

# 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 prvků nebo rychlému vývoji a líhnutí L1 larev některých nematod 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 příměsí 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

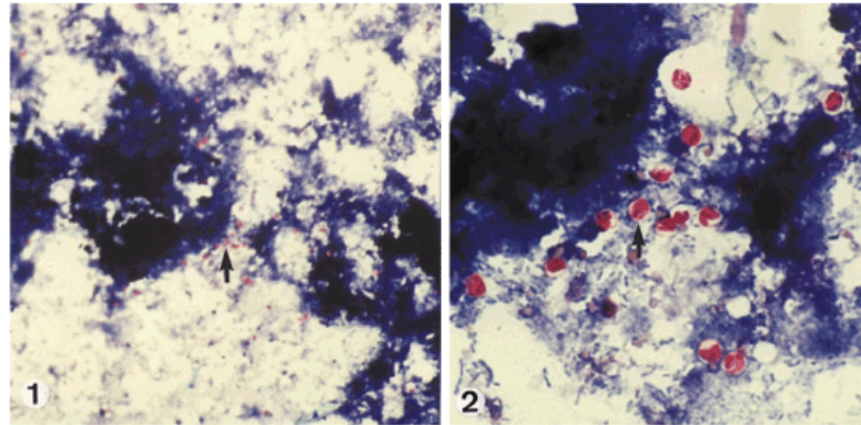


Fig. 1 and 2 - *Cryptosporidium* spp oocysts in fecal smear. Acid-fast staining using alcohol-chloride acid solution (250x and 1000x).

# Koncentrační metody

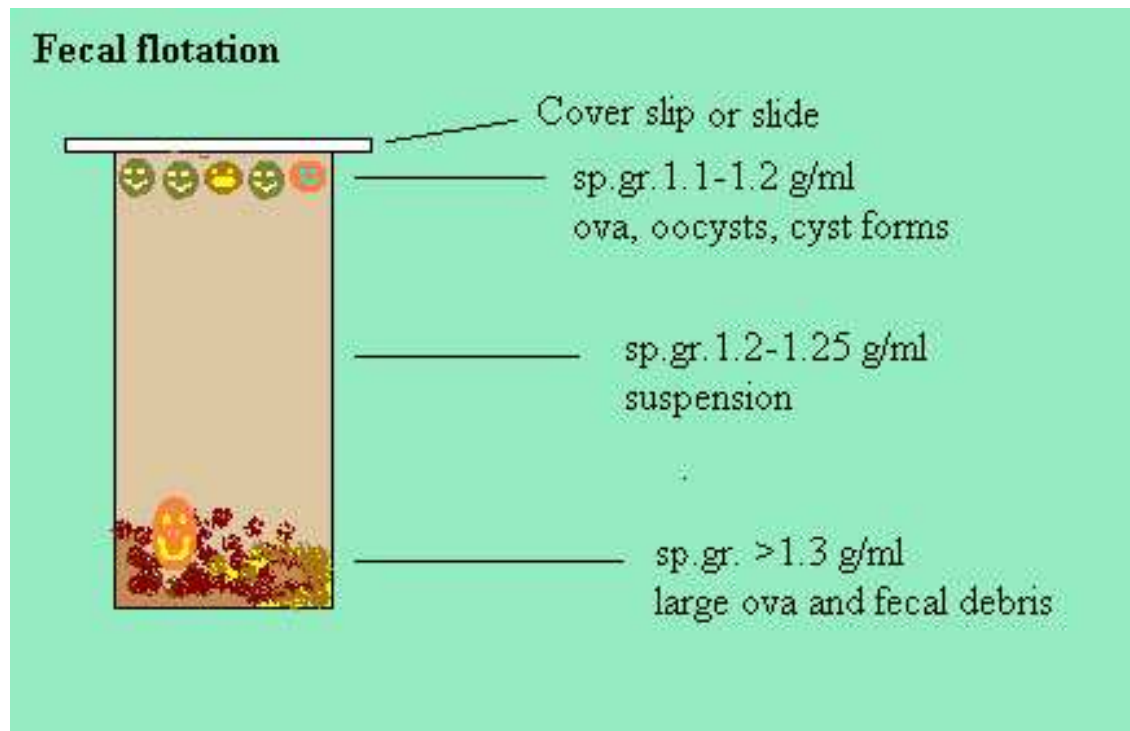
## 1) Flotace

- ▶ 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 kokcií
- ▶ např. Sheatherova metoda



# Koncentrační metody

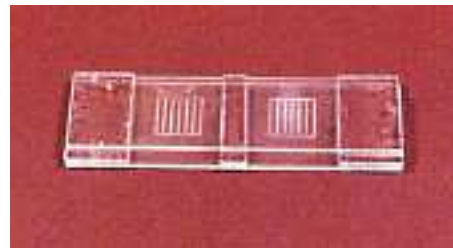
## Flotace



# 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

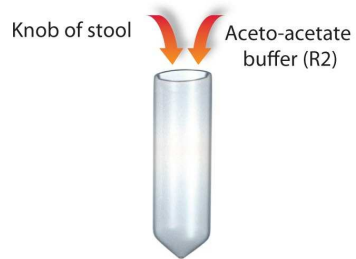
## 3) Sedimentace

- ▶ 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

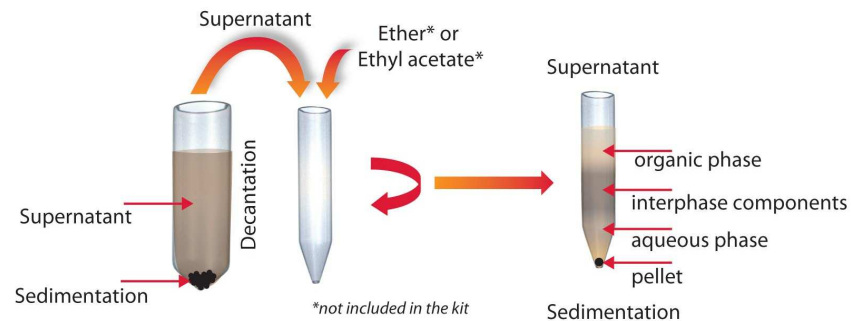
# Koncentrační metody

## Sedimentace

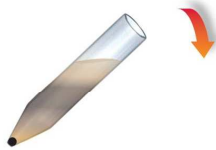
### STEP 1: Preparation



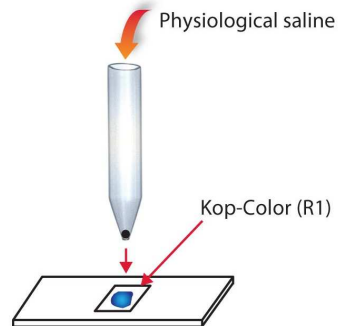
### STEP 2: Centrifugation



### STEP 3: Discard supernatant

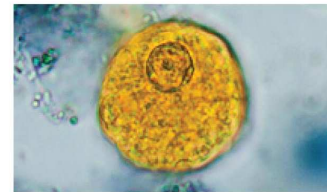


### STEP 4: Slide preparation



### STEP 5: Microscopic examination with blue filter

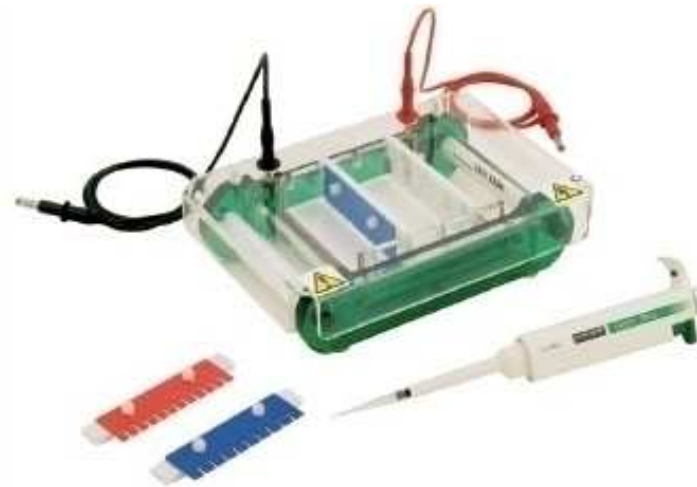
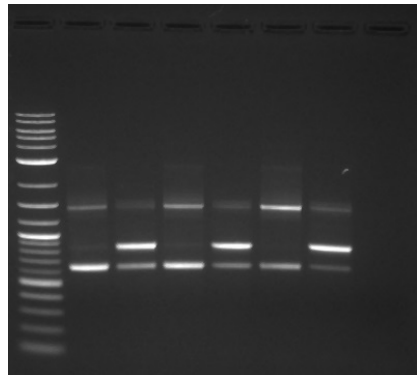
Parasites are yellow, yellow-orange or brownish-yellow on a more or less dark blue background



*Entamoeba histolytica*

# Molekulární metody

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



# PRAKTICKÉ POUŽITÍ V TERÉNU

## Orangutan Health Project

- Parasites diversity
- Parasites seasonality
- Complex interactions of animal - diseases - environment
- Feeding strategy
- Self-medical behaviour

