Diagnostyka inwazji nicieni żołądkowo-jelitowych z rodziny Trichostrongylidae u kóz

Wiele problemów zdrowotnych w stadach kóz wynika z występowania inwazji nicieni żołądkowo-jelitowych. Najczęściej występującymi w Polsce są nicienie należące do gatunku *H. contortus* oraz rodzajów *Trichostrongylus* i *Teladorsagia*. Objawy kliniczne inwazji są niespecyficzne i obejmują biegunkę, bladość błon śluzowych, obrzęki tkanek miękkich oraz spadek masy ciała. W diagnostyce inwazji stosowane są metody **koproskopowe jakościowe** (prosta flotacja) i **ilościowe** (metoda McMastera wraz z jej modyfikacjami) oraz **metody larwoskopowe** (metoda Baermanna). Różnicowanie gatunków oraz rodzajów nicieni żołądkowo-jelitowych jest skomplikowane i wymaga dużego doświadczenia. Wykonuje się je za pomocą **metod hodowli larw inwazyjnych** oraz **metod biologii molekularnej (PCR)**.

Podstawową metodą laboratoryjną stosowaną w diagnostyce inwazji pasożytów przewodu pokarmowego jest badanie kału metodą flotacji, która umożliwia wykrycie jaj pasożytów (ryc. 1.). Ciężar właściwy większości jaj pasożytów (oraz niektórych larw) jest niższy niż gęstość używanego roztworu, na przykład nasycony roztwór chlorku sodu. W efekcie jaja pasożytów (oraz niektóre larwy) wypływają na powierzchnię roztworu flotacyjnego. Nicienie z rodziny Trichostrongylidae mają jaja o podobnym wyglądzie i rozmiarach, przez co nie można łatwo ich odróżnić. W próbkach kału identyfikowane są do poziomu rodziny lub rodzaju. Aby zidentyfikować gatunki, wymagane jest zastosowanie metod hodowlanych i identyfikacja larw inwazyjnych stadium trzeciego (L3). Wyjątkiem są jaja nicieni z gatunku Nematodirus, które są znacznie większe i zawierają charakterystyczne blastomery. Praktycznie wszystkie małe przeżuwacze, wypasane na pastwisku są zarażone różnymi nicieniami przewodu pokarmowego. Z tego powodu prosta procedura flotacji, która prowadzi jedynie do wykrycia obecności jaj pasożytów, ma ograniczoną wartość. Najbardziej użytecznymi technikami do diagnostyki intensywności inwazji są metody ilościowe, oparte na zliczaniu liczby obecnych jaj pasożytów. Oszacowanie liczby jaj w kale można wykorzystać do oceny skuteczności programów zwalczania pasożytów, monitorowania poziomu potencjalnego zanieczyszczenia pastwisk pasożytami i oceny skuteczności leków. Ponieważ u małych przeżuwaczy liczba jaj przekracza często kilkaset na gram kału, najbardziej praktyczną techniką ilościową jest metoda McMastera (ryc. 2.). Wymaga ona użycia specjalnej komory zliczającej, którą wypełnia się określoną objętością roztworu flotacyjnego zmieszanego z badaną próbką kału. Metoda McMastera została opracowana w laboratorium McMaster na Uniwersytecie w Sydney i jest najpowszechniej stosowaną techniką ilościową w parazytologii weterynaryjnej. Zmodyfikowaną technikę McMastera można również stosować w teście redukcji liczby w kale jaj, w celu sprawdzenia skuteczności działania leków przeciwpasożytniczych w stadzie.

Duże różnice w patogenności powszechnie występujących nicieni żołądkowo-jelitowych powodują, że niezbędna jest wiedza, które z nich są odpowiedzialne za występowanie klinicznych objawów choroby u kóz. Obecnie jedyną dostępną metodą rutynowego laboratoryjnego oszacowania proporcji rodzajów lub gatunków nicieni obecnych w żywym zwierzęciu jest identyfikacja larw, które znajdują się w świeżym kale (głównie larw nicieni płucnych) lub tych, które rozwijają się w kale w trakcie hodowli (nicienie żołądkowo-jelitowe). Istnieje wiele różnych technik hodowli kału w celu uzyskania larw inwazyjnych nicieni żołądkowo-jelitowych. Procedura hodowli larw jest podobna dla wszystkich nicieni żołądkowo-jelitowych. W pierwszej kolejności grudki kału kruszy się, a następnie miesza z odpowiednią ilością wermikulitu, trocin lub włókna kokosowego. Uzyskuje się kruchą mieszaninę, którą należy lekko ubić w szklanym naczyniu o szerokim otworze i pojemności około 1 litra. W środku hodowli pozostawia się niewielkie zagłębienie, a mieszanina wokół niego powinna być lekko ubita. Naczynie z materiałem do hodowli inkubuje się w ciemności w temperaturze 26°C–28°C przez 5–7 dni. Hodowla przez cały okres inkubacji powinna być odpowiednio wilgotna (wilgotność ok. 80%). Po okresie inkubacji wnętrze naczynia spryskuje się niewielką ilością wody i umieszcza w świetle, które stymuluje larwy inwazyjne (L3) do migracji w górę wewnętrznych powierzchni ścian naczynia. Hodowlę zbiera się wielokrotnie w ciągu kilku dni, trzymając naczynie skośnie z otworem skierowanym w dół, a następnie spryskując wewnętrzne ściany wodą pozwalając zawiesinie larw spłynąć do naczynia zbierającego (58). Alternatywną metodą izolacji larw z hodowli kału jest zastosowanie metody larwoskopowej Baermanna po zakończeniu inkubacji hodowli.

Uzyskane w trakcie hodowli larwy inwazyjne (L3) nicieni żołądkowo-jelitowych (ryc. 3.) poddaje się identyfikacji pod mikroskopem poprzez porównanie cech morfologicznych charakterystycznych dla każdego z gatunków. Krople zawiesiny larw umieszcza się na szkiełku mikroskopowym, a następnie dodaje się roztwór jodu w płynie Lugola. Jod zabija larwy oraz powoduje wybarwienie charakterystycznych struktur. Identyfikacja morfologiczna larw większości gatunków nicieni pasożytniczych opiera się głównie na różnicach w kształcie części tylnej i przedniej larwy oraz ich całkowitej długości . W niektórych przypadkach porównuje się również inne cechy, takie jak długość, kształt i liczba komórek przełyku i jelita lub obecność plamek w okolicy jamy policzkowej, które są charakterystyczne dla w niektórych gatunków nicieni żołądkowo-jelitowych. Standardowo w procedurze różnicowania gatunków nicieni żołądkowo-jelitowych zlicza się i identyfikuje po mikroskopem pierwsze 100–200 napotkanych larw inwazyjnych. Następnie na podstawie liczb poszczególnych gatunków wylicza się ich proporcję w całej badanej próbce.

PRAWA AUTORSKIE ZASTRZEŻONE
TOINEN PRO ART FUNDACJA

ryc. 1 Jaja nicieni z rodziny Trichostrongylidae (pow. 20x)

PRAWA AUTORSKIE ZASTRZEŻONE
TOINEN PRO ART FUNDACJA

ryc. 2 Komory do badania metodą McMastera

PRAWA AUTORSKIE ZASTRZEŻONE
TOINEN PRO ART FUNDACJA

ryc. 3 Larwy inwazyjne (L3) nicieni żołądkowo-jelitowych (pow. 40x)

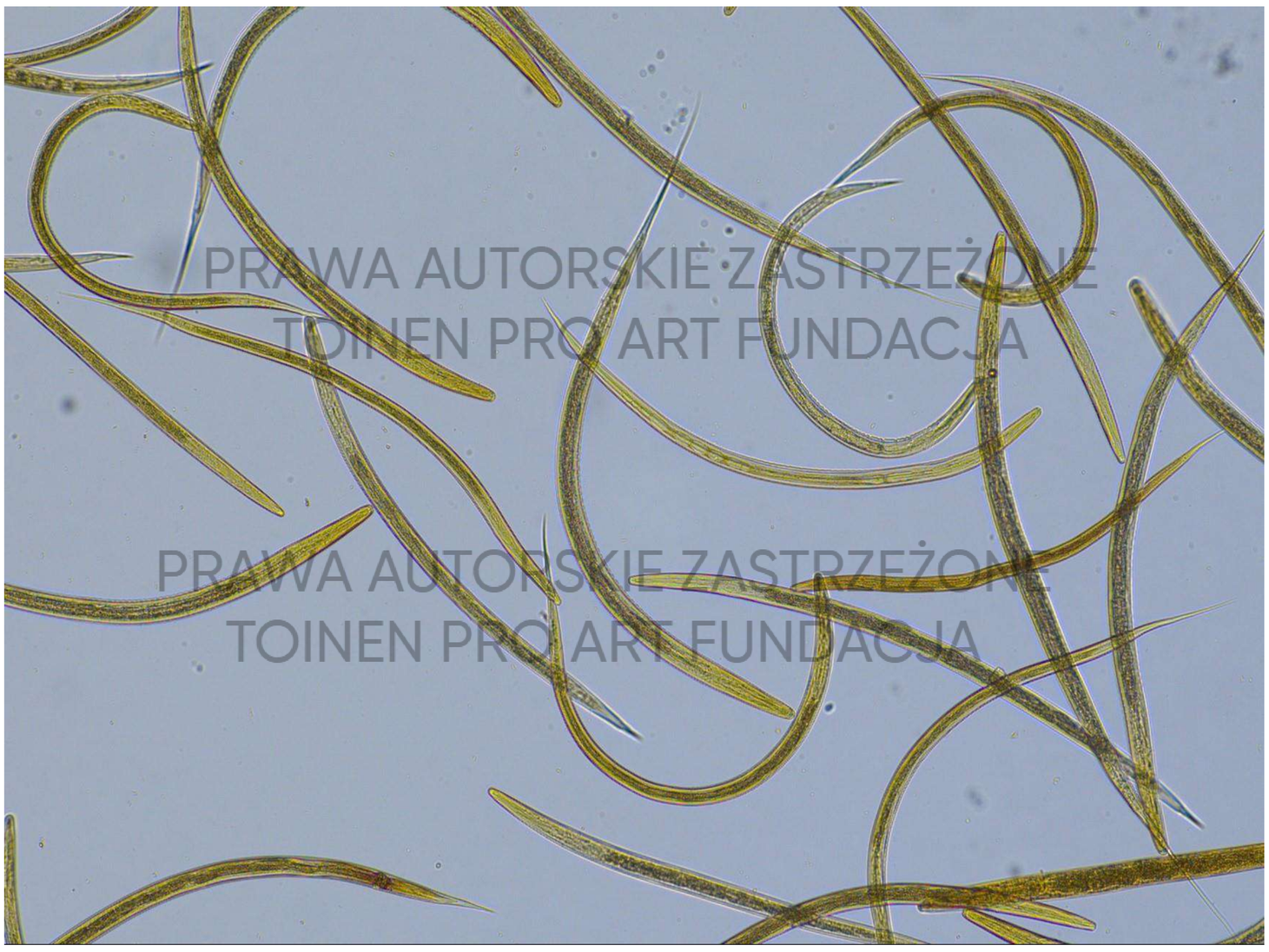
Źródło-Mickiewicz, M., Czopowicz, M., Moroz, A., Szaluś-Jordanow, O., Nalbert, T., Markowska-Daniel, I., & Kaba, J. (2022). Lekooporność nicieni żołądkowo-jelitowych kóz. Część III. Epidemiologia, diagnostyka i zwalczanie oporności nicieni żołądkowo-jelitowych na leki przeciwrobacze. Życie Weterynaryjne, 97(03), 175–184.

©prawa autorskie zastrzeżone
©copyright reserved

Przebieg kliniczny inwazji nicieni żołądkowo-jelitowych z rodziny Trichostrongylidae u kóz

Uzyskane w trakcie hodowli larwy inwazyjne (L3) nicieni żołądkowo-jelitowych (ryc. 3a, 3b i 3c.) poddaje się identyfikacji pod mikroskopem poprzez porównanie cech morfologicznych charakterystycznych dla każdego z gatunków. Krople zawiesiny larw umieszcza się na szkiełku mikroskopowym, a następnie dodaje się roztwór jodu w płynie Lugola. Jod zabija larwy oraz powoduje wybarwienie charakterystycznych struktur. Identyfikacja morfologiczna larw większości gatunków nicieni pasożytniczych opiera się głównie na różnicach w kształcie części tylnej i przedniej larwy oraz ich całkowitej długości . W niektórych przypadkach porównuje się również inne cechy, takie jak długość, kształt i liczba komórek przełyku i jelita lub obecność plamek w okolicy jamy policzkowej, które są charakterystyczne dla w niektórych gatunków nicieni żołądkowo-jelitowych. Standardowo w procedurze różnicowania gatunków nicieni żołądkowo-jelitowych zlicza się i identyfikuje po mikroskopem pierwsze 100–200 napotkanych larw inwazyjnych. Następnie na podstawie liczb poszczególnych gatunków wylicza się ich proporcję w całej badanej próbce.

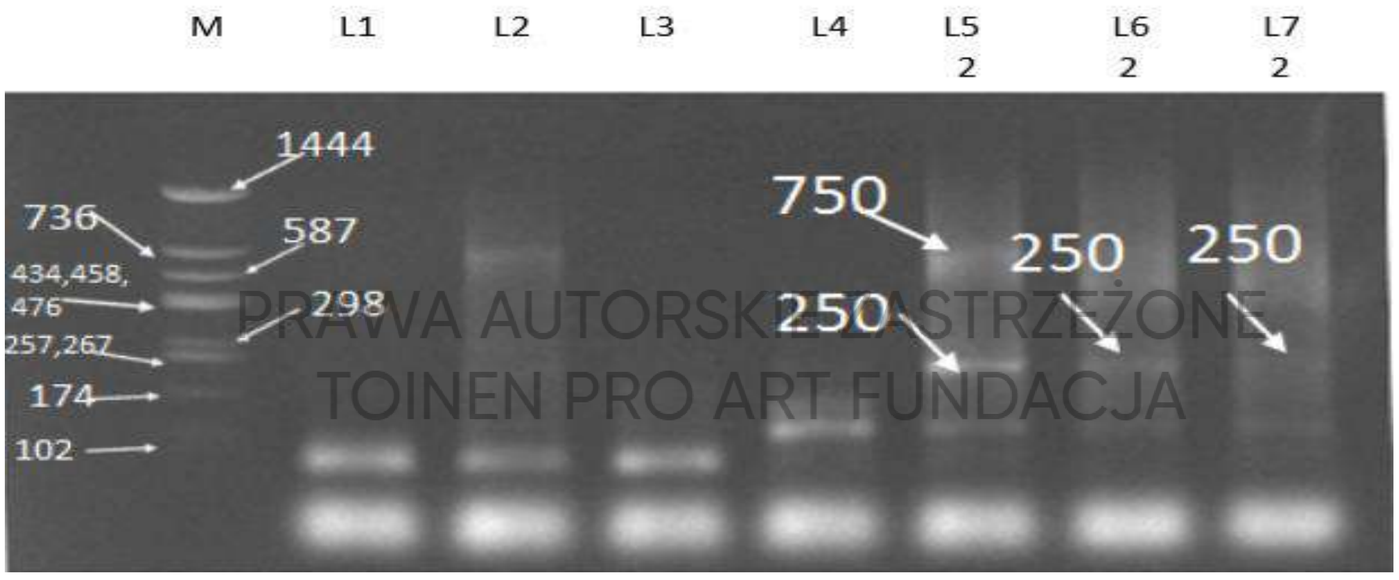
Techniki oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) znajdują ważne zastosowanie w parazytologicznej diagnostyce laboratoryjnej oraz badaniach naukowych. Dotychczas przeprowadzone badania wykazały ich przydatność do identyfikacji pasożytów, diagnostyki inwazji, charakterystyki genetycznej pasożytów, izolacji i charakterystyki genów podlegających ekspresji oraz wykrywania lekooporności. Techniki biologii molekularnej umożliwiają obecnie wykorzystanie nowych narzędzi do identyfikacji wszystkich stadiów rozwojowych pasożytów. Większość z tych metod opiera się na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Identyfikacja poszczególnych gatunków opiera się na polimorfizmie miejsc restrykcyjnych RsaI w genie 1 izotypu β-tubuliny. Najpierw przeprowadza się dwie kolejne reakcje PCR (nested-PCR) na genie 1 izotypu β-tubuliny w celu amplifikacji wystarczającej ilości DNA. Następnie polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) powstałego fragmentu jest analizowany za pomocą różnic w RsaI w celu odróżnienia *T. circumcincta, H. contortus i T. colubriformis*. Metoda ta pozwala przezwyciężyć ograniczenia morfologicznej identyfikacji stadiów larwalnych gatunków nicieni z rodziny Trichostrongylidae. Metody biologii molekularnej wykorzystywane do identyfikacji nicieni żołądkowo-jelitowych są czasochłonne, kosztowne i zazwyczaj mają niską wydajność, a zatem nie są rutynowo stosowane w praktyce weterynaryjnej (ryc. 4.).


PRAWA AUTORSKIE ZASTRZEŻONE
TOINEN PRO ART FUNDACJA
PRAWA AUTORSKIE ZASTRZEŻONE
TOINEN PRO ART FUNDACJA

ryc. 3a Larwy inwazyjne (L3) nicieni żołądkowo-jelitowych – inwazja mieszana (pow. 20x)

PRAWA AUTORSKIE ZASTRZEŻONE
TOINEN PRO ART FUNDACJA

ryc. 3b Larwa inwazyjna (L3) *Trichostrongylus* spp. (pow. 40x)



PRAWA AUTORSKIE ZASTRZEŻONE
TOINEN PRO ART FUNDACJA

ryc.4 Żel agarozowy z wynikiem badania metodą PCR

PRAWA AUTORSKIE ZASTRZEŻONE
TOINEN PRO ART FUNDACJA

ryc. 3c Larwa inwazyjna (L3) *Teladorsagia circumcincta* (pow. 40x)

Źródło-Mickiewicz, M., Czopowicz, M., Moroz, A., Szaluś-Jordanow, O., Nalbert, T., Markowska-Daniel, I., & Kaba, J. (2022). Lekooporność nicieni żołądkowo-jelitowych kóz. Część III. Epidemiologia, diagnostyka i zwalczanie oporności nicieni żołądkowo-jelitowych na leki przeciwrobacze. Życie Weterynaryjne, 97(03), 175–184.

©prawa autorskie zastrzeżone
©copyright reserved