

KOPROSKOPOWE METODY ILOŚCIOWE
W WETERYNARYJNEJ DIAGNOSTYCE PARAZYTOLOGICZNEJ
– ZASTOSOWANIE I PROBLEMY
W SZACOWANIU ICH SKUTECZNOŚCIMaciej Kochanowski¹, Jacek Karamon¹, Joanna Dąbrowska¹, Tomasz Cencek¹¹Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego
– Państwowego Instytutu Badawczego, Puławy

Wpłynęło w marcu 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. Przykładowe ilościowe metody parazytologiczne. 3. Przygotowanie preparatu do badania. 4. Izolacja form rozwojowych pasożytów. 5. Sposób obliczania form pasożytniczych pod mikroskopem świetlnym. 6. Właściwości badanego materiału. 7. Sposoby oceny parametrów charakteryzujących metody parazytologiczne. 8. Podsumowanie

Coproscopical quantitative methods in the parasitological diagnosis – the use and problems with estimation of their efficiency

Abstract: The article is review about various aspects of coproscopical diagnostic methods. It describes selected methods and factors having significant influence on their efficiency, including preparation of the specimen, methods of isolation of developmental parasitic forms and calculating them under a microscope, the influence of faeces and parasitic forms properties and methods of calculating the multiplication factor to estimation the number of parasitic forms in 1 g of sample. In particular, it discusses problems associated with estimation the efficiency of these methods and calculation of the real content of the parasitic forms in the sample.

1. Introduction. 2. Examples of quantitative parasitological methods. 3. Preparation of specimen to investigation. 4. Isolation of developmental parasitic forms. 5. Methods for calculation of parasitic forms using the light microscope. 6. Properties of the investigated material. 7. The ways of estimation of the parameters characterizing the parasitological methods. 8. Summary

Słowo kluczowe: diagnostyka parazytologiczna, metody ilościowe, metody koproskopowe, skuteczność

Key words: coproscopical methods, efficiency, quantitative methods, parasitological diagnostic

Wprowadzenie

Środowiskiem bytowania większości pasożytów wewnętrznych jest przewód pokarmowy. Diagnostyka tych inwazji jest najczęściej przeprowadzana za pomocą metod koproskopowych. Są to metody szybkie i nie wymagające do wykonania zaawansowanego sprzętu. Jednak ocena preparatów jest trudna – opiera się na identyfikacji cech morfologicznych form rozwojowych pasożytów. Ponadto badanie musi być wykonane w stosunkowo krótkim czasie ze względu na nietrwałość preparatu diagnostycznego spowodowanego np. uszkodzeniem osmotycznym form rozwojowych pasożytów, opadaniem form pasożytniczych w słupie cieczy, wysychaniem preparatu. Dlatego też doświadczenie diagnosty laboratoryjnego wykonującego badanie ma podstawowe znaczenie dla precyzji badania.

Wśród technik koproskopowych wyróżniamy metody jakościowe – służące jedynie do stwierdzenia inwazji pasożytniczej i metody ilościowe – umożliwiające osza-

cowanie liczby form rozwojowych pasożytów w jednostce masy kału i pozwalające na przybliżone określenie intensywności inwazji. Oszacowanie ilości form pasożytniczych w jednostce masy kału jest istotne, ponieważ np. wykrycie pojedynczych form rozwojowych pasożytów w kale nie musi świadczyć o inwazji. Pojedyncze formy pasożytnicze wykrywane w kale mogą być jedynie wynikiem biernego pasażu przez przewód pokarmowy, a nie inwazji pasożytniczej. Według B o e s oraz R o e p s t o r f f [1, 20] taki przypadek należy brać pod uwagę np. przy stwierdzeniu za pomocą metody McMastera 200 lub mniej jaj *Ascaris suum* w 1 g kału świńskiego. Ponadto obecność w kale nieznacznej ilości form pasożytniczych świadczących o niskiej intensywności inwazji pasożytniczej może nie wymagać postępowania leczniczego. Na przykład u owiec, u których w kale obecne są oocysty kokcydiów w liczbie nie przekraczającej 20 tysięcy w 1 g kału na ogół nie stwierdza się objawów klinicznych i stan taki nie wymaga interwencji lekarskiej. Przy intensywnej inwazji pasożytniczej

* Autor korespondencyjny: Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: maciej.kochanowski@piwet.pulawy.pl

konieczne jest natomiast bardzo ostrożne postępowanie terapeutyczne ze względu na ryzyko zatrucia organizmu żywiciela produktami rozpadu form pasożytniczych lub zaczopowania światła przewodu pokarmowego obumarzonymi pasożytami. Oszacowanie liczby jaj pasożytów ma również zastosowanie przy wykrywaniu oporności pasożytów na leki przeciwpasożytnicze.

2. Przykładowe ilościowe metody parazytologiczne

Wśród ilościowych metod koproscopowych można wyróżnić metody nie zagęszczające oraz metody umożliwiające koncentrację form pasożytniczych – techniki flotacyjne i sedymentacyjne oraz metody będące połączeniem tych technik. Metodą, w której nie stosuje się technik zagęszczających form rozwojowych pasożytów są metoda Stoll'a gdzie wykonywana jest jedynie homogenizacja próbki w odpowiedniej objętości roztworu ługu sodowego oraz metoda Caldwell'a – homogenizacja próbki odbywa się w roztworze podchlorynu sodu, a 70% roztwór sacharozy ułatwia utrzymanie jaj w zawieszynie. Techniki flotacyjne: metoda McMastera, Wisconsin, FECPAK, FLOTAC i inne różnią się rodzajem wykorzystywanych komór obliczeniowych, występowaniem etapu wirowania, różnego rodzaju metodami homogenizacji badanego materiału oraz rodzajem zastosowanych płynów flotacyjnych. Jedną z nielicznych ilościowych metod sedymentacyjnych w diagnostyce parazytologicznej jest metoda SCT (sedimentation and counting technique) umożliwiająca wykrycie w treści jelit tasiemców z rodzaju *Echinococcus*.

Metoda Stoll'a [21, 22]. W metodzie tej do 3 g próbki kału dodaje się 10-M roztwór NaOH (dopełniając do objętości 45 ml). Następnie wprowadza się perełki szklane i wstrząsa naczyniem w celu homogenizacji próbki. Zawieszinę pozostawia się na 24 h, po czym pobiera się 0,15 ml roztworu, nakrapla na szkiełko podstawowe i przykrywa szkiełkiem nakrywkowym. Preparat należy oglądać pod mikroskopem świetlnym, a liczba wykrytych form rozwojowych pasożytów pomnożona przez 100 daje liczbę jaj pasożytów zawartą w 1 g kału. W metodzie tej uwzględnione zostały współczynniki korekcyjne w zależności od konsystencji kału. Wnoszą one odpowiednio: x2 dla kału pastowatego, x3 dla kału półpłynnego, x4 dla kału płynnego.

Metoda Caldwell'a [21]. Podobnie jak w metodzie Stoll'a homogenizacja kału odbywa się przez zastosowanie związku chemicznego. W metodzie Caldwell'a zamiast ługu sodowego używa się roztworu podchlorynu sodu. Zważoną 4-gramową próbkę kału zalewa się 4 ml 30% roztworu NaOCl i miesza się zawartość. Po godzinie dodaje się 75% roztwór sacharozy (dopełniając

zawieszinę do objętości 40 ml). Zawieszinę wstrząsa się w celu zmieszania i pobiera do badania mikroskopowego 0,1 ml zawiesziny. Liczba wykrytych podczas badania form pasożytniczych pomnożona przez współczynnik 100 odpowiada liczbie pasożytów w 1 g kału.

Określanie liczby oocyst *Cryptosporidium* z zastosowaniem komory Fuchs-Rosenthal'a [25]. W metodzie próbka kału z wodą jest mieszana w stosunku 1:2. Następnie próbka jest rozdrabniana za pomocą miksera. Po rozdrobnieniu 15 ml próbki jest przenoszona do zlewki, a do zawiesziny należy dodać 100 ml 4% wodnego roztworu formaliny. Zawieszina jest mieszana na mieszadłku magnetycznym i następnie pozostawiana w celu sedymentacji większych cząstek zawiesziny. Następnie jest pobierane za pomocą pipety 60 μ l zawiesziny z głębokości 1 cm. Pobrana zawieszina jest wprowadzana do komory Fuchs-Rosenthal'a, która jest pozostawiana na 4 minuty, aby umożliwić sedymentację oocyst. Oocysty są liczone pod powiększeniem x400 na powierzchni 1 mm² komory. W celu obliczenia liczby oocyst w 1 g kału należy liczbę wykrytych oocyst pomnożyć przez 10⁵.

Metoda Wisconsin wg Cox and Tod [4]. Pięć gramów próbki kału należy zmieszać z wodą (dopełniając do objętości 30 ml), a uzyskaną zawieszinę zamieszać i przesączyć przez gazę. Dwanaście mililitrów przesączonej zawiesziny należy przelać do 12 ml próbówki i wirować (256 g przez 3 minuty). Następnie usuwa się supernatant pozostawiając osad. Do osadu dodaje się płyn flotacyjny – Sheathers sugar (ciężar właściwy 1,27), następnie próbkę należy wymieszać i uzupełnić płynem flotacyjnym do uzyskania menisku wypukłego. Na próbówce umieszcza się szkiełko nakrywkowe. Probówkę ze szkiełkiem nakrywkowym wiruje się (256 g przez 5 minut). Po zakończonym wirowaniu szkiełko nakrywkowe należy umieścić na szkiełku podstawowym i oglądać pod mikroskopem świetlnym. W celu obliczenia liczby form pasożytniczych w 1 g kału całkowitą liczbę jaj wykrytych należy podzielić przez 2.

Metoda McMastera w modyfikacji wg Raynaundera [18]. Metody z użyciem komory McMastera występują w licznych wariantach i modyfikacjach. Są to najczęściej stosowane metody ilościowe w parazytologii weterynaryjnej. W modyfikacji wg Raynaud należy odważyć próbkę kału i wprowadzić do niej nasycony roztwór MgSO₄ w proporcji 14 ml MgSO₄ na 1 g kału. Zawieszinę miesza się za pomocą mieszadła magnetycznego, po czym należy ją precedzić przez sito i ponownie mieszać na mieszadle. Tak przygotowana zawieszina jest wprowadzana do komory McMastera i do próbówki na szczycie, której umieszcza się szkiełko nakrywkowe. Zawartość komory McMastera jest badana pod mikro-

skopem świetlnym po 3 minutach, szkiełko nakrywkowe po 15–20 minutach. Liczbę form pasożytniczych obliczoną w jednej siatce należy pomnożyć przez współczynnik 100, w dwóch siatkach x50, w całej komorze x15, a na szkiełku nakrywkowym x7.

Metoda flotacji z użyciem Percoll'u [8]. Metoda służy głównie do badania kału o dużej zawartości tłuszczu (np. biegunkowy kał osesków). W celu wykonania badania należy 1–3 g próbkę kału wymieszać w 25% wodnym roztworze Percoll'u (ok. 10 ml). Mieszaninę przefiltrowuje się przez sito i przelewa do 15 ml probówki wirówkowej i wiruje (1700 g przez 5 minut). Po wirowaniu należy odrzucić supernatant z warstwą tłuszczu za pomocą pipetki pasterowskiej. Do probówki z pozostałym osadem dodać płyn flotacyjny (stężony roztwór NaCl z dodatkiem sacharozy: 1 l NaCl i 500 g cukru) – w proporcji 2 ml płynu, na 1 g kału i dokładnie wymieszać. Uzyskaną mieszaniną napełnia się komorę McMastera i po ok. 3 minutach ogląda się pod mikroskopem świetlnym. Metoda wymaga każdorazowej kalkulacji przeliczników w ramach walidacji wewnętrznej laboratoryjnej.

Metoda FECPAK [16]. Wykonując metodę należy odważyć do 10 g kału i dodać 3 części wody. Następnie próbę homogenizuje się w 30 ml zawiesiny dopełniania się nasyconym roztworem soli do objętości 230 ml. Zawiesina jest ponownie mieszana i przesączana przez sito. Następnie za pomocą pipetki pasterowskiej napełniana jest komora FECPAK. Jaja pasożytów są poszukiwane w obu siatkach komory. Liczbę jaj pasożytów w 1 g kału oblicza się mnożąc uzyskany wynik przez współczynnik 30.

Metoda FLOTAC [3]. Do odważonej próbki kału należy dodać wodę w stosunku 1:10 (np. do 1 g kału 9 ml wody) i rozdrobnić mikserem lub wymieszać za pomocą szpatuły. Następnie zawiesinę jest przesączana przez sito. Tak przygotowana próbka jest przelewana do probówki wirówkowej i wirowana (170 g przez 3 minuty). Po odwirowaniu płyn z nad osadu jest usuwany, a w probówce pozostawiany jest sam osad. Do próbki z osadem należy dodać płyn flotacyjny – dopełniając do 11 ml i wymieszać. Następnie wypełniane są obie komory aparatu za pomocą pipety pasterowskiej. Jedna komora aparatu FLOTAC ma 5 ml objętości. Dodatkowy 1 ml konieczny jest na wytworzenia menisku wypukłego w aparacie. Napełniony aparat umieszcza się w wirówce i wiruje (150 g przez 5 minut). Po wirowaniu następuje badanie próbki w aparacie pod mikroskopem świetlnym. Współczynnik do obliczenia liczby jaj pasożytów w 1 g kału dla jaj wykrytych w obu komorach aparatu wynosi 1. W przypadku liczenia form pasożytniczych jedynie w częściach siatki komory, współczynnik jest proporcjonalnie większy.

Metoda flotacji jaj nicieni sól-cukier SSF [12]. W metodzie SSF zważona próbka kału o masie do 6 g jest umieszczana w 50 ml probówce wirówkowej. Do próby dodawane jest 25 ml 13% roztworu NaCl. Probówka z zawartością jest wstrząsana w celu homogenizacji materiału. Zawiesina jest następnie przesączana przez sito do 50 ml probówki wirówkowej i jest wirowana (3600 g przez 5 minut). Po wirowaniu supernatant jest przelewany do drugiej probówki i do niego dodawana jest równa objętość wody. Zawiesina jest wstrząsana i wirowana (3600 g przez 1 minutę). Po odwirowaniu supernatant jest usuwany, a do osadu dodaje się 5 ml 17% roztworu sacharozy. Zawiesina jest mieszana i wirowana ponownie (3600 g przez 5 minut). Supernatant po wirowaniu jest przenoszony do innej probówki, do której wprowadzana jest równa objętość wody. Mieszanina jest następnie wstrząsana i wirowana (3600 g przez 5 minut), po czym supernatant jest ostrożnie usuwany, pozostawiając 200 μ l osadu. Do pozostawionych 200 μ l osadu dodaje się 3 krople nasyconego roztworu sacharozy i miesza się za pomocą pipety lub vortexu. Następnie każdy basenik 96-dółkowej płytki mikrotitracyjnej jest wypełniany trzema kroplami oleju mineralnego. Próbka jest wprowadzana do baseników pipetą automatyczną przez podwarstwienie pod warstwę oleju i pozostawiana na 15 minut, aby umożliwić jajom pasożytów koncentrację na powierzchni menisku. W celu obliczenia liczby jaj pasożytów wykonywane są za pomocą kamery mikroskopu zdjęcia zawiesiny jaj w basenikach płytki pod powiększeniem x30

SCT (sedimentation and counting technique) [7]. Metoda służy do wykrywania tasiemców z rodzaju *Echinococcus* w treści jelit zwierząt mięsożernych. Badane jelito jest rozcinane na fragmenty o długości ok. 20 cm i umieszczone w butelce o pojemności 1 litra wypełnionej płynem fizjologicznym. Butelka wraz z zawartością jest energicznie wstrząsana przez kilka sekund. Po wytrząsaniu fragmenty jelit są wyjmowane z butelki, jednocześnie przeciskając je między ramionami pensety w celu zdarcia powierzchni błony śluzowej. Treść jelita pozostawiona w butelce jest sedymentowana, co najmniej dwa razy przez 15 minut (aż supernatant będzie wystarczająco klarowny). Końcowy osad należy badać w małych porcjach na płytkach Petriego przy użyciu mikroskopu stereoskopowego (powiększenie, co najmniej 15x).

Każda z opisanych metod składa się z wielu różnych etapów. Wszystkie one wpływają na ostateczną skuteczność metody. Do szczególnie istotnych należą: przygotowanie materiału, sposób izolacji form rozwojowych pasożytów, sposób liczenia form rozwojowych pasożytów pod mikroskopem świetlnym, właściwości badanego materiału. Na wiarygodność uzyskanych

wyników wpływa również sposób szacowania zawartości form rozwojowych pasożytów w próbce.

3. Przygotowanie preparatu do badania

W większości metod koproskopowych stosuje się zagęszczenie form rozwojowych pasożytów w badanej próbce i jednocześnie usuwa się z niej jak największą ilość cząstek pokarmowych. Pierwszym etapem przygotowania materiału do badań jest rozdrobnienie/homogenizacja próbki. W tym celu stosowane jest mieszanie na mieszadle magnetycznym (metoda McMastera w modyfikacji wg R a y n a u n d), wstrząsanie próbki z perełkami szklanymi (metoda Stoll'a), użycie miksera lub mechaniczne mieszanie za pomocą szpatuły (metoda FLOTAC). Metody te wykazują nie jednakową przydatność w stosunku do kałów o różnej konsystencji. Zwłaszcza kał twardy i suchy wymaga dobrej homogenizacji. Dlatego manualne mieszanie próbki za pomocą szpatuły nie jest w tych przypadkach wystarczające. W niektórych metodach koproskopowych homogenizacja materiału jest uzyskiwana przez działanie na próbkę substancji chemicznych rozluźniając strukturę kału, np. NaOH – w metodzie Stoll'a, podchloryn sodu – metoda Caldwell'a.

Podchloryn sodu jest związkiem niezwykle aktywnym chemicznie i może powodować uszkodzenia delikatnych form rozwojowych pasożytów. Znaczenie ma także czas przygotowania materiału. Pozostawienie próbki przez długi czas w temperaturze pokojowej (jak w metodzie Stoll'a) może spowodować rozwój niektórych jaj pasożytów utrudniając ich identyfikację (np. w przypadku jaj węgorków wyklucie larw).

Kolejnym etapem wykonania w większości metod koproskopowych jest filtrowanie badanej zawiesiny przez sito. Umożliwia to zatrzymanie cząstek o znacznych rozmiarach obecnych w kale. Jednak należy mieć na uwadze, że również część form pasożytniczych w trakcie filtracji pozostaje na sitach, co w niektórych przypadkach może to znacznie ograniczać skuteczność metody. Odwrotnie w metodzie Stoll'a i Caldwell'a próbka nie jest przesączana przez sito, przez co zminimalizowane są ewentualne straty poszukiwanych form pasożytniczych w trakcie przygotowania próbki, jednakże przygotowany preparat zawiera wiele zanieczyszczeń utrudniających badanie.

4. Izolacja form rozwojowych pasożytów

W metodach koproskopowych izolacja form pasożytniczych odbywa się za pomocą: technik flotacyjnych, sedymentacyjnych, oraz ich połączeń. Metody te mogą być także wspomagane przez wirowanie.

Najpowszechniej obecnie stosowane klasyczne metody parazytologiczne opierają swój mechanizm funkcjonowania o zjawisko flotacji. Flotacja polega na wypływności na powierzchnię płynu flotacyjnego form pasożytniczych o niższym ciężarze właściwym od ciężaru właściwego zastosowanego płynu. Płynami takimi są to najczęściej nasycone roztwory soli, np. NaCl (o ciężarze właściwym 1,20), NaNO₃ (c. wł. 1,20), MgSO₄ (c. wł. 1,28), ZnSO₄ (c. wł. 1,35), K₂HgI₄ (c. wł. 1,44), roztwory cukrów oraz mieszaniny roztworów soli i cukrów. Wraz ze wzrostem ciężaru właściwego rośnie siła wyporu działająca na formy pasożytnicze, ale także obecne w kale cząstki pokarmowe utrudniające badanie mikroskopowe. Ważne jest, więc dobranie w różnych metodach i ich modyfikacjach odpowiednich płynów flotacyjnych. Tradycyjnie w metodzie McMastera stosowany jest nasycony roztwór NaCl. Natomiast w modyfikacji metody McMastera wg R a y n a u n d a [18] do badania kału koni wskazane jest stosowanie MgSO₄ a dla owiec, świń i bydła K₂HgI₄. W metodzie SSF (salt-sugar flotation) do flotacji używany jest 13% roztwór NaCl, 17% roztwór cukru oraz nasycony roztwór cukru. W metodzie FLOTAC do wykrywania oocyst w kale bydła zalecany jest roztwór cukru i jodku rtęci (roztwór Rinaldi – c. wł. 1,25), a do wykrywania jaj *Anaplocephala* sp. – roztwór cukru i formaldehydu (roztwór Sheather's sugar – o c. wł. 1,20). Wymienione roztwory są odpowiednio do flotacji większości jaj pasożytów, wyłączając jaja przywr charakteryzujące się dużym ciężarem właściwym w stosunku, do których najczęściej stosuje się metody sedymentacyjne. Jednakże część autorów [3, 11] zaleca użycie do flotacji do wykrywania jaj przywr nasycony roztwór ZnSO₄. Jaja przywr są jednak wrażliwe na wysokie ciśnienie osmotyczne (roztwory nasycone powodują ich uszkodzenia). C r i n g o l i i wsp. [3] zwrócił uwagę, że podczas wykorzystania do diagnostyki jaj *Fasciola hepatica* – ZnSO₄ wykrywane są tylko otoczki jaj, co jednak wg autora nie stanowi problemu w diagnostyce. Wydaje się jednak, że ze względu na znaczne zmiany w morfologii jaj przywr pod wpływem wysokiego ciśnienia osmotycznego płynów flotacyjnych taka diagnostyka jest mało efektywna (trudności identyfikacyjne i możliwość pomyłki zniekształconych jaj z artefaktami). W wielu badaniach R a y n a u n d [18] i C r i n g o l i i wsp. [3] stosując nasycony roztwór K₂HgI₄ uzyskali najlepsze wyniki wykrywalności dla większości form rozwojowych pasożytów, jednakże ze względu na wysoką toksyczność tego odczynnika jego zastosowanie jest bardzo ograniczone. Również NaNO₃ jest płynem flotacyjnym o właściwościach toksycznych. Należy zwrócić uwagę, że w różnych laboratoriach mogą być stosowane w poszczególnych metodach koproskopowych różne płyny flotacyjne. Może to wpływać na skuteczność wykrywania form pasożytniczych. Taka zamiana wymaga, więc każdorazowo szerokiej rewalidacji metody.

Techniki sedymentacyjne wykorzystują zjawisko opadania form pasożytniczych obecnych w próbce kału w płynie o mniejszym ciężarze właściwym od ciężaru form rozwojowych pasożytów. Najczęściej przygotowywane są wodne zawiesiny kału, a w otrzymanym osadzie poszukiwane są formy rozwojowe pasożytów o dużym ciężarze właściwym. Istotne jest dobranie odpowiedniego czasu trwania sedymentacji. Zbyt krótki czas spowoduje, że wraz z wodą i cząstkami pokarmowymi usunięte będą duże ilości poszukiwanych form pasożytniczych. Natomiast zbyt długi czas sedymentacji spowoduje, że formy rozwojowe pasożytów opadną na dno naczynia z bardzo licznymi cząstkami pokarmowymi. Jest to jednak typowe, że w raz z formami pasożytniczymi w osadzie znajduje się wiele cząstek, które utrudniają badanie mikroskopowe. Dlatego w wielu metodach diagnostycznych sedymentacja funkcjonuje jako wstępny etap izolacji, po którym stosowana jest flotacja. Istnieją metody, dla których najbardziej efektywnymi formami izolacji są techniki sedymentacyjne np. metoda SCT. W metodzie SCT, w której sedymentacji podlega treść jelit w poszukiwaniu tasiemców z rodzaju *Echinococcus* sedymentacja jest jak do tej pory najbardziej optymalną formą izolacji.

W większości nowych modyfikacji metod koproskopowych występuje etap wirowania próbki. Wirowanie badanego materiału zapewnia znaczne zwiększenie skuteczności metody poprzez zwiększenie sił działających na formy pasożytnicze w trakcie izolacji. Próbę oceny przydatności wirowania w metodzie McMastera podjęli V a d l e j c h i wsp. [24]. Przeprowadzili oni badania porównawcze trzech modyfikacji metody McMastera na kale wzbogaconym znaną liczbą jaj nicieni *Teladorsagia circumcincta*. Modyfikacje posiadające etap wirowania uzyskały lepsze wyniki wykrywalności jaj nicieni w wyniku bardziej efektywnego procesu izolacji.

5. Sposób obliczania liczby form pasożytniczych pod mikroskopem świetlnym

Istotą parazytologicznego badania ilościowego jest obliczenie form rozwojowych pasożytów w określonej objętości próbki. Do precyzyjnego mierzenia tej objętości, a jednocześnie do ułatwienia obserwacji służą specjalne komory, choć możliwe jest wykonanie takich badań także np. na szkiełku mikroskopowym. Przeprowadzenie badania na szkiełku podstawowym jak w metodzie Stoll'a, Caldwell'a oraz Wisconsin jest jednak mało dokładne ze względu, na trudności w precyzyjnym odmierzaniu badanego płynu (np. możliwość uzyskania różnej objętości słupa cieczy pod szkiełkiem) oraz brak linii ułatwiających obserwację (co może być przyczyną pominięcia niektórych form pasożytniczych podczas badania lub podwójnego zliczenia innych).

Bardziej precyzyjne badanie zapewnia użycie do diagnostyki komór obliczeniowych. Do wykonania najpopularniejszej parazytologicznej metody ilościowej stosowana jest komora McMastera. Obecnie na rynku znajdują się komory o różnej budowie. Standardowa komora McMastera ma całkowitą objętość 1 ml. Zbudowana jest z dwóch połówek o równej objętości 0,5 ml. Na każdej połowie znajduje się siatka o wymiarach 10×10 mm, a objętość zawierającego się pod siatką płynu wynosi 0,15 ml. P e r e c k i e n e i wsp. [14] przedstawili wyniki badania wykrywalności jaj *Asacris suum* w dwóch komorach McMastera: klasycznej (1 ml objętości) i zmodyfikowanej (1,5 ml objętości). Zgodnie z tymi wynikami większą skuteczność uzyskano stosując zmodyfikowaną komorę McMastera, co jest zrozumiałe ze względu na większą objętość badanej próbki. Istotną wadą komory McMastera w stosunku do badania na szkiełku podstawowym jest w wielu przypadkach brak możliwości prowadzenia obserwacji przy użyciu obiektywu o większym powiększeniu niż x20. Spowodowane jest to zbyt małą odległością roboczą obiektywów o większym powiększeniu (niż x20). Utrudnia to identyfikację form rozwojowych pasożytów.

Z kolei Metoda FECPAK opiera się o wykorzystanie zjawiska flotacji w komorze obliczeniowej FECPAK (Techion Group Ltd). Komora ta różni się od standardowej komory McMastera większą objętością. Jest ona przeznaczona szczególnie do badania kału przeżuwaczy. Objętość pod dwiema siatkami komory FECPAK wynosi 1 ml (dla porównania objętość cieczy pod dwoma siatkami komory McMastera – 0,3 ml). Presland i wsp. [16] wykonał porównanie metody FECPAK z metodą McMastera. Do próbek kału końskiego nie zawierającego jaj pasożytów wprowadzone zostały jaja węgorków w liczbie: 50, 100, 200 jaja na 1 g kału w celu porównania czułości metod. Obie porównywane metody zostały powtórzone 5 razy na każdym poziomie domieszkowania jaj. Metodą FECPAK uzyskano wynik pozytywny dla każdej domieszkowanej próbki. Natomiast dla metody McMastera uzyskano 6 wyników ujemnych (3 wyniki ujemne na poziomie 50 jaj na 1 g kału, 3 wyniki ujemne na poziomie 100 jaj).

Metoda FLOTAC opiera się na wykorzystaniu w badaniu specjalnego aparatu. Aparat FLOTAC zbudowany jest z dwóch komór o objętości 5 ml. Występuje on w dwóch wariantach: FLOTAC-100 i FLOTAC-400. Szczególnie ciekawą komorą jest FLOTAC-400, który umożliwi obserwację próby w mikroskopie świetlnym przy użyciu obiektywu o powiększeniu x40. Wynika to z niewielkiej grubości górnej ściany aparatu FLOTAC-400. Porównanie metody FLOTAC z metodą McMastera i z metodą flotacji w próbówce m.in. dla jaj *Ancylostoma caninum* [2], *Dicrocoelium dendriticum* i *Moniezia expansa* [19] wykazało, że metoda FLOTAC charakteryzuje się lepszą wykrywalnością (co wynika za pewne ze zwiększonej

masy badanej próbki). Porównanie te wykonano jednak na materiale pochodzącym z naturalnego zarażenia, co uniemożliwia dokładną ocenę obu metod. Analizując komory obliczeniowe stosowane w metodach koproscopowych obserwuje się obecnie trend do zwiększania skuteczności metody poprzez wzrost objętości tych komór. Należy zauważyć jednak, że wzrost masy badanej próbki, przyczyniający się do zwiększenia skuteczności metody jednocześnie zwiększa pracochłonność badania.

Jak wspomniano, zbyt duża grubość materiałów z których wykonana jest większość komór obliczeniowych, utrudnia identyfikację pierwotniaków. Dlatego zastosowanie w koproscopowych badaniach ilościowych ma również komora Fuchs-Rosenthal'a stosowana także w badaniach hematologicznych. Na przykład V a r g a i wsp. [25] zalecają zastosowanie tej komory do ilościowej diagnostyki kryptosporydiozy. Komora ta pozwala na wykonanie badania pod większym powiększeniem niż jest to możliwe w przypadku komory McMastera. Jednak jednocześnie w komorze Fuchs-Rosenthal'a badana jest znacznie mniejsza objętość płynu niż w metodzie McMastera, co zmniejsza czułość metody. Dlatego ogranicznikiem zastosowania tej metody jest intensywność inwazji. W przypadku niskiej intensywności badanie to może dać wynik fałszywie ujemny.

Szczególnie ciekawe rozwiązanie dotyczące obliczania ilości jaj pasożytów w kale przedstawił M e s i i wsp. [12] w metodzie SSF (salt-sugar flotation). W metodzie tej badanie wykonywane jest na płytce mikrotitracyjnej, której baseniki wypełniane są zawieszoną izolowaną z kału jaj pasożytów. Za pomocą kamery zintegrowanej z mikroskopem wykonywane są zdjęcia zawiesziny jaj, a z wykonanych zdjęć obliczana jest liczba jaj nicieni. Zaletą tej metody jest możliwość obliczania jaj pasożytów w dowolnym momencie po wykonaniu zdjęć. Natomiast w przypadku zdjęć o słabej jakości identyfikacja form pasożytniczych może być niewykonalna. Ponadto w przypadku analizy jaj pasożytów ze zdjęć brak jest możliwości zastosowania kontrastu, który można wykorzystywać podczas badania mikroskopowego. Należy podkreślić, że jest to metoda pracochłonna, wymagająca wielokrotnego wirowania i zastosowania różnych płynów flotacyjnych. Zatem wykorzystanie metody SSF w standardowej diagnostyce jest ograniczone.

6. Właściwości badanego materiału

Na skuteczność metody w istotny sposób wpływają również właściwości samego materiału podlegającego badaniu. W skład próbki wchodzi: kał i formy rozwojowe pasożytów.

Formy rozwojowe różnych rodzajów pasożytów zachowują się odmiennie podczas wykonywania samej metody. Na przykład jaja o dużym ciężarze właściwym

jak *Trichuris* sp., *Taenia* sp. są wykrywane w mniejszych ilościach niż lżejsze jaja pasożytów np. *Ascaris suum* czy *Oesophagostomum* sp. Natomiast jaja *Toxocara* sp. mają specyficzną budowę otoczki, która odpowiada za silne właściwości adhezyjne [13]. Dlatego w trakcie wykonywania metody diagnostycznej jaja *Toxocara* sp. przytwierdzają się często do sprzętu i narzędzi, co powoduje obniżenie wykrywalności. W badaniach przeprowadzonych przez Kochanowskiego i wsp. [9] uzyskano znaczne różnice w wykrywalności metodą McMastera jaj pasożytów z rodzaju *Toxocara*, *Trichuris* i *Ascaris*. Najlepsze wyniki wykrywalności dla metody uzyskano w przypadku jaj *Ascaris suum*, nieco gorsze *Trichuris* sp., a znacząco najslabsze *Toxocara* sp.

Wpływ na skuteczność metod koproscopowych mogą mieć także właściwości kału poddawanego badaniu. Na przykład badanie biegunkowego kału próżniakami metodami koproscopowymi utrudnia znacząco tłuszcz wypływający na powierzchnię płynu flotacyjnego. Usunięcie frakcji tłuszczowej we wstępnej fazie badania za pomocą preparatu Percoll [8] umożliwiło uzyskanie kilkunastokrotnie niższej (lepszej) granicy wykrywalności niż standardową metodą McMastera. Ponadto, jak już wspomniano kał o zbitej strukturze jest trudno dokładnie rozdrobnić, a w przypadku materiału o dużej ilości cząstek pokarmowych wykonanie badania takiej próbki jest wymagające zastosowania różnych technik przygotowania próbki i izolacji form pasożytniczych. Tego typu zależności należy każdorazowo uwzględnić analizując wyniki badań koproscopowych.

7. Sposoby oceny parametrów charakteryzujących metody parazytologiczne

W literaturze standardy dotyczące oceny skuteczności parazytologicznej metody diagnostycznej są niejednoznaczne. Stąd autorzy w bardzo zróżnicowany sposób podchodzą do takich zagadnień jak: granica wykrywalności, czułość, liniowość, powtarzalność i odtwarzalność metody. Wiele prac opiera się jedynie na porównaniu metod bez charakterystyki parametrów przedstawiających rzeczywistość jej skuteczność [10, 23]. Przeważająca większość koproscopowych metod ilościowych (m.in. metoda McMastera, metoda Stoll'a, Caldwell'a, Wisconsin, FLOTAC, FECPAK) opiera swoje obliczenia ilości form rozwojowych pasożytów w kale o wartość obliczoną jako iloczyn liczby jaj wykrytych podczas badania i odpowiedniego współczynnika. Współczynniki do oszacowania liczby form pasożytniczych w kale są traktowane najczęściej jako wartości uniwersalne niezależnie od rodzaju pasożyta i wynikają ze stosunku rozcieńczenia badanej próbki i objętości badanego płynu. Wynika to z teoretycznego założenia, że wszystkie formy rozwojowe pasożytów w badanej masie próbki zostaną

wykryte. W praktyce jest to niezmiernie trudne do osiągnięcia. Zastosowanie takiego przeliczenia do oszacowania liczby form pasożytniczych w jednostce masy kału nie odzwierciedla realnej zawartości i nie zapewnia wiarygodnego wyniku badania ilościowego. Należy podkreślić, że badania nad skutecznością wielu metod [3, 15] przeprowadzone zostały na kale zwierząt z naturalnego bądź eksperymentalnego zarażenia o nieznannej zawartości form pasożytniczych. Badania wykonane na takim materiale nie umożliwiają realnej oceny zawartości jaj pasożytów w kale, a przez to skuteczności metody. Na przykład granica wykrywalności metody FLOTAC wg autora oszacowana została na 1 formę pasożytniczą (jajo, oocystę, cystę, larwę) w 1 g kału [3]. Została ona obliczona ze stosunku objętości płynu w obu komorach aparatu FLOTAC (10 ml) i masy próbki kału (1 g). Badania własne wskazują jednak, że wykrywalność metody jest wielokrotnie niższa (dane niepublikowane).

Rzetelna ocena skuteczności metody możliwa jest w przypadku badań przeprowadzonych na materiale o znanej zawartości form pasożytniczych. Materiał taki uzyskiwany jest najczęściej poprzez wzbogacanie matrycy konkretną liczbą jaj, cyst, oocyst, postaci dojrzałych, czy innych form pasożytów. Bazując na takim założeniu określona została skuteczność metody McMastera w modyfikacji R a y n a u d do wykrywania jaj pasożytów z rodzaju *Toxocara* i *Trichuris* w kale zwierząt mięsożernych [9]. Metodą McMastera przebadano próbki kału psiego domieszkowanego jajami z rodzaju *Toxocara* i *Trichuris*, a także jajami *Ascaris suum* (które stanowiły kontrolę wpływu właściwości jaj pasożytów na wynik). Na podstawie przekształconego równania linii trendu ilustrującej zależność liczby jaj wykrytych podczas badania od ilości jaj dodanych do próbki wyznaczono współczynniki do oszacowania realnej liczby jaj pasożytów w 1 g kału, w komorze McMastera. Dla jaj *Toxocara* sp. i *Trichuris* sp. współczynniki były wyższe od założeń określonych przez twórcę tej metody, a dla *A. suum* były z nimi porównywalne. Dla wszystkich trzech rodzajów jaj (*Toxocara* sp., *Trichuris* sp., *A. suum*) współczynnik proponowany przez Raynaud do obliczenia liczby jaj w wariacie z zastosowaniem flotacji w próbówce był wielokrotnie zaniżony.

Nieadekwatność współczynników do ilościowej oceny form pasożytniczych w przypadku kału biegunkowego zostało wykazano w badaniach K a r a m o n a i wsp. [8]. W badaniach tych wykrywano pojedyncze oocysty *Isospora suis* dopiero przy wzbogaceniu próbek na poziomie 3200 oocyst w 1 g kału. Nawet po zastosowaniu zalecanego przez Raynaud dodatkowego współczynnika korekcyjnego dla kału biegunkowego oszacowana zawartość oocyst byłaby ponad trzydziestokrotnie zaniżona w stosunku do rzeczywistej.

Innym przykładem jest ilościowa metoda sedymentacyjna (sedimentation and counting technique, SCT)

stosowana od wielu lat do wykrywania inwazji *Echinococcus* u zwierząt mięsożernych [6, 17], której faktyczne ograniczenia dotyczące wykrywalności określono dopiero w 2010 r. Badania przeprowadzone na próbach wzbogaconymi tasiemcami *Echinococcus multilocularis* wykazały, że granica wykrywalności tej metody wynosi 10 tasiemców *Echinococcus multilocularis* na jelito [7]. Uprzednio skuteczność metody SCT określano domyślnie jako „zbliżoną do 100%” [5]. Należy zaznaczyć, że metoda ta od wielu lat funkcjonuje jako „złoty standard” w wykrywaniu inwazji jelitowej tasiemców *Echinococcus*, a w stosunku do niej określane są skuteczności innych alternatywnych metod.

8. Podsumowanie

Mimo coraz szerszego wprowadzania do medycyny i weterynaryjnej diagnostyki laboratoryjnej najnowocześniejszych metod molekularnych, ilościowe techniki koproscopowe pozostają wciąż podstawowymi metodami diagnostycznymi umożliwiającymi oszacowanie intensywności inwazji pasożytniczej. Należy jednak mieć na uwadze, że na wiarygodność wyników uzyskanych tymi metodami może wpływać wiele czynników wynikających zarówno ze złożoności samych metod jak i zmiennych cech badanego materiału.

Ilościowe techniki koproscopowe w większości są metodami sprawdzonymi, stosowanymi rutynowo od wielu lat. Pojawiają się też nowe techniki, będące modyfikacjami starych schematów. Modyfikacje te prowadzą do zwiększenia efektywności i precyzji metod m.in. poprzez zwiększenie masy badanej próbki, dokładne, zautomatyzowane przygotowanie preparatu oraz użycie nowoczesnych komór obliczeniowych.

Parazytologiczne, koproscopowe metody ilościowe obarczone są jednak pewnym wspólnym mankamentem. Ich głównym celem jest oszacowanie ilości form pasożytniczych w jednostce masy próbki. W tym celu stosowane są odpowiednie współczynniki, które powinny wynikać z przeprowadzonych badań na materiale zawierającym znaną liczbę form rozwojowych pasożytów. Współczynniki te ze względu na szereg czynników wpływających na skuteczność metody nie powinny być wartościami uniwersalnymi. Tymczasem dla większości metod współczynniki te obliczane są z uwzględnieniem jedynie wielkości badanej próbki i objętości komory obliczeniowej, podczas gdy skuteczność metody jest zazwyczaj parametrem całkowicie pomijanym. Stąd też istotne jest, że w diagnostycznych metodach parazytologicznych analiza skuteczności metody nie może być przeprowadzana w pełni na wzór metod mikrobiologicznych, serologicznych czy chemicznych, ponieważ parametry tych metod znacząco odbiegają od siebie wartościami i znaczeniem. Dlatego konieczne wydaje

się opracowanie specyficznych dla parazytologii sposobów walidacji metod ilościowych w celu precyzyjniejszej oceny rzeczywistej ich skuteczności. Wiąże się to także z koniecznością weryfikacji dotychczas wykorzystywanych sposobów kalkulacji wyników.

Piśmiennictwo

- Boes J., Nansen P., Stephenson L.S.: False-positive *Ascaris suum* eggs counts in pigs. *Int. J. Parasitol.* **27**, 833–838 (1997)
- Cringoli G., Rinaldi L., Maurelli M.P., Morgoglione M.E., Musella V., Utzinger J.: *Ancylostoma caninum*: Calibration and comparison of diagnostic accuracy of flotation in tube, McMaster and FLOTAC in fecal samples of dogs. *Exp. Parasitol.* **128**, 32–37 (2011)
- Cringoli G., Rinaldi L., Maurelli M.P., Utzinger J.: FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nat. Protoc.* **5**, 503–515 (2010)
- Cox, D.D., Todd, A.C.: Survey of gastrointestinal parasitism in Wisconsin dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **141**, 706–709 (1962)
- Eckert J.: Predictive values and quality control of techniques for the diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in definitive hosts. *Acta Trop.* **85**, 157–163 (2003)
- Hofer S., Gloor S., Müller U., Mathis A., Hegglin D., Deplazes P.: High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicola terrestris*) in the city of Zurich, Switzerland. *Parasitology*, **120**, 135–142 (2000)
- Karamon J., Sroka J., Cencek T.: Limit of detection of sedimentation and counting technique (SCT) for *Echinococcus multilocularis* diagnosis, estimated under experimental conditions. *Exp. Parasitol.* **124**, 244–246 (2010)
- Karamon J., Ziomko I., Cencek T., Sroka J.: Modified flotation method with the use of Percoll for the detection of *Isospora suis* oocysts in suckling piglet faeces. *Vet. Parasitol.* **156**, 324–328 (2008)
- Kochanowski M., Dąbrowska J., Karamon J., Cencek T.: Analysis of the efficiency of the McMaster method in Raynaud's modification in detection of *Toxocara* sp. and *Trichuris* sp. eggs in carnivores faeces. II Congress EAVLD. Kazimierz Dolny, Poland, S1-P-21 (2012)
- Levecke B., De Wilde N., Vandenhoute E., Vercruysse J.: Field validity and feasibility of four techniques for the detection of *Trichuris* in simians: a model for monitoring drug efficacy in public health? *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, e366 (2009)
- MAFF: Manual of Veterinary Parasitological Techniques. HMSO, London 1986.
- Mes T.H., Eysker M., Ploeger H.W.: A simple, robust and semi-automated parasite egg isolation protocol. *Nat. Protoc.* **2**, 487–489 (2007)
- Overgaauw P.A.M., van Knapen F.: Toxocarosis, an important zoonosis. *EJCAP*, **18**, 259–266 (2008)
- Pereckiene A., Petkevicius S., Vysniauskas A.: Comparative evaluation of efficiency of traditional McMaster chamber and newly designed chamber for the enumeration of nematode eggs. *Acta Vet. Scand.* **52**(Suppl 1): S20 (2010)
- Pereckiene A., Kaziūnaite V., Vysniauskas A., Petkevicius S., Malakauskas A., Sarkūnas M., Taylor M.A.: A comparison of modifications of the McMaster method for the enumeration of *Ascaris suum* eggs in pig faecal samples. *Vet. Parasitol.* **149**, 111–116 (2007)
- Presland S.L., Morgan E.R., Coles G.C.: Counting nematode eggs in equine faecal samples. *Vet. Rec.* **156**, 208–210 (2005)
- Rausch R.L., Fay F.H., Williamson F.S.: The ecology of *Echinococcus multilocularis* (Cestoda: Taeniidae) on St. Lawrence Island, Alaska. II. Helminth population in the definitive host. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **65**, 131–140 (1990)
- Raynaud, J.P.: Etude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le contrôle des infestations parasitaires des bovins, ovins, équines et porcins. *Annales de Parasitologie (Paris)*, **45**, 321–342 (1970)
- Rinaldi L., Coles G.C., Maurelli M.P., Musella V., Cringoli G.: Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep. *Vet. Parasitol.* **177**, 345–352 (2011)
- Roepstorff A.: Helminth surveillance as a prerequisite for anthelmintic treatment in intensive sow herds. *Vet. Parasitol.* **73**, 139–151 (1997)
- Stefański W., Żarnowski E.: Rozpoznawanie inwazji pasożytniczych u zwierząt, PWRiL, Warszawa, 1971, s. 36
- Stoll N.R.: Investigations on the control of hookworm disease. XV. An effective method of counting hookworm eggs in feces. *Am. J. Hyg.* **3**, 59–70 (1923)
- Turkson P.K., Ahafia K.K.: A comparison of modified McMaster and Brumpt's methods in assessment of nematode egg output in an N'dama cattle herd. *Acta Trop.* **57**, 341–344 (1994)
- Vadlejch J., Petrtyl M., Zaichenko I., Cadkova Z., Jankovska I., Langrova I., Moravec M.: Which McMaster egg counting technique is the most reliable? *Parasitol. Res.* **109**, 1387–1394 (2011)
- Varga I., Sreter T., Bekesi L.: Quantitative method to assess *Cryptosporidium* oocyst shedding in the chicken model. *Parasitol. Res.* **81**, 262–264 (1995)