

Koprologické metody

- vyšetření stolice/trusu na přítomnost parazitů



Mgr. Mária Seifertová, Ph.D.

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 používanou jak v humánní tak veterinární medicíně (monitorování zdraví u divokých zvířat)
- principem je detekce vajíček **helmintů**, jejich larev či dospělců a exogenních vývojových stádií (oocyst, cyst, spór) parazitárních **protist** ve vzorcích trusu/stolice
- přestože u řady parazitů neprobíhá vývojový cyklus v zažívacím traktu hostitele, opouští vývojová stádia tělo parazitovaného jedince trusem/stolicí (např. plicní hlístice rodu *Dictyocaulus*)
- Celou řadu parazitů, jejichž alespoň část vývojového cyklu neprobíhá v trávicím traktu (např. krevní parazité – *Plasmodium* – původce malárie), nelze pomocí koprologie detekovat



čerstvý trus



odběr vzorku



koprologické zpracování



Trichuris ovis

detekce parazitů pod mikroskopem

Přehled základních koprologických metod

1. Sběr a uchování vzorků

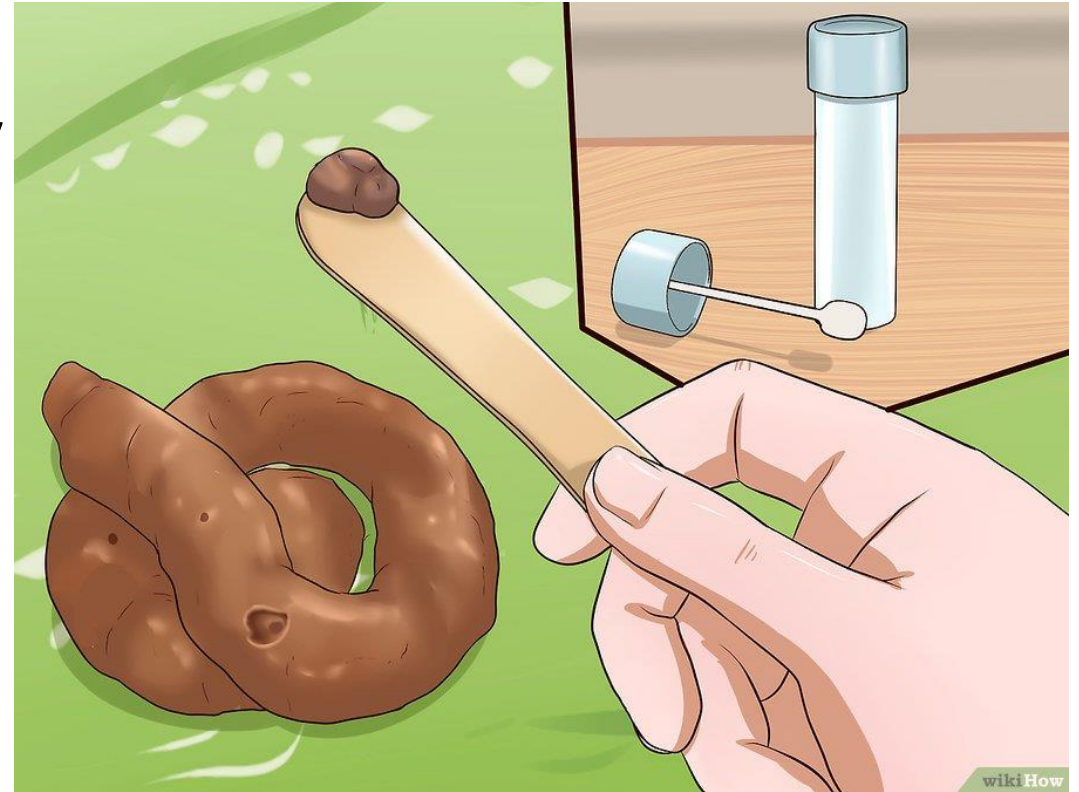
2. Makroskopická diagnostika

3. Mikroskopická diagnostika

- a) Přímé mikroskopické vyšetření – nativní preparát
- b) Dekantace
- c) Roztěry
- d) Koncentrační metody
 - Flotace
 - Sedimentace
- e) Larvoskopie

1. Sběr a uchování vzorků

- **čerstvý fekální materiál** (z důvodu možného zkreslení výsledku vzhledem k omezení životaschopnosti trofozoitů parazitických prvoků nebo rychlému vývoji a líhnutí L1 larev některých hlístic 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)
- je-li to možné, odběr vzorku od daného jedince provádět opakovaně (3 odběry, ob den)



2. Makroskopické vyšetření trusu

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

Konzistence: Trus měkký, vodnatý (průjem) nebo velmi tvrdý (zácpa). Stav trusu se ale bude lišit podle druhu zvířete. Například výkaly skotu jsou obvykle měkčí než výkaly koní nebo ovcí.

Barva: Neobvyklá barva např., světle šedá stolice může naznačovat nadměrné množství tuku ve stolici, což je příznak špatné absorpce střeva. U giardiózy může být vzorek stolice tukovitý a zpěněný.

Krev: V čerstvé stolici se může krev jevit jako tmavě hnědá až černá nebo může vykazovat červenou barvu spojenou s přítomností čerstvé krve. Krev ve stolici může být z důvodu amébové dysenterie, balantidiózy, schistosomózy nebo závažné infekce tenkohlavcem lidským (*Trichuris trichiura*).

Mucus: Hlen na povrchu čerstvých stolic může být spojen se střevním parazitismem nebo jiným metabolickým onemocněním.

Čerstvost stolice: Pokud jsou výkaly staré a suché, je třeba to poznamenat. Ve starých vzorcích nemusí být detekována protozoa a vajíčka parazitů, oocysty mohou sporulovat nebo mohou být přítomni pseudoparaziti.

Přítomnost parazitů: Někteří paraziti, nebo jejich části, jsou dostatečně velcí, aby je bylo možné pozorovat pouhým okem. Pravděpodobně nejčastější jsou proglotidy tasemnic, celé hlístice, nebo dokonce larvy členovců (střeček koňský (*Gasterophilus intestinalis*)).

Proglotidy tasemnice *Dipylidium caninum*



Dospělci roupů v trusu



Larvy malých strongyloidních hlístic



Gasterophilus intestinalis



3. Mikroskopické vyšetření trusu

- slouží k detekci a identifikaci **cyst** a/nebo **trofozoitů** **protozoí**. V případě helmintů mohou být nalezeny **vajíčka**, **larvy** nebo **segmenty**.



3. Mikroskopická diagnostika

a) Přímé mikroskopické vyšetření – Nativní preparát

- tato metoda je vhodná pro **rychlé orientační vyšetření trusu** (pro přesné výsledky je vhodné využít některou z koncentračních metod)
- přímá prohlídka stolice (nutné dodat **čerstvou stolicí** a dopravit ji při tělesné teplotě) v kapce fyziologického roztoku, případně se přidává Lugolův roztok na obarvení cyst prvoků
- přítomnost **pohyblivých stádií bičíkovců, nálevníků a měňavek** (hledáme pohybující se trofozoity prvoků (např. *Entamoeba histolytica*))
- v nativním preparátu můžeme nalézt i **vajíčka helmintů a cysty prvoků**
- identifikace na základě velikosti, tvaru, povrchových struktur a typického pohybu
- může se nechat zaschnout, fixovat a barvit (→ zvýraznění bezbarvých parazitů)

3. Mikroskopická diagnostika

a) Přímé mikroskopické vyšetření – Nativní preparát

Postup přípravy preparátu:

- na podložní sklo označené číslem vzorku kápneme kapku fyziologického roztoku nebo vody
- v kapce rozmícháme špejlí vzorek stolice do velikosti obilného zrna
- přikryjeme krycím sklíčkem a prohlédneme pod mikroskopem při zvětšení 100 - 400x

Pro lepší rozlišení parazitů a jejich vajíček lze tento preparát barvit speciálními barvivy nebo kapkou Lugolova roztoku. Podobně můžeme zhotovit nativní preparát z výtěrů.



3. Mikroskopická diagnostika

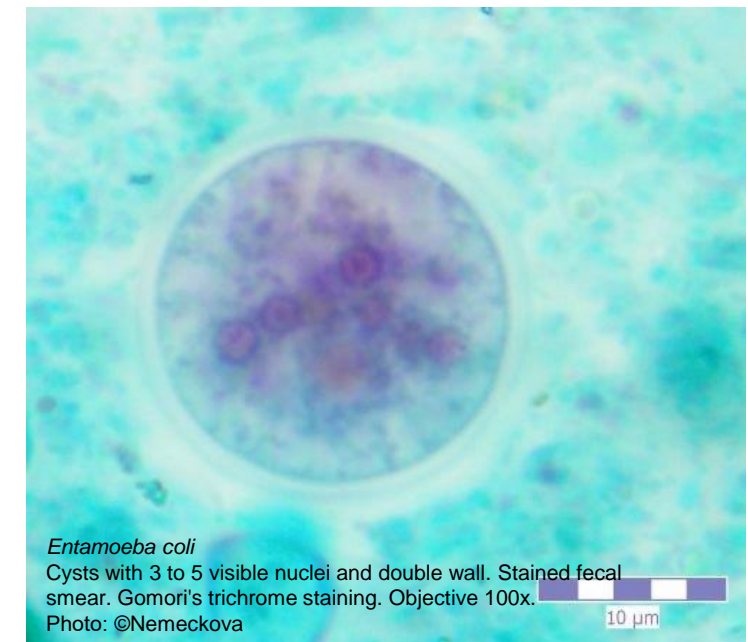
Trvalý barvený preparát

Gomoriho trichrom

- cysty a trofozoity prvoků nalezené při použití koncentračních metod je nutné určit, k čemuž nám pomůže barvení

Postup:

- špejlí rozetřeme vzorek na podložní sklíčko
- sklíčko dáme fixovat do první kyvety (sublimát alkohol) na minimálně 1 hodinu, nátěr nesmí zaschnout (během celého barvení!)
- barvíme
- preparát montujeme do kanadského balzámu

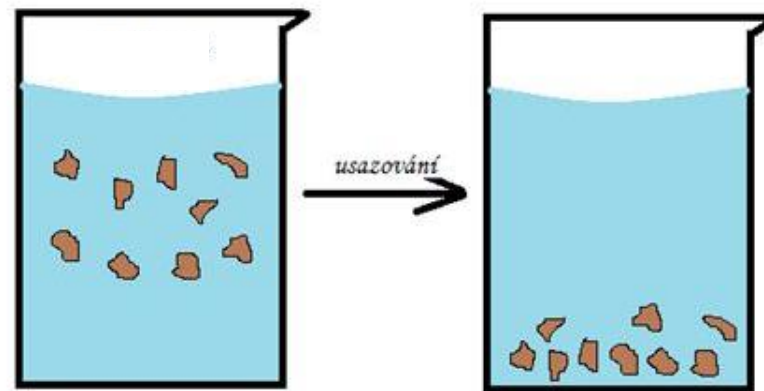


3. Mikroskopická diagnostika

b) Dekantace

Postup:

- *resuspendování stolice ve zvoleném objemu vody, nechat sedimentovat (desítky minut, případně centrifugovat), případně přefiltrovat 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*



3. Mikroskopická diagnostika

c) Tlusté roztěry

Tlustý roztěr dle Heina

- je vhodný pro diagnostiku vajíček mnoha druhů helmintů

Postup:

- *do kapky vody rozmícháme určité množství stolice*
- *směs rozetřeme na sklíčku (vrstva má být tak silná, aby přes ni nebylo možno číst)*
- *roztěr necháme zaschnout*
- *před prohlížením na sklíčko kápneme parafínový olej na projasnění*

Tlustý roztěr dle Kato

- je určen pro rychlou diagnostiku vajíček helmintů, má podobnou záchytnost jako Heinova metoda, ale parazitární útvary se lépe hledají, tenkostěnná vajíčka hlístic jsou lépe rozpoznatelná a nedeformují se. Tato metoda je **závazným parazitologickým vyšetřením** na hygienických stanicích.

Postup:

- *na podložní sklo přeneseme vzorek výkalu velikosti hrachu*
- *vzorek překryjeme proužkem celofánu o rozměrech 22 x 30 mm, který je předtím máčen alespoň 24 hodin v barvicím roztoku (500 ml glycerínu + 6 ml 3% vodného roztoku malachitové zeleně, případně přidáme 500 ml 6% roztoku fenolu)*
- *výkal pod celofánem mírně přitlačíme gumovou zátkou k podložnímu sklíčku*
- *ponecháme 1 hodinu při pokojové teplotě nebo 20 – 30 minut v termostatu při 37 °C. Tím se projeví účinek barvicí směsi, preparát se obarví a projasní*
- *prohlížíme pod mikroskopem, preparát je možno uchovat i několik dní*

Odkazy : <https://labmet.zshk.cz/vyuka/tlusty-nater-dle-Kato.aspx>

3. Mikroskopická diagnostika

d) Koncentrační metody

FLOTACE

- metoda využívající **rozdílných hustot** parazitárních útvarů a použitého **flotačního roztoku** (vyšší hustota), takže parazitární útvary vyplavou na hladinu (koncentrují se na povrchové blance), odkud se sbírají a přenášejí na mikroskopické sklíčko
- preparáty se ihned prohlížejí
- nemá 100% záchytnost, nehodí se na diagnostiku vajíček motolic
- nejčastější detekce menších **vajíček a larev hlístic, vajíček tasemnic** a cyst prvoků (často **oocysty kokcií**)
- flotační roztoky jsou většinou roztoky solí a cukrů o vysoké koncentraci

Příklady flotačních metod (+ flotační roztoky):

Sheatherova metoda ($C_{12}H_{22}O_{11}$ - sacharóza)

Faustova metoda (33% $ZnSO_4$)

koncentrovaná McMasterova metoda (nasycený NaCl + 500g glukózy na 1 litr NaCl)

3. Mikroskopická diagnostika

d) Koncentrační metody

FLOTACE

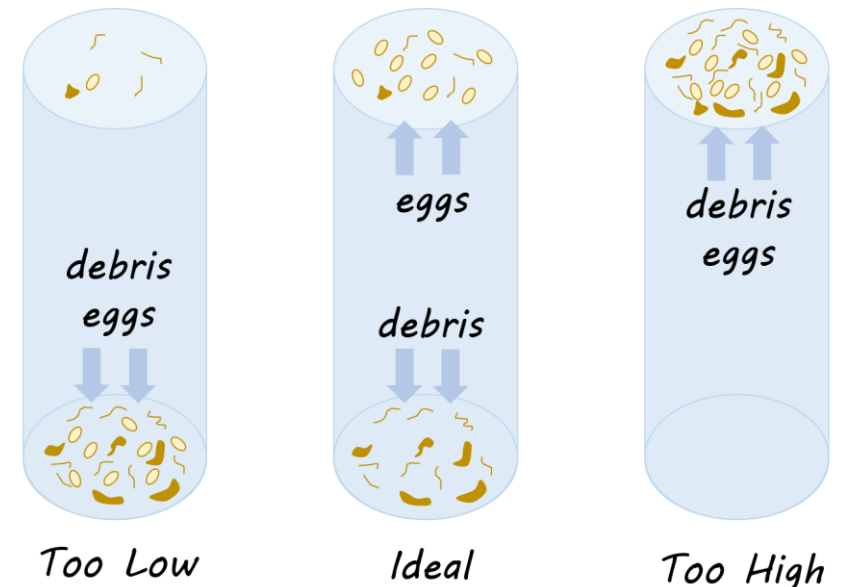
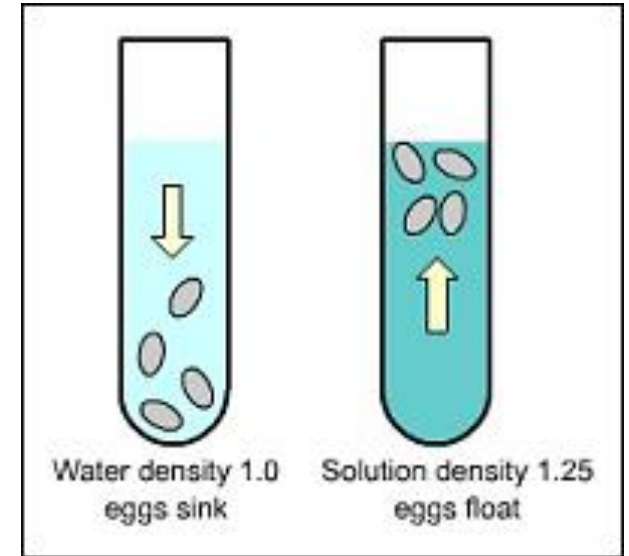
Postup:

- kousek trusu (1cm³, 3-5g) smícháme v třecí misce s 10-15 ml vody
- přecedíme přes sítko nebo gázu do zkumavky a odstředíme 1-2 minuty při 1500-2000 rpm
- opatrně slijeme supernatant a k sedimentu přidáme flotační roztok, zatím do výšky 1/3 zkumavky
- obsah zkumavky dokonale promícháme (kovovou, skleněnou tyčinkou)
- přilijeme ještě flotační roztok, celkově do 2/3 - 3/4 výšky zkumavky a promícháme
- odstředíme 1-2 minuty při stejných hodnotách
- drátěnou koprologickou kličkou odebereme z povrchové blanky několik kapek na čisté podložní sklíčko, přikryjeme krycím sklíčkem a mikroskopujeme při zvětšení 40x - 400x (pokud nemáme k dispozici koprologickou kličku - po druhém odstředování se opatrně doplní flotační roztok až po okraj zkumavky, přikryje se krycím sklíčkem, které po 10-ti minutách přeneseme na podložní sklíčko)

Odkazy :

<https://labmet.zshk.cz/vyuka/koncentracni-flotacni-metoda-dle-Fausta.aspx>

<https://www.youtube.com/watch?v=LG2n2MLay3Y>



3. Mikroskopická diagnostika

d) Koncentrační metody

SEDIMENTACE

- principem sedimentace je klesání vajíček a cyst ke dnu kádinky
- použití pro těžká vajíčka a cysty, která by se při flotační metodě nevyplavila (vajíčka motolic, některých tasemnic (škulovec) a vrtejšů, cysty prvoků (améb)
- proces sedimentace je možné urychlit a zefektivnit pomocí centrifugace za použití různých sedimentačně-koncentračních roztoků (např. kombinace methiolát -jód - formaldehyd, ethyl acetát, Hemo-De, ether...)

Postup:

- přibližně 5g trusu rozmícháme s vodou v třecí misce a přefiltrujeme přes sítko do sedimentační nádoby (cca 50 ml)
- kádinku dolijeme vodou po okraj a necháme 5 minut stát
- supernatant opatrně slijeme a sediment opět doplníme vodou
- promývání opakujeme dokud není supernatant čistý
- při posledním slévání necháme se sedimentem v nádobce 1-2 ml vody
- obsah kruhovým pohybem nádoby promícháme, vylijeme na hodinové sklíčko a mikroskopujeme (zvětšení 40-100x)

Odkazy : <https://www.youtube.com/watch?v=3V-U8jQusfk>
<https://www.youtube.com/watch?v=aRZ6CnACUoc>

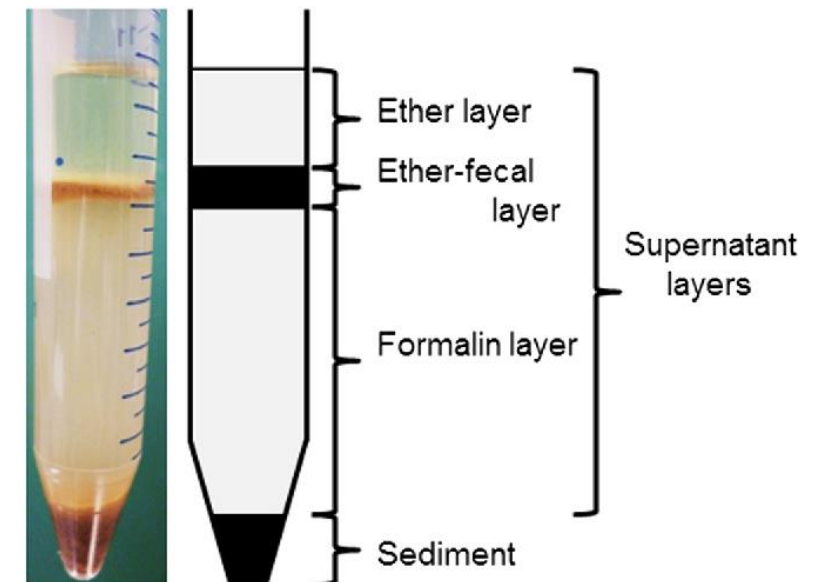
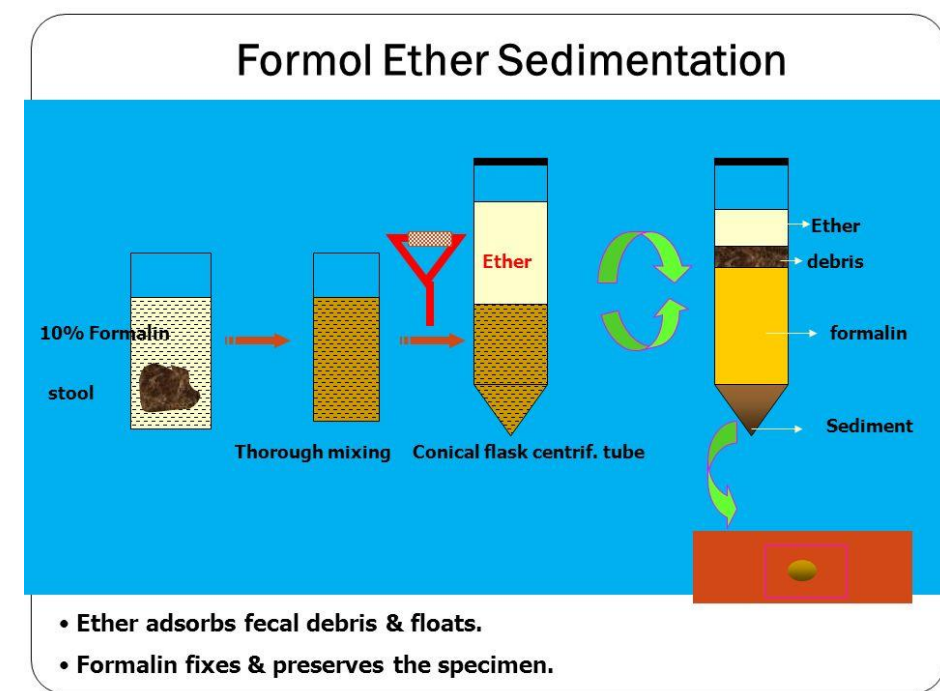


Fig. 1 Layers produced by the MGT. method after final centrifugation

3. Mikroskopická diagnostika

e) Larvoskopie

- zjišťování larev parazitů v trusu, event. v orgánech hostitele

Vajdova metoda

- využívá schopnosti larev hlístic migrovat do teplé vody (detekce malých plicnívek, např. *Müellerius capillaris*)

Postup:

- vzorek formovaného trusu přežvýkavců a hlodavců (3-4 bobky) vložíme do gázy nebo do sítka a položíme na hodinové sklíčko, Petriho misku nebo podložní sklíčko
- pipetou zakápneme teplou vodou (40 °C) a necháme 15-60 minut stát
- trus odebereme a vodu prohlédneme pod mikroskopem

Baermannova metoda

- využívá schopnosti larev hlístic migrovat do vodního prostředí

Postup:

- do nálevky s gumovou hadičkou uzavřenou svorkou a upevněné ve stojanu vložíme sítko (sestavíme tzv. Baermannovu aparaturu)
- vzorek trusu (asi 5-20g) zabalíme do gázy a vložíme do sítka
- do nálevky nalijeme tolik 40 °C teplé vody, aby zalila vzorek do poloviny
- z hadičky nad svorkou musíme odpustit vzduchové bubliny
- vzorek necháme stát při pokojové teplotě (optimální 25 °C) 8-20 hodin, v praxi většinou do druhého dne
- larvy vlivem tepla a vlhka migrují z trusu do vody, sedimentují a koncentrují se nad svorkou
- povolením svorky je vylijeme na hodinové sklíčko a mikroskopujeme

