

Koprologické metody



Mgr. Radka Pecková
MVDr. Ivona Foitová, Ph.D.
Oddělení botaniky a zoologie

Koprologie

- ▶ soubor metod používaných v parazitologii k diagnostice parazitárních infekcí z trusu zvířete nebo ze stolice člověka
- ▶ jedná se o základní, jednoduchou, neinvazivní, časově nenáročnou a velmi efektivní formu diagnostiky (monitorování zdraví u divokých zvířat)
- ▶ principem je detekce vajíček helmintů, jejich larev či dospělců a exogenních vývojových stádií (oocyst, cyst, spor...) parazitárních protistů ve vzorcích trusu/stolice
- ▶ přestože u řady parazitů neprobíhá vývojový cyklus v zažívacím traktu hostitele, opouští vývojová stádia tělo parazitovaného jedince trusem/stolicí

Sběr a uchovávání vzorků

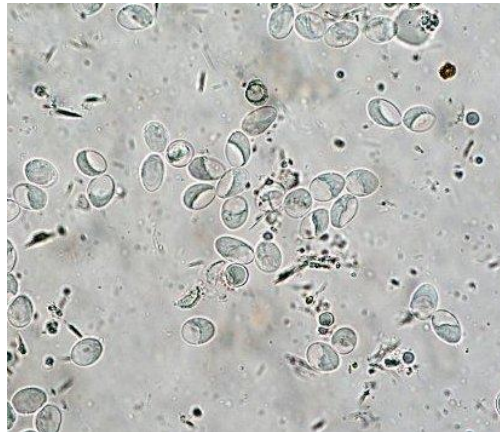
- ▶ čerstvý fekální materiál (z důvodu možného zkreslení výsledku vzhledem k omezení životaschopnosti trofozoitů parazitických prvoků nebo rychlému vývoji a líhnutí L1 larev některých nematodů během několika málo hodin či dnů)
- ▶ vzorky sbíráme do čistých nádob (sáčků), označíme druhem zvířete, datem odběru, lokalitou, věkem zvířete (důležité pro určování parazita)
- ▶ optimální množství materiálu je cca 10 g
- ▶ vzorky ihned zpracováváme nebo uchováme v chladnu či fixujeme (chemické směsi obsahující např. etanol, formaldehyd, k. octovou, k. propionovou, dichroman draselný, glutaraldehyd)

Makroskopická diagnostika

- ▶ slouží k detekci dospělců (škrkavek, roupů aj.) nebo jejich částí (článků tasemnic)
- ▶ zjištění neobvyklého vzhledu, barvy a konzistence, případně příměsi krve a hlenu v trusu může napovědět přítomnost parazitů

Nativní preparát

- ▶ přímá prohlídka stolice v kapce fyziologického roztoku, případně se přidává Lugolův roztok na obarvení cyst prvoků
- ▶ přítomnost pohyblivých stádií bičíkovců, nálevníků a měňavek
- ▶ identifikace na základě velikosti, tvaru, povrchových struktur a typického pohybu
- ▶ může se nechat zaschnout, fixovat a barvit (→ zvýraznění bezbarvých parazitů)



Dekantace

- ▶ resuspendování ve zvoleném objemu vody, sedimentace (desítky minut, případně centrifugovat), případně přefiltrování přes cedník, gázu nebo jiný síťovaný materiál
- ▶ pro lepší orientaci v nativním preparátu
- ▶ opakováním se docílí pročištění vzorku, přičemž parazitární útvary neustále procházejí sítí a klesají ke dnu nádoby

Tlustý roztěr

- ▶ diagnostika vajíček helmintů
- ▶ do kapky vody se rozmíchá určité množství stolice;
- ▶ směs se rozetře na sklíčku (vrstva má být tak silná, aby přes ni nebylo možno číst);
- ▶ roztěr se nechá zaschnout

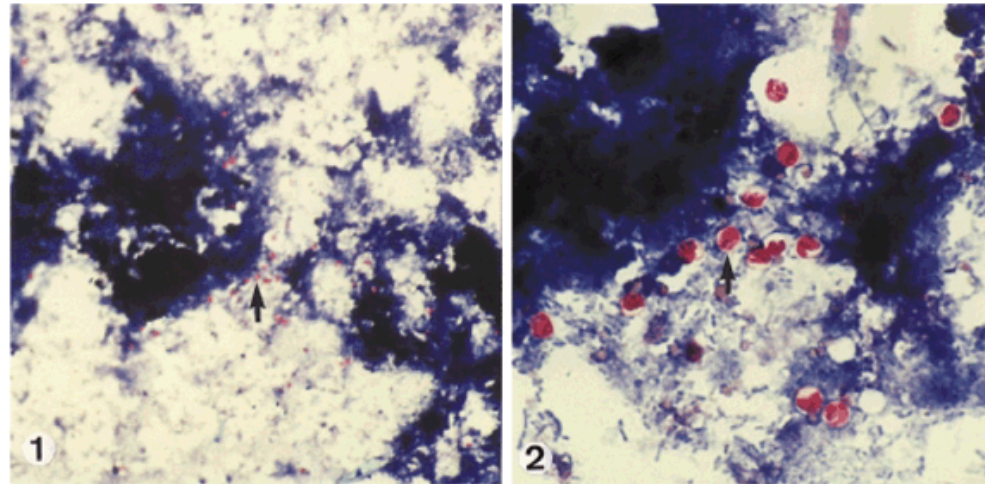


Fig. 1 and 2 - *Cryptosporidium* spp oocysts in fecal smear. Acid-fast staining using alcohol-chloride acid solution (250x and 1000x).

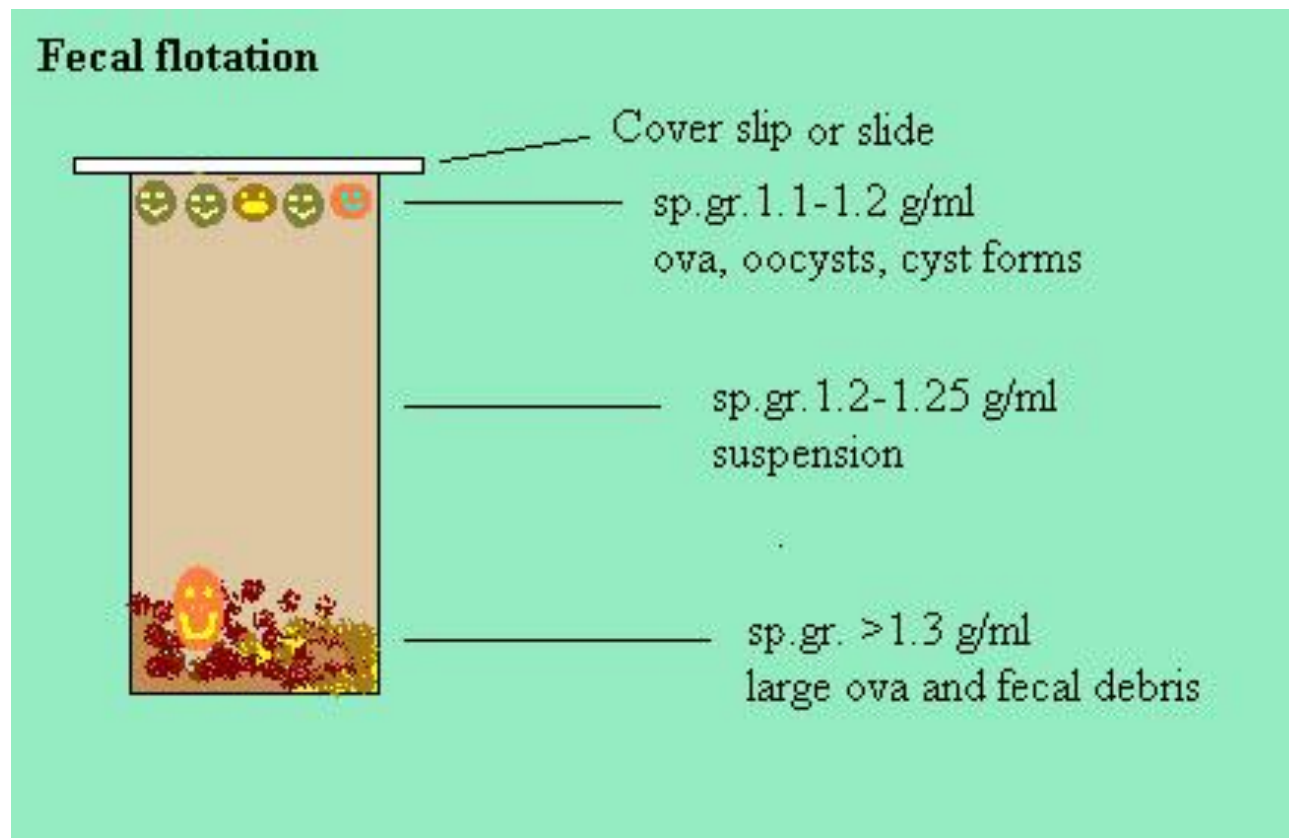
Koncentrační metody

1) Flotace

- ▶ metoda využívající rozdílných hustot parazitárních útvarů a použitého flotačního roztoku (vyšší hustota), takže parazitární útvary vyplavou na hladinu, odkud se sbírají a přenášejí na mikroskopické sklíčko
- ▶ preparáty se ihned prohlížejí
- ▶ detekce menších vajíček a larev hlístic, tasemnic a oocyst kokcidií
- ▶ např. Sheatherova metoda

Koncentrační metody

Flotace



Koncentrační metody

2) McMasterova kvantifikační metoda

- ▶ umožňuje vypočítat intenzitu infekce
- ▶ navazuje na flotační metodu, tekutina z hladiny se vlije do McMasterovy komůrky, pomocí čtverců v ní obsažených se vypočítá množství vývojových stádií parazitů v gramu trusu



Koncentrační metody

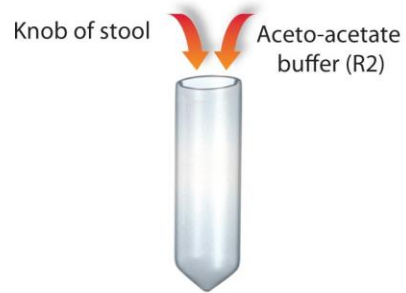
3) Sedimentace

- ▶ metody využívající gravitace a hustoty roztoku k tomu, že těžká vajíčka a cysty sedimentují na dno zkumavky
- ▶ pro zvýšení rychlosti sedimentace se často používá centrifugace za použití různých sedimentačně-koncentračních roztoků (složení použitých směsí umožňuje sedimentaci a čistí koprologický materiál od balastu, který ztěžuje prohlížení)
- ▶ detekce cyst prvoků a vajíček helmintů (motolic) a některých hlístic

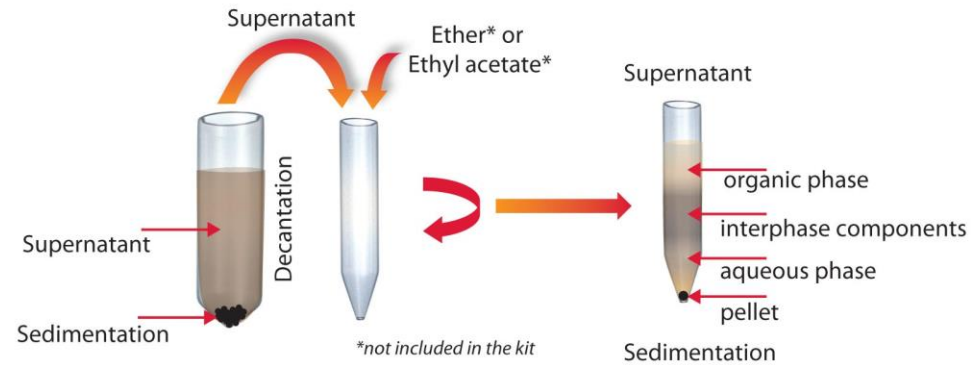
Koncentrační metody

Sedimentace

STEP 1: Preparation



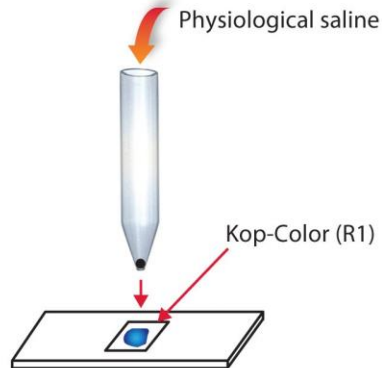
STEP 2: Centrifugation



STEP 3: Discard supernatant

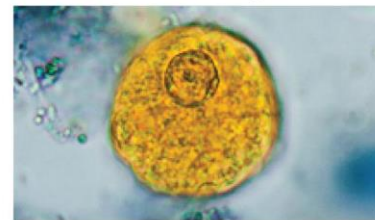


STEP 4: Slide preparation



STEP 5: Microscopic examination with blue filter

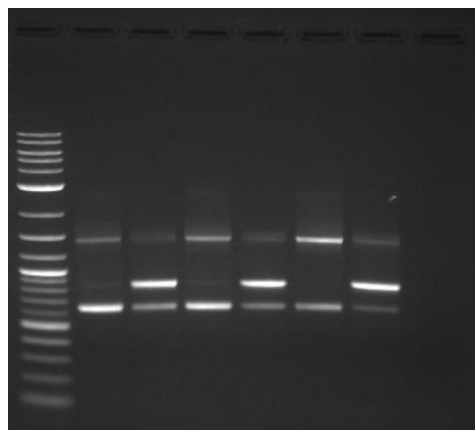
Parasites are yellow, yellow-orange or brownish-yellow on a more or less dark blue background



Entamoeba histolytica

Molekulární metody

- ▶ Izolace DNA
- ▶ PCR
- ▶ Elektroforéza
- ▶ Sekvenování



PRAKTICKÉ VYUŽITÍ V TERÉNU

Orangutan Health Project

- diverzita parazitů
- sezónnost parazitů
- komplex vztahů
parazit-hostitel
- potravní strategie
- sebe-medikační chování



Praktická část cvičení

- ▶ flotace vzorků odebraných od pískomilů a kryš malých (přítomnost cyst *Giardia intestinalis* a oocyst *Cryptosporidium proliferans*)
 - ▶ vzorky rozmělníme ve hmoždíři, prosejeme přes sítko do zkumavky, centrifugujeme 5 min./2500 otáček
 - ▶ supernatant slijeme, nalijeme cca 1-2 ml Sheaterova roztoku, rozmícháme, doplníme Sheaterovým roztokem, centrifugujeme
 - ▶ z hladiny bakteriologickou kličkou odebereme vyflotovaný materiál, přeneseme na podložní sklíčko, přikryjeme krycím sklíčkem, prohlížíme pod mikroskopem