és általában nagyon sok dermatophyton telep látható a tenyésztésben.

1. FÜGGELÉK - HÁTTÉR

Az ESCCAP (Európai Társállatok Parazitáival foglalkozó Tudományos Tanácsadó Egyesület) egy független, nonprofit szervezet, amely a legújabb tudományos információk alapján útmutatókat állít össze, és a társállatok parazitái elleni védekezés és kezelés legjobb módjait hirdeti. Megfelelő tanácsaik alkalmazásával a betegség és az állatok és emberek közötti parazitaátvitel kockázata minimálisra csökkenthető. Az ESCCAP arra törekszik, hogy olyan Európát lásson maga előtt, ahol a társállatok parazitái többé nem jelentenek fenyegetést az állatok és emberek egészségére és jóllétére.

Európaszerte nagy a parazitaskála diverzitása és a paraziták relatív jelentősége is, az ESCCAP irányelvek összefoglalják és kihangsúlyozzák az Európa különböző részein fennálló különbségeket, és ahol az szükséges, specifikus védekezési intézkedéseket javasolnak.

Az ESCCAP hiszi, hogy:

- Az állatorvosoknak és társállat-tulajdonosoknak intézkedéseket kell tenniük kedvenceik parazitás fertőzések elleni védelmére.
- Az állatorvosoknak és társállat-tulajdonosoknak intézkedéseket kell tenniük, hogy a társállat-populációt megvédjék az utazásokkal járó kockázatoktól, és attól, hogy az utazások következtében a helyi parazita-helyzetet nem endémiás parazitafajok importjával vagy exportjával megváltoztassák.
- Az állatorvosoknak, társállat-tulajdonosoknak és a humán orvosoknak együtt kell működniük a parazitás betegségek zoonotikus átvitelével járó kockázatok csökkentése érdekében.
- Az állatorvosoknak tudniuk kell a társállat-tulajdonosoknak iránymutatást adni a parazitás fertőzésekről és betegségek kockázatairól, és azokról az intézkedésekről, amelyek meg-tehetők e kockázatok csökkentése érdekében.
- Az állatorvosoknak meg kell kísérelniük a társállat-tulajdonosok oktatását a parazitákról, hogy felelősen viselkedhessenek, nemcsak saját kedvencük, hanem más társállat-tulajdonosok és a közösségükben élő más emberek egészsége érdekében.
- Az állatorvosoknak, ahol az megoldható, a lehető legjobb tanács adása érdekében diagnosztikai tesztekkel kell végezniük a parazitás fertőzöttség stádiumának megállapítására.

Ezeknek a céloknak az elérése érdekében az ESCCAP kibocsát:

- Részletes irányelveket állatorvos doktorok és állatorvos parazitológusok részére.
- Az európai országok és régiók változó igényeihez alkalmazkodó irányelvek fordításait, kivonatait, adaptációit és összefoglaló verzióit.

Az ESCCAP irányelvek különböző verziói a www.esccap.org oldalon található.

Jogi nyilatkozat:

Mindent megtettünk annak érdekében, hogy a szerzők tapasztalatán alapuló irányelvekben található minden információ pontos legyen. Azonban a szerzők és a kiadók semmilyen körülmények között nem vállalnak felelősséget, garanciát semmi olyan következményért, ami az itt található információ félreértelmezéséből származik. Az ESCCAP hangsúlyozza, hogy a nemzeti, regionális és helyi szabályozásokat mindig szem előtt kell tartani, mielőtt az ESCCAP tanácsait követnék.

2. FÜGGELÉK – SZÓTÁR, RÖVIDÍTÉSEK ÉS HASZNOS HIVATKOZÁSOK

SZÓTÁR

Érzékenység	A valódi pozitív minták aránya (az “Arany Sztenderd” teszt alapján) vagy annak valószínűsége, hogy egy fertőzött állat milyen biztonsággal bizonyulhat pozitívnak egy vizsgálat során.
Érzékenység [%]	$\text{Valódi pozitív minták} / (\text{Valódi pozitív minták} + \text{Fals negatív minták}) * 100.$
Specifitás	A valódi negatív minták aránya (az “Arany Sztenderd” teszt alapján) vagy annak valószínűsége, hogy egy nem fertőzött állat milyen biztonsággal bizonyulhat negatívnak egy vizsgálat során.
Specifitás [%]	$\text{Valódi negatív minták} / (\text{Valódi negatív minták} + \text{Fals pozitív minták}) * 100.$
Közvetlen kimutatási módszerek	Magának a jelen lévő kórokozónak a kimutatása, vagy vizualizálással (pl. mikroszkóppal), a genetikai anyag kimutatásával (pl. PCR-rel vagy LAMP-pel), vagy a kérdéses parazitára jellemző molekulák kimutatása (pl. antigén, általában fehérjékből áll, különböző variációkban).
Közvetett kimutatási módszerek	Szerológiai módszerek, amelyek a fertőzés kiváltotta specifikus ellenanyagok kimutatásával meghatározzák azt, hogy a parazitával korábban érintkezett a szervezet. Mivel az ellenanyagok általában egy bizonyos idővel a fertőzés kezdete után képződnek, és a parazita távozása után vannak jelen legnagyobb mennyiségben, nem szükségszerűen utalnak aktív fertőzés fennállására. Az ellenanyagok kimutatása különböző módokon történhet, p. Western blottal, direkt vagy indirekt immunfluoreszcenciás assay-kkel, laterális áramlásos assay-kkel és másképp. A kimutatást jelölt másodlagos ellenanyagok használatával kivitelezik. Nem mindegyik ilyen teszt, de közülük több az ellenanyag-szintek kvantifikálását (titer) is lehetővé teszik, pl. a követő vizsgálatokban a fertőzés vagy kezelés során.

RÖVIDÍTÉSEK

CME	Kutyák monocytás ehrlichiosis
DFA	Direkt immunfluoreszcens assay
DTM	Dermatophyton teszt tápfolyadék
EIA	Enzim immüneassay
ELISA	Enzimkapcsolt immunszorbens assay
EPG	Grammonkénti peteszám
FECRT	Bélsár peteszám-csökkenési teszt
ICT	Immunkromatográfiás merülőpálcás teszt
IFAT	Indirekt immunfluoreszcens ellenanyag-teszt
KOH	Káliumhidroxid oldat
L1	Első stádiumú lárva
L3	Harmadik stádiumú lárva
LAMP	Hurokközvetített izotermikus amplifikáció
LPG	Lárvaszám grammonként
MIFC	Mertiolát-jód-formaldehid koncentráció
OPG	Oocisztaszám grammonként
PCR	Polimeráz lánreakció
SAF	Nátriumacetát-ecetsav-formalin
SAFC	Nátriumacetát-ecetsav-formalin koncentráció

HASZNOS HIVATKOZÁSOK

Hogy mérjük mikroszkóppal:

www.youtube.com/watch?v=CkcYrns-6I
www.youtube.com/watch?v=eu9OrNM_wY
www.youtube.com/watch?v=GdRLPAo_j1Y
parasitology.cvm.ncsu.edu/vmp930/m_keys.html

A módosított McMaster-féle peteszámlálási technika:

youtu.be/rkSGe-L4Sec

Az egyes parazitastádiumokról készült fotók a következő oldalakon láthatóak:

www.parasite.org.au/para-site/contents/toc.html
www.ksvdl.org/resources/news/diagnostic_insights_for_technicians/august2019/common-intestinal-parasites-pt1.html
www.ncvetp.org/parasite-image-database.html
quizlet.com/64375340/parasites-in-veterinary-medicine-flash-cards/



ISBN: 978-1-913757-57-1

Az ESCCAP magyarországi szervezete
a Társállatok Parazitáival foglalkozó Tudományos Tanácsadó Egyesület /TPTTE/,
regisztrálva Budapesten (Hungary) a Civil Szervezetek között.
Nyilvántart. szám: 01-02-0015854

Email: tptteescap.hu2017@gmail.com

www.esccaphungary.hu
www.esccap.org



4

Parazitológiai diagnózis macskákban, kutyákban és lófélékben

ESCCAP (European Scientific Counsel Companion Animal Parasites
/Európai Társállatok Parazitáival foglalkozó Tudományos Tanácsadó Egyesület/)
4. számú Irányelv (GL4), 1. kiadás – 2022. november