

Appendiks

Parasitkontrol hos heste
i Danmark

Den Danske Dyrlægeforening
Faggruppe Heste



Appendiks A

Simpel McMaster-metode

Materialer: Plastikkopper (hvide engangs-kaffekopper), træspatler, engangs-plastpipetter, vægt med 0,1 g nøjagtighed, gaze (17 tråds, 20x20 cm), McMaster-slide (objektglas) med 2 tællekamre, flotationsvæske (se appendiks B) med en specifik massefylde omkring 1,20-1,30, et mikroskop med 4X, 10X og 40X objektiver.

1. Vej 4 g gødning af og placer den i en kop.
2. Tilsæt 56 ml flotationsvæske.
3. Bland prøven grundigt med træspatlen til den opnår en ensartet suspension.
4. Filtrer prøven gennem et lag gaze og bland filtratet med træspatlen.
5. Mens væsken stadig er i bevægelse, anvend plastpipetten til fylde det ene kammer på McMaster-slidet op. Gentag herefter proceduren for det andet kammer.
6. Vent herefter 5 minutter.
7. Placer McMaster-slidet under 10X-objektivet på mikroskopet. Luk kondenser-blænden til for god kontrast og sørg for at stille skarpt på undersiden af kammerets loft, hvor stregerne og luftboblerne befinder sig.
8. Tæl herefter alle æg, der befinder sig inden for tællefeltet (bestående af 6 baner) i hvert kammer.
 - a. Resultaterne registreres separat for hver ægtype; strongylide, spolorm, *Strongyloides*, bændelorm, *Eimeria* (coccidier) og eventuelt haleorm.
 - b. Multiplicer antallet af talte æg inden for hver kategori med 50 for at konvertere resultatet til antal talte æg/oocyster pr gram gødning (EPG/OPG).



Figur 1. A) Typisk McMaster-slide med to tællekamre. B) Stil skarpt på luftbobler (pil) og floterede strongylideæg (cirkel) vil findes i samme niveau.

Appendiks B

Flotationsvæske opskrift

Materialer: Glucose monohydrat, NaCl, håndlunt vand.

1. Vej 375 g glucose og 250 g NaCl af.
2. Tilsæt lunt vand op til et totalt volumen på 1 liter.
3. Varm vandet op til 80°C og rør forsigtigt indtil glucosen og saltet er opløst.
4. den specifikke massefylde, som bør være omkring 1,27*.

* Man kan måle massefylden med et hydrometer, men en nem metode er at måle 10 ml af og veje dette. Hvis massefylden er 1,27, bør 10 ml veje 12,7 g.

Appendiks C

Larvedyrkning

Materialer: Vermikulit 8str. Grov), plastikkopper, gaze (28 tråds, 5x5 cm), vægt med 0,1 g nøjagtighed, træspatler, tællekammer, Baermann-glas, stangpipetter af plast, Lugols jodopløsning (Figur 2A).

1. Vej 10 g gødning af i en kop.
2. Tilsæt en mindre mængde vermikulit til prøven sammen med en smule vand.
3. Bland prøven med træspatlen til den opnår en ensartet konsistens (porøs og fugtig uden at være vanddrivende på overfladen) (Figur 2B).

4. Lav herefter et inkubationskammer ud af to plastikkopper som vist nedenfor. Den ene kop klippes over, og der laves 8 huller i bunden af den nederste del. Fæces-blandingen placeres i bunden af den nederste del (Figur 2C), og der placeres to stykker gaze over åbningen (Figur 2D), hvorefter den øverste del af den overlappede kop presses ned over (Figur 2E). Kammeret vendes om og placeres oveni en intakt kop, hvor der er fyldt 10-20 ml vand i bunden (Figur 2F). Derved sikres fugtigheden i kammeret.

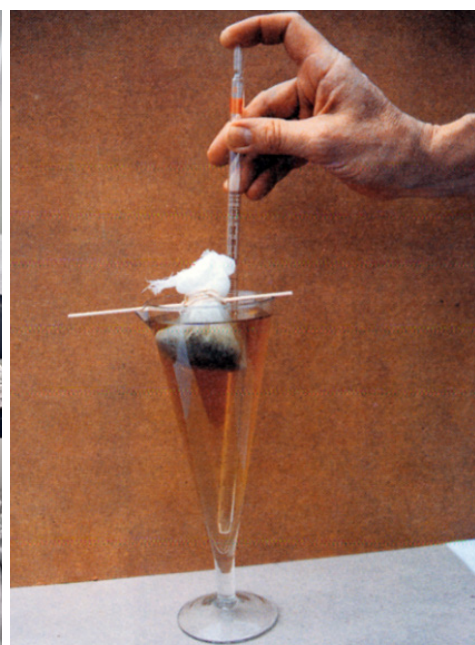
Figur 2. Fremstilling af dyrkningskammer til larvedyrkning.



5. Placer prøven ved stuetemperatur i 12-14 dage. Hold prøven fugtig, eksempelvis ved at dryppe vand i kammeret hver 3.-4. dag eller efter behov. Eventuelt placeres kammeret i en kasse, som placeres i en plastpose for at holde på fugten i et mørkt skab.
6. Herefter tages fugtkammeret op af koppen med vand og placeres i toppen af et Baermann-glas (Figur 3). Prøven fastgøres til siden af glasset med en papirclips/klemme. Vandet i koppen hældes ned i Baermann-glasset.
7. Fyld vand i glasset til prøven i fugtkammeret er helt eller næsten dækket af vand, og placer derefter glasset ved stuetemperatur i 24 timer og undgå direkte sollys.

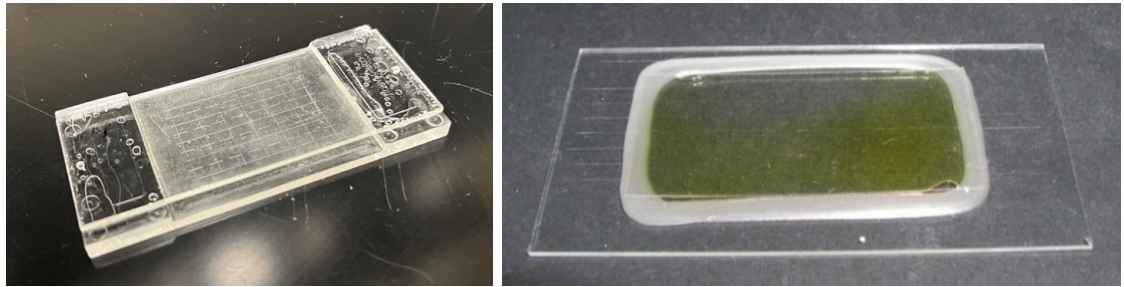


Figur 3. Prøven placeret øverst i et Baermann-glas. På billederne ses to forskellige opstillinger, der kan anvendes. Det er lettest at opsamle larverne, hvis glasset er spidsbundet.



Figur 4. Sedimentet med larver suges op fra bunden af det spidsbundede glas vha. stangpipette. (bemærk alternativ opsætning af kulturen i glasset).

8. Sedimentet overflyttes nu med en stangpipette (Figur 4) til tællekammer eller objektglas med parafinkant. Luk toppen af med pegefingeren før stangpipetten føres ned til bunden og bundfald med 2-3 ml væske slippes ind i pipetten.
 - a. Larverne bør inaktiveres forud for mikroskopi ved en af det to følgende metoder:
 - i. Tilsætning af en dråbe Lugols jodopløsning til væsken. Her skal man være opmærksom på at prøven skal aflæses hurtigt herefter, da Lugols denaturerer tarmcellerne efter fem minutter.
 - ii. Kortvarig (30-60s) opvarmning på varmeplade (50 °C). Her er det vigtigt ikke at opvarme i længere tid end højst nødvendigt, da larverne ændrer morfologi, hvis de bliver kogt.
 - b. Tællekammeret (Figur 5) undersøges nu systematisk for larver i et mikroskop med 4X- og 10X-objektiverne og lukket aperturblende for maksimal kontrast. Identifikationsnøgle følger nedenfor.



Figur 5. A) Eksempel på et nematodelarve-tællekammer. B) Hjemmelavet slide (stort objektglas med parafinkant) med dækglas.

Identifikationsnøgle:		
1.	Larver med hudskede	Gå til 3
	Larver uden hudskede	Gå til 2
2.	Rhabditiform esophagus ^a , voksne (hanner og hunner) samt larver til stede	Jordnematoder
	Filariform esophagus ^a , esophagus under 1/3 af samlet længde. Lang hale	Strongylide L1 eller L2
	Filariform esophagus ^a , esophagus 1/3 til 1/2 af samlet længde	Strongyloides westeri
3.	Meget kort hale, total længde omkring 650 µm, 16 tarmceller	Trichostrongylus axei
	Lang hale	Gå til 4
4.	8 klart definerede trekantede eller trapezoide celler	Cyathostom
	12 tarmceller eller derover	Gå til 5
5.	12 rektangulære tarmceller	Gyaloecephalus capitatus ^b
	Mere end 12 tarmceller	Gå til 6
6.	16 tarmceller	Gå til 7
	Mere end 16 tarmceller	Gå til 9
7.	16 klart definerede, trekantede tarmceller	Oesophagodontus robustus ^c
	16 rektangulære tarmceller	Gå til 8
8.	16 klart definerede, svagt rektangulære tarmceller, lang hale	Poteriostomum spp. ^b
	16 uklart definerede celler, kort esophagus, kort hale	Strongylus equinus ^c
9.	18-20 tarmceller	Gå til 10
	Flere end 20 tarmceller	Gå til 11
10.	18-20 aflange og svagt definerede tarmceller. Små og tynde larver med korte esophagus og korte haler	Strongylus edentatus ^c
	18-20 veldefinerede rektangulære tarmceller, tykke middellange larver med lange esophagus og lange haler	Triodontophorus spp. ^c
11.	28-32 veldefinerede rektangulære tarmceller. Lange og tykke larver med korte esophagus	Strongylus vulgaris ^c

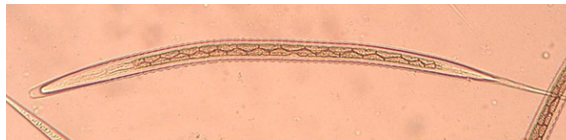
^a Se figur 6, der illustrer de to esophagus-typer

^b Cyathostom (lille strongylide)

^c Stor strongylide



Figur 6. De to typer esophagus. Øverst en filariform esophagus, som er slank og uden udposninger. Den filariforme esophagus er karakteristisk for L3 (infektive) af strongylider. Nederst en rhabditiform esophagus med to karakteristiske udposninger (pile) adskilt af et snævert segment (streg). Fritlevende nematoder og L1+L2 af strongylider har rhabditiforme esophagus.



Figur 7. *Strongylus vulgaris* L3-larve med 28-32 tydelige tarmceller.



Figur 8. *Strongylus edentatus* L3-larve med 18-20 aflange, men lettere utydelige tarmceller.



Figur 9. *Cyathostom*-larve med 8 tydelige trekantede eller trapezformede tarmceller og lang hale.

Appendiks D

Modificeret ægtællingsmetode til bændelormeæg

Materialer: Plastikkopper, vægt med 0,1 g nøjagtighed, træspatler, gaze (17 tråds, 20x20 cm), flotationsvæske med en specifik massefylde omkring 1,20-1,30, et mikroskop med 4X, 10X og 40X objektiver, objekt- og dækglass (18 X 18 mm) til mikroskopi, 15 ml centrifuge-rør, træpinde.

1. Vej 30 g gødning af i en plastikkop.
2. Tilsæt 60 ml postevand. Suspender gødningen med træspatlen og lad derefter prøven hvile i 30 minutter.
3. Omrør suspensionen og hæld den gennem et lag gaze. Pres væske ud af gødningsklumpen med træspatlen.
4. Flyd den filtrerede væske på fire 15 ml rør.
5. Centrifuger i 10 minutter ved 1,000 g.
6. Hæld supernatanten fra og resuspendér bundfaldet i den tilbageblevne væske (evt. tilsæt lidt flotationsvæske) ved hjælp af en træpind eller vortex.
7. Tilsæt flotationsvæske til 3-5 mm fra rørets øvre kant. Omrør med træpinde.
8. Centrifuger i 5 minutter ved 210 x g.
9. Overfør rørene til et stativ.
10. Tilsæt forsigtigt yderligere flotationsvæske til hvert rør indtil der dannes en svag menisk af væske over rørets øvre kant.
11. Placer et dækglass på toppen af hvert rør.
12. Vent 10 minutter.
13. Alternativt til punkt 11 og 12 kan rørene centrifugeres med dækglassene i 5 minutter ved 210 x g. Dette kræver dog en centrifuge med udsvingsrotor og et lukket indsatssystem, da dækglassene ellers vil flyve af under centrifugeringen (swing-bucket centrifuge).
14. Løft dækglassene lige op fra rørene og direkte ned på et objektglas.
15. Placer objektglasset på mikroskopet og undersøg alle fire dækglass under 4X- og 10X-objektiverne med lukket aperturblænde for maksimal kontrast.
16. Bændelormeæggene tælles, men konverteres normalt ikke til æg pr gram som ved nematodeæggene.

September 2024

Tekst: Martin Krarup Nielsen, Katrine Toft Nielsen, Stig Milan Tamsborg og Tina Holberg Pihl

Den Danske Dyrlægeforening
Thorvaldsensvej 57
DK-1871 Frederiksberg C
Tlf. +45 3871 0888
ddd@ddd.dk
www.ddd.dk

