

MCMASTER METODO MODIFIKACIJŲ PALYGINIMAS DIAGNOZUOJANT AVIŲ TRICHOSTRONGILIOZĘ

Asta Pereckienė¹, Saulius Petkevičius^{1,2}, Mindaugas Šarkūnas², Algirdas Šalomska^{1,2}

¹Lietuvos veterinarijos akademijos Veterinarijos institutas, Instituto g. 2, LT-56115 Kaišiadorys, Lietuva; tel. 8-346 6 06 87; faks. 8-346 6 06 93; el. paštas: asta_pereckiene@yahoo.com

²Užkrečiamųjų ligų katedra, Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas, Lietuva; tel./faks. 8-37 36 35 59; el. paštas: saulius.petkevicius@lva.lt

Santrauka. Eksperimento metu panaudotos avių išmatos, natūraliai invazuotos trichostrongilidų kiaušinėliais, ir palygintas septynių McMaster metodo modifikacijų efektyvumas: S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976) – I; T. Kassai, (1999) – II; G. M. Urquhart ir kt. (1996) – III ir IV centrifuguojant ir necentrifuguojant; J. Grønvold (1991) – V ir VI su prisotintu druskos tirpalu ir prisotintu druskos tirpalu su gliukoze bei D. Thienpont ir kt., (1986) – VII. Visomis modifikacijomis ištirta po 30 išmatų mėginių. Modifikacijos vertintos pagal atlikimo sudėtingumą, išaiškintą pozityvių mėginių skaičių, rastą kiaušinėlių kiekį 1 g išmatų (EPG) ir gautų rezultatų svyravimus. Invazuoti išmatų mėginiai buvo tiriami skaičiuojant helmintų kiaušinėlius viename, dviejuose ir trijuose McMaster kameros langeliuose. Lyginant modifikacijų sudėtingumą nustatyta, kad sudėtingiausia yra I, o paprasčiausia – VII modifikacija, kuria koproskopiniai tyrimai atliekami greičiausiai. Pagal išaiškintą invazuotų mėginių kiekį, skaičiuojant kiaušinėlius viename, dviejuose ir trijuose kameros langeliuose, penkiomis modifikacijomis rasta 100 proc. pozityvių mėginių, išskyrus V ir VII modifikacijas, kuriomis viename kameros langelyje buvo išaiškinta atitinkamai 97,8 proc. ir 95,6 proc. invazuotų mėginių. EPG vidurkis, skaičiuojant viename kameros langelyje, svyravo nuo 1087 – II modifikacijoje iki 412 – IV modifikacijoje. Tiriant mėginius dviejuose kameros langeliuose, EPG vidurkis buvo nuo 1082 – II modifikacijoje iki 423 – IV modifikacijoje. Skaičiuojant kiaušinėlius trijuose kameros langeliuose, EPG vidurkis svyravo nuo 1082 – II modifikacijoje iki 422 – IV modifikacijoje. Pagal gautus rezultatus, tiriant dviejuose kameros langeliuose, apskaičiuotas modifikacijų efektyvumo koeficientas. Taikant II modifikaciją, apskaičiuotas didžiausias EPG vidurkis ir gautas aukščiausias (1) efektyvumo koeficientas. Tuo tarpu žemiausias (0,39) koeficientas priklausė IV modifikacijai. Vertinant modifikacijų stabilumą, mažiausi rastų kiaušinėlių skaičiaus svyravimai išaiškinti taikant I modifikaciją. Mūsų nuomone, ši modifikacija labiausiai tinkama moksliniams tyrimams, nes tyrimo rezultatai statistikai labiausiai patikimi.

Atliekant tyrimus bet kuria mūsų aprašyta modifikacija ir naudojantis pateiktais koeficientais, yra galimybė ne tik perskaičiuoti ir suvienodinti išmatų tyrimo rezultatus, bet ir interpretuoti kitų autorių koproskopinius tyrimus.

Raktažodžiai: avys, McMaster metodas, modifikacijos, *Trichostrongylus* spp.

COMPARITIVE ANALYSIS OF MODIFICATIONS OF THE MCMASTER METHOD FOR THE ENUMERATION OF *TRICHOSTRONGYLUS* SPP. EGGS IN SHEEP FAECES

Asta Pereckienė¹, Saulius Petkevičius^{1,2}, Mindaugas Šarkūnas², Algirdas Šalomska^{1,2}

¹Laboratory of Parasitology, Veterinary Institute of Lithuanian Veterinary Academy, Instituto 2, LT-08662 Kaišiadorys, Lithuania

²Department of Infectious Diseases, Lithuanian Veterinary Academy, Tilžės str. 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania

Summary. The comparative efficacies of seven published McMaster method modifications for faecal egg counting were evaluated on sheep faecal samples containing *Trichostrongylus* spp. eggs. In the present study compared methods were reported by: I - Henriksen and Aagaard, 1976; II - Kassai, 1999; III and IV - Urquhart et al., 1996 (centrifugation and non-centrifugation methods); V and VI - Grønvold, 1991 (salt solution, and salt and glucose solution); VII - Thienpont, 1986. Each method was evaluated after the examination of 30 samples of faeces. Comparisons were made as to the number of samples found to be positive by each of the methods, the total egg counts per gram (EPG) of faeces, the variations in EPG obtained in the samples examined, and the ease of use of each of the methods. The positive samples were identified by counting *Trichostrongylus* spp. eggs in one, two and three sections of newly designed McMaster chamber. Our study showed that the most complex was Method I, and the simplest and quickest analysis was performed by Method VII. Examination of all three chambers resulted in five methods (I–IV, and VI) having 100% sensitivity, while methods V and VII had 97.8% and 95.6% sensitivity, respectively. Mean egg counts in two chambers varied from 1082 EPG (Method II) to 422 EPG (Method IV). Based on the mean egg counts for two chambers, an efficiency coefficient was calculated and equated to 1 for the highest egg count (Method II) and lowest (0.39) for Method IV. Our results have shown that from seven evaluated methods Method I (Henriksen and Aagaard) was most stable and sensitive. Examining two or three sections of the McMaster chamber resulted in increased sensitivity for all methods. Efficiency coefficients make it possible not only to recalculate and unify results of faeces examination obtained by any method but also to interpret coproscopical examinations by other authors.

Key words: sheep, MacMaster modifications, *Trichostrongylus* spp.

Įvadas. Trichostrongilidai paplitę visame pasaulyje. Jiems priskiriami atrajotojų virškinamajame trakte parazituojančios nematodai – trichostrongilidai, koperijos, bunostomai, ostertagijos, chabertijos ir nematodirai (Woolaston, Baker, 1996). Jie daro ženkliai įtaką gyvulių produktyvumui, kelia grėsmę sveikatai ir gali būti atrajotojų kritimo priežastis (Hansen, Perry, 1994). Pastaruoju metu Lietuvoje atrajotojų helmintozės nėra plačiai tyrinėjamos, tačiau literatūros šaltiniuose randama duomenų apie neigiamą virškinimo trakto parazitų poveikį gyvuliams. Apetito stoka, mažesnis nei įprasta kiekis suėstų pašarų yra svarbūs veiksniai, perspėjantys gyvulių augintojus apie subklinikinę helmintų invaziją (Coop and Holmes, 1996). Virškinimo trakto parazitų daroma žala priklauso nuo šeimininko veislės, amžiaus ir lyties, kai mažėjant pašarų sąnaudoms netenkama daug proteinų (MacRae, 1993). Gastrointestinaliniai *Ostertagia* spp. helmintai atrajotojams sukelia gastritą (išsivysto mukozinė gleivinės hiperplazija, padidėja skrandžio sulčių koncentracija), diarėją, dehidrataciją, mažėja sergančių raguočių produktyvumas bei priesvoris, o esant stipriai helmintų invazijai, gyvuliai krenta (Armour and Ogbourne, 1982; Sinder et al., 1988; Urquhart et al., 1996; Kassai, 1999). *Haemonchus contortus* nematodai atrajotojams sukelia anemiją, edemą, avims iškrenta vilna, sergantys gyvuliai netenka svorio, jie gali nugaišti staiga (Miller, Barras, 1994; Allonby, 1975; Rahman and Collins, 1990; 1991; Amarante et al., 1999). Esant *Trichostrongylus* spp. helmintų invazijai padidėja glikoproteido mucino sekrecija, lupasi virškinimo trakto epitelis, gyvuliai viduriuoja, netenka daug svorio (Poppi et al., 1986; Kimambo et al., 1988; Kassai, 1999). *Fasciola hepatica* helmintai kepenyse sukelia hemoragijas, kepenų fibrozę, hiperplastinių tulžies latakų uždegimą, kraujagyslių trombozę, pažandinę edemą, gyvuliams išsivysto anemija ir hipoalbuminanemija, jie netenka apetito, skursta, mažėja produktyvumas. Moniezių sukeliamos helmintozės dažniausiai esti besimptomės (Urquhart et al., 1996), tačiau esant didelei *Moniezia* spp. ir *Fasciola hepatica* helmintų invazijai, daug avių ir galvijų gaišta. Nustatyta, kad helmintozėms jautriausi yra jauni gyvuliai (Антипин и др., 1956).

Virškinimo trakto helmintozių profilaktika dažniausiai paremta rutininio dehelmintizavimu, kuris leidžia ne tik sumažinti helmintų kiekį atskiruose individuose, bet ir apriboti ganyklų užterštumą kiaušinėliais ((Антипин и др., 1956; Miller et al., 1998). Parazitų kontrolės programose tikslinga numatyti helmintų invazijoms atsparių konkrečių avių veislių selekciją, rezistentiškų veislių kryžminimą tarpusavyje (Bisset et al., 1996), taip pat galima būtų taikyti specialų racioną. Moksliniai tyrimai įrodė, kad avis šeriant tam tikros rūšies augalais, turinčiais daug taninų, virškinimo trakte sutrikdomas helmintų lervų vystymasis, kartu sąlygojamas nematodų žuvimas (Niezen et al., 1995; 1998). Bandymais nustatyta, kad avis šeriant ankštiniais (*Hedysarum coronarium*) augalais sumažėjo *Trichostrongylus* spp. ir *Nematodirus* helmintų skrandyje bei žarnyne (Niezen et al., 1998).

Gyvulių augintojai dažnai prašo veterinarijos laboratorijų ne tik diagnozuoti helmintozes, bet ir nustatyti parazituojančių helmintų kiekį gyvulio organizme. Tiksliausiai

parazitozės diagnozuojamos gyvulius paskerdus, bet veterinarinėje praktikoje plačiai taikomi koproskopiniai bei imunobiologiniai tyrimo metodai (Kassai, 1999). Nepaisant didelio susidomėjimo nustatyti gyvulių helmintozes serologiškai imunofermentinės analizės ELISA metodu, helmintų lervoms ir kiaušinėliams išaiškinti labiausiai paplitęs koproskopinis išmatų tyrimas, atliekamas taikant rutininę helmintų kontrolę (Urquhart et al., 1996). Dauguma parazitologinių diagnostikos tyrimų yra paprasti, nereikalauja sudėtingos įrangos. Ją lengvai gali įsigyti ir nedidelės veterinarinės diagnostikos laboratorijos (Hansen, Perry, 1994). Dažniausiai koproskopiniams tyrimams naudojama kiaušinėlių flotacija tirpale. Vėliau tiriamų išmatų suspensija mikroskopuojama, ir mėginiai vertinami skaičiuojant kiaušinėlių kiekį 1 g išmatų (Nichols, Obendorf, 1994; Ward et al., 1997). Nematodų kiaušinėlių koncentracija išmatose yra vienas svarbiausių parazitologijos rodiklių. EPG dydžiai lengvai nustatomi ne tik individualiems gyvuliams, bet ir bandai (Mes et al., 2001).

Darbo tikslas ir uždaviniai – įvertinti McMaster metodo avių koproskopinių tyrimų modifikacijų efektyvumą, jautrumą ir sudėtingumą, pateikti efektyvumo koeficientus, kurie leistų perskaičiuoti ir suvienodinti gautus rezultatus.

Medžiagos ir metodai. Tyrimai atlikti laikantis Lietuvos Respublikos įstatymų, reglamentuojančių gyvūnų globą, laikymą ir naudojimą moksliniams bandymams.

Atliekant avių koproskopinius tyrimus buvo palygintas septynių McMaster metodo modifikacijų efektyvumas: S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976) – I; T. Kassai (1999) – II; G. M. Urquhart ir kt. (1996) – III ir IV, su centrifugavimu ir be centrifugavimo; J. Grønvald (1991) – V ir VI su prisotintu druskos tirpalu ir prisotintu druskos su gliukoze tirpalu bei D. Thienpont ir kt. (1986) – VII (1 lentelė). Šias modifikacijas sąlyginai suskirstėme į dvi grupes. Pirmajai, sudėtingesnių modifikacijų grupei su centrifugavimu, priskyrėme I, II bei III modifikacijas. Į antrąją grupę be centrifugavimo pateko IV, V, VI ir VII modifikacijos.

Eksperimentui panaudotos privataus avininkystės ūkio Romanovo, Suffolk bei Tekselių veislės suaugusių avių, avinų bei jaunų avinukų, natūraliai užsikrėtusių trichostrongilidais, išmatos. Tyrimui iš gardų, nuo grindų paviršiaus buvo paimtos šviežios išmatos. Iš pradžių visi išmatų mėginiai buvo ištirti S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976) I modifikacija. Įvertinus rezultatus atrinkti mėginiai, su panašia helmintų invazija. Kiekvieno mėgino išmatų gumulėliai sutrinti atskirai. Tada paimtas pirminis mėginys ir į jį, nuolat maišant, po truputį buvo dedama bandymui tinkamų išmatų. Gautas (1,5 kg) mėginys buvo labai kruopščiai išmaišytas. Pagal atskirų modifikacijų aprašymus pasverti mėginiai sudėti į sandarius polietileno maišelius ir laikyti šaldytuve (+4°C) iki tyrimo. Kiekvienai modifikacijai paruošta po 30 mėginių. Bandymui naudoti šviežiai pagaminti flotaciniai tirpalai, laikyti kambario temperatūroje. Išmatų mėginius tyrėme Lietuvoje pagaminta ir patobulinta trijų langelių su borteliu McMaster kamera (sertifikato Nr. 21-37-483). Tyrimo metu užpildytos kameros iki mikroskopavimo buvo laikomos ne ilgiau

3 min., o visas bandymas truko 5 dienas.

Modifikacijoms palyginti helmintų kiaušinėliai skaičiuoti viename, dviejuose ir trijuose McMaster kameros langeliuose. Analizuojant gautus rezultatus viename kameros langelyje, kiaušinėliai buvo skaičiuoti pirmame, antrame ir trečiame langelyje atskirai, tuo tarpu vertinant du langelius buvo taikyti įvairūs jų deriniai (pirmas + antras, pirmas + trečias ir antras + trečias langelis). Galiausiai visos modifikacijos įvertintos skaičiuojant kiaušinėlius dviejuose langeliuose ir apskaičiuojant rastų kiaušinėlių kiekio vidurkį. Tiriant mėginius tik viename ar trijuose kameros langeliuose, pagal tiriamo mėginio tūrį ir skiedimo laipsnį perskaičiuotas kiaušinėlių kiekis 1 g išmatų.

Statistinė duomenų analizė. Kadangi darbas yra vienaip ar kitaip susijęs su kiekybiniais rodikliais, tyrimų rezultatai buvo statistiškai apdoroti ir įvertinti pagal standartinės formules. Duomenų analizė atlikta „Microsoft Excel 2000“ statistiniu paketu. Pagal tai nustatyti rastų helmintų kiaušinėlių aritmetiniai vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai ($\bar{X} \pm$ paklaida). Tirtų modifikacijų rezultatų skirtumas įvertintas pagal Studento t-kriterijų. Skirtumas buvo laikomas statistiškai patikimas, kai $p < 0,05$ arba kai apskaičiuotas $t > 1,96$.

Nepaisant to, kad tyrimams buvo naudojamos trijų langelių McMaster kameros, modifikacijų efektyvumo koeficientai apskaičiuoti dviejų langelių kamerai, nes dažniausiai helmintų kiaušinėliams mikroskopuoti naudojamos dviejų langelių kameros.

Taigi, pagal rastą EPG vidurkį dviejuose McMaster kameros langeliuose apskaičiuotas modifikacijų efektyvumo koeficientas. Daugiausia kiaušinėlių 1 g išmatų rasta modifikacija įvertinta didžiausiu (1) efektyvumo koeficientu. Atitinkamai apskaičiuoti visų modifikacijų efektyvumo koeficientai: skirtinga modifikacija išaiškintas kiaušinėlių skaičius buvo dalijamas iš didžiausiu efektyvumo koeficientu įvertintos modifikacijos rastų kiaušinėlių kiekio. Rezultatams suvienodinti, tiriant skirtingomis McMaster metodo modifikacijomis, rastą helmintų kiaušinėlių skaičių reikia padalinti iš atitinkamos modifikacijos efektyvumo koeficiento.

Skaičiuojant kiaušinėlius viename (pirmame, antrame ir trečiame atskirai) ir dviejuose (pirmas+antras, pirmas + trečias ir antras + trečias langelis) kameros langeliuose, pagal formulę nustatyta rezultatų svyravimo procentinė išraiška (Vyšniauskas et al., 2005).

Tyrimų rezultatai. Pirmiausia modifikacijas vertinome pagal pozityvių mėginių skaičių, tirdami išmatas viename, dviejuose ir trijuose McMaster kameros langeliuose. Skaičiuojant *Trichostrongylus* spp. kiaušinėlius viename kameros langelyje, net penkiomis modifikacijomis išaiškinti visi invazuoti mėginiai (2 lentelė). Iš lentelės matyti, kad tik V ir VII modifikacijomis nustatyta atitinkamai 97,8 proc. ir 95,6 proc. pozityvių mėginių. Dviejuose ir trijuose kameros langeliuose visomis modifikacijomis išaiškinta 100 proc. invazuotų mėginių.

1 lentelė. McMaster metodo modifikacijos

Modifikacijos	I	II	III	IV	V	VI	VII
	S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976)	T. Kassai (1999)	G. M. Urquhart ir kt. (1996) (centrifuguojant)	G. M. Urquhart ir kt. (1996) (necentrifuguojant)	J. Grønvold (1991)	J. Grønvold (1991)	D. Thienpont ir kt. (1986)
Jautrumas (kiaušinėlių skaičius 1 g)	20	50	50	50	50	50	100
Tiriamas išmatų mėginys, g	4	3	3	3	4	4	2
Vandens tūris, ml	56	42	42	-	-	-	-
Mirkymas	30 min.	-	-	-	-	-	-
Centrifugavimas	+	+	+	-	-	-	-
Centrifuguojamos suspensijos kiekis, ml	10	15	15	-	-	-	-
Centrifugavimo laikas ir apsisukimų sk./min.	7 min. 1200 aps./min.	3 min. 1500 aps./min.	2 min. 2000 aps./min.	-	-	-	-
Flotacinis tirpalas ir jo kiekis, ml	NaCl+cukrus (lyg. sv. 1,27) 4	prisot. NaCl (lyg. sv. 1,2) iki 15	prisot. NaCl (lyg. sv. 1,2) iki 15	prisot. NaCl (lyg. sv. 1,2) 42	prisot. NaCl (lyg. sv. 1,2) 56	NaCl+gliuko zė (lyg. sv. 1,27) 56	prisot. NaCl (lyg. sv. 1,2) 60

Atlikę modifikacijų analizę pagal rastą helmintų kiaušinėlių skaičių 1 g išmatų (EPG), nustatėme, kad, tiriant viename, dviejuose ir trijuose McMaster kameros langeliuose, geriausi rezultatai gauti taikant II modifikaciją (3

lentelė). Dviejuose kameros langeliuose šia modifikacija nustatytas didžiausias (1082) EPG vidurkis ir apskaičiuotas aukščiausias (1) efektyvumo koeficientas. Šiek tiek mažesnę (0,83) efektyvumo koeficientą gavome tirdami

mėginius I modifikacija, kurios EPG vidurkis buvo 899. Mažiausias (423) EPG vidurkis rastas tiriant IV modifikaciją, o apskaičiuotas efektyvumo koeficientas buvo tiksliai 0,39.

Eksperimento metu norėjome išsiaiškinti ir modifikacijų stabilumą, t. y. įvertinti, kuri modifikacija duoda mažiausią kiaušinėlių kiekio svyravimą 1 g išmatų. Ban-

dymo rezultatai rodo (3 lentelė), kad, tiriant viename ir dviejuose kameros langeliuose, didžiausi EPG svyravimai (atitinkamai 25,8 proc. ir 14,6 proc.) gauti VII, o mažiausi (atitinkamai 1,7 proc. ir 0,8 proc.) – I modifikacija. Išskyrus VII modifikaciją, tiriant dviejuose kameros langeliuose, visomis kitomis modifikacijomis rezultatų skirtumas buvo < 10 proc.

2 lentelė. McMaster metodo modifikacijų efektyvumas pagal išaiškintą invazuotų mėginių skaičių

McMaster metodo modifikacija	Iš viso tirta mėginių	<i>Trichostrongylus</i> spp. helmintų kiaušinėliais invazuotų mėginių skaičius						
		Viename langelyje			Dviejuose langeliuose			Trijuose langeliuose
		I	II	III	I+II	I+III	II+III	I+II+III
I	30	30	30	30	30	30	30	30
II	30	30	30	30	30	30	30	30
III	30	30	30	30	30	30	30	30
IV	30	30	30	30	30	30	30	30
V	30	29	30	29	30	30	30	30
VI	30	30	30	30	30	30	30	30
VII	30	30	27	29	30	30	30	30

3 lentelė. McMaster metodo modifikacijų efektyvumas pagal rastų helmintų kiaušinėlių skaičių

McMaster metodo modifikacija	Rastų <i>Trichostrongylus</i> spp. kiaušinėlių skaičiaus vidurkis 1g išmatų (\pm paklaida)										Efektyvumo koeficientai
	Viename langelyje				Dviejuose langeliuose					Trijuose langeliuose	
	I	II	III	Skirtumas, %	I+II	I+III	II+III	Vidurkis	Skirtumas, %	I+II+III	
II	1070 \pm 70	1120 \pm 66	1070 \pm 60	4,5	1097 \pm 56	1053 \pm 46	1095 \pm 55	1082 \pm 14	4,0	1082 \pm 50	1
I	896 \pm 34	908 \pm 33	893 \pm 32	1,7	902 \pm 26	895 \pm 21	901 \pm 25	899 \pm 2	0,8	907 \pm 24	0,83
III	620 \pm 47	663 \pm 56	613 \pm 54	7,5	640 \pm 41	618 \pm 38	638 \pm 39	632 \pm 7	3,4	635 \pm 34	0,58
VII	593 \pm 63	440 \pm 52	560 \pm 62	25,8	510 \pm 38	577 \pm 50	493 \pm 42	527 \pm 26	14,6	520 \pm 37	0,49
VI	557 \pm 46	517 \pm 34	453 \pm 45	18,7	537 \pm 28	503 \pm 36	485 \pm 32	508 \pm 15	9,7	511 \pm 29	0,47
V	467 \pm 53	500 \pm 47	453 \pm 49	6,6	485 \pm 42	462 \pm 46	477 \pm 37	474 \pm 7	4,7	471 \pm 40	0,44
IV	413 \pm 47	390 \pm 44	433 \pm 46	9,9	418 \pm 37	438 \pm 39	412 \pm 32	423 \pm 8	5,9	422 \pm 31	0,39

4 lentelė. McMaster metodo modifikacijų palyginimas pagal Stjudento kriterijų

McMaster metodo modifikacija	I	II	III	IV	V	VI	VII
I		P	P	P	P	P	P
II	P		P	P	P	P	P
III	P	P		P	P	P	P
IV	P	P	P		N	P	N
V	P	P	P	N		N	N
VI	P	P	P	P	N		N
VII	P	P	P	N	N	N	

P – patikimas skirtumas

N – nepatikimas skirtumas

Pagal Stjudento t-kriterijų, tiriant dviejuose kameros langeliuose, apskaičiuotas skirtumas tarp didžiausio ir mažiausio kiaušinėlių kiekio svyravimo 1 g išmatų, ir įvertintas modifikacijų skirtumo patikimumas (4 lentelė). Statistiškai patikimi duomenys gauti I, II ir III modifikaci-

jas lyginant su IV, V, VI ir VII modifikacijomis. Be to, patikimas skirtumas gautas lyginant IV modifikaciją su VI ($p < 0,05$). Visais kitais atvejais skirtumai buvo nepatikimi ($p > 0,05$).

Modifikacijos buvo vertinamos ir pagal atlikimo sudė-

tingumą. Nustatyta, kad mikroskopuoti mėginiai greičiausiai buvo paruošti antros grupės (IV, V, VI ir VII) modifikacijomis, kurios nereikalavo centrifugavimo. Pagal atlikimo techniką sudėtingiausios buvo pirmos grupės (I, II ir III) modifikacijos, kurioms buvo taikomas centrifugavimas.

Aptarimas ir išvados. Kiaušinėliai ir lervos, rasti išmatose, įrodo, kad gyvuliai yra užsikrėtę helmintais. Nepaisant to, kad kiekybiniai koproskopiniai metodai yra nuolatos tobulinami, skaičiuojant kiaušinėlius išmatų mėginiuose negalima tiksliai įvertinti parazituojančių helmintų kiekio gyvulio organizme. Ne visuomet nematodų kiaušinėlių kiekis tiesiogiai susijęs su tikru helmintų skaičiumi (Anon, 1986), nes kiaušinėlius produkuoja tik helmintų patelės. Nustatyta teisinga koreliacija tarp rastų kiaušinėlių ir parazituojančių nematodų kiekio diagnozuojant *Haemonchus contortus* invaziją, tačiau tuo negalima paaiškinti *T. colubriformis* (Sangster et al., 1979) arba *O. circumcincta* invazijos. *Nematodirus* spp. helmintai paprastai išskiria mažai kiaušinėlių, ir išskiriamo kiekio negalima sieti su tikru parazituojančių nematodų kiekiu (Martin et al., 1985). Atliekant koproskopinius tyrimus labai svarbu ne tik teisingai surinkti, bet ir išlaikyti išmatų mėginius iki tyrimo. Norėdami užkirsti kelią kiaušinėlių embrionavimui, reikia išmatų mėginius laikyti + 4°C temperatūroje iki 3 dienų (Smith-Buijs, Borgsteede, 1986). Kiti tyrėjai rekomenduoja koproskopiškai vertinti mėginius, kurie, surinkti hermetiškuose polietileno maišeliuose, buvo saugomi iki 7 dienų ((Prezidente, 1985; Hunt, Taylor, 1989). Gydant gyvulius antihelmin tikais, dehelmintizavimo intervalas yra trumpesnis nei 10 dienų, kiaušinėlių produkavimas slopinamas, taigi gaunami rezultatai nėra tikslūs (Martin et al., 1985). Dėl šios priežasties išmatų mėginius reikia tirti praėjus 10–14 dienų po gydymo antihelmin tikais (Coles et al., 1992). Koproskopiniais tyrimais nustatius didelį kiekį helmintų kiaušinėlių arba lervų, galima patvirtinti prieš tai spėtą diagnozę, tačiau, net ir radus nedidelį jų skaičių, negalima kategoriškai teigti, jog gyvuliai nekenčia nuo helmintozių (Anon, 1986). Neįmanoma tiksliai nuspėti ir gyvulio klinikinės būklės, nes dauguma helmintų invazijų yra subklinikinės formos (Bjørn, 1991). Subklinikinės invazijos sudaro didelę gyvulių teikiamos produkcijos endemijos dalį. Nematodų invazijas sunku diagnozuoti net reguliariai dehelmintizuojant atrajotojus (Yu et al., 2000).

Parazitologijos laboratorijos gyvulių helmintozėms diagnozuoti pritaikė ir patobulino koproskopinių tyrimų procedūras (Lyndal-Murphy, 1993). Atsiradus skirtingoms modifikacijoms, iš dalies pasikeitė originalus McMaster kiaušinėlių skaičiavimo metodas (Gordon, Whitlock, 1939), tačiau, siekiant koproskopinius tyrimus paspartinti įvairiomis patobulintomis metodo modifikacijomis, norėta išsaugoti tyrimo paprastumą bei tikslumą. Šiuo metu avininkystės ūkiuose plačiai taikomos FEC-PAK tyrimas, paremtas McMaster metodu. Tyrimas atliekamas gana greitai, nes helmintų kiaušinėlius identifikuojant išmatų mėginių centrifuguoti nereikia. Vienos laboratorijos koproskopiniams tyrimams naudoja sudėtinius išmatų mėginius, kitos – tiria individualius gyvūnus ir tik tada apskaičiuoja gautų duomenų vidurkius. Abu būdai

turi pranašumų ir trūkumų (Coles et al., 2006). C. Rossanigo ir L. Gruner (1991) atliko bandymą: koproskopinių avių tyrimą klasikiniu McMaster metodu su prisotintu MgSO₄ tirpalu lygino su metodu, kai helmintų kiaušinėliai išgaunami ir tada skaičiuojami tris kartus nucentrifugavus išmatų mėginius. Tirdami pastarujuoju metodu 10 g išmatų mėginį pagal atskiras helmintų rūšis, gavo 95,9–99,5 proc. efektyvumą. Tuo tarpu klasikinio McMaster metodo efektyvumas siekė tik 16,5 proc. bendro kiaušinėlių kiekio. J. Miller su kitais tyrėjais (1994, 1998) McMaster modifikacija avių išmatų mėginiuose kiaušinėlių neradus arba kai jų yra mažiau, nei 50 kiaušinėlių 1 g išmatų, siūlo taikyti standartinį cukraus flotacijos metodą dukart centrifuguojant.

Nepaisant to, kad kiaušinėlių skaičiavimas išmatose reikalauja nemažai laiko ir darbo sąnaudų, jis duoda vertingos informacijos apie parazituojančių helmintų invaziją atskirame individe, paties organizmo reakciją į helmintus (Anon, 1986). Nepaisant įvairių identifikavimo trūkumų, McMaster metodas koproskopiniams tyrimams yra universaliausias ir labiausiai paplitęs helmintozių tyrimo metodas (Rossanigo, Gruner, 1991). Nors yra šiuo metu išrasta keletas koproskopinio tyrimo metodų ir McMaster metodo modifikacijų, būtų tikslinga turėti suderintą standartinį metodą nematodų kiaušinėliams išmatose skaičiuoti (Coles et al., 2006).

Eksperimento metu, taikydami įvairias McMaster metodo modifikacijas, pastebėjome, kad vienos yra sudėtingesnės ir joms atlikti reikia daugiau laiko, kitos – žymiai paprastesnės. Atliekdami koproskopinius tyrimus I modifikacija, kuri priklauso pirmajai modifikacijų grupei, sugaišome ilgiausiai, nes užpilti flotaciniu tirpalu mėginiai dar 30 min. turi būti mirkomi. Taikydami antros grupės VII modifikaciją, tyrimus atlikome greičiausiai, nes smarkiai praskiesti mėginiai labai palengvino kiaušinėlių skaičiavimą. Nepaisant to, kad antros grupės modifikacijos yra paprastesnės ir atliekamos daug greičiau, McMaster kameros dugne esančios nuosėdos trukdo mikroskopuoti. Necentrifuguoti mėginiai yra neskaidrūs, taigi sunkiam mikroskopuoti, ir tyrimas trunka ilgiau. Dėl nepakankamo mėginio skaidrumo visada padidėja klaidų tikimybė, todėl tyrimo rezultatai nėra labai patikimi. Šias modifikacijas geriau taikyti tik greitiems pirminiams tyrimams, o tiksliau vertinant reikėtų rinktis pirmosios grupės modifikacijas.

Lygindami modifikacijas su centrifugavimu ir be centrifugavimo, nustatėme, kad pirmos (I, II ir III) ir antros (IV ir VI) grupės modifikacijos pagal išaiškintą invazuotų mėginių kiekį buvo labai efektyvios. Šiomis penkiomis modifikacijomis, tiriant viename, dviejuose ir trijuose kameros langeliuose, buvo nustatyta 100 proc. *Trichostrongylus* spp. kiaušinėliais invazuotų mėginių. Tik V ir VII modifikacijomis, skaičiuojant helmintų kiaušinėlius viename kameros langelyje, nepavyko išaiškinti visų užkrėstų mėginių. Manome, kad, esant stipriai helmintų invazijai ir tyrimui naudojant dviejų langelių McMaster kameras, galima pasiekti gerų rezultatų.

Analizuodami gautus duomenis pagal rastą helmintų kiaušinėlių skaičių 1 g išmatų, nustatėme, kad efektyviausios yra pirmos grupės modifikacijos, tačiau I ir II modi-

fikacijomis gauti patys aukščiausi efektyvumo koeficientai. Nepaisant to, pirmos grupės modifikacijos viena nuo kitos skiriasi tiriamo mėginio svoriu, flotacijos tirpalu, centrifugavimo laiku, apsisukimų skaičiumi per minutę bei tyrimo jautrumu. Vertindami modifikacijų stabilumą matome, kad pirmos grupės modifikacijomis gauti mažesni rezultatų skirtumai nei antros grupės modifikacijomis. Tačiau, ištyrę mėginius viename ir dviejuose kamerose langeliuose, matome, kad dviejų langelių kamera gautas rezultatų skirtumo procentas yra žymiai mažesnis.

Pasirinktų modifikacijų jautrumas svyravo nuo 20 iki 100 kiaušinėlių 1 g išmatų. Lygindami gautus rezultatus pastebėjome, kad modifikacijos efektyvumas ne visuomet priklauso nuo jos jautrumo. Pagal kiaušinėlių kiekį 1 g išmatų nustatėme, kad II modifikacija, kurios jautrumas 50 kiaušinėlių 1 g, buvo efektyviausia. I modifikacija, kurios jautrumas 20 kiaušinėlių 1 g, liko antroje vietoje. Lygindami antros grupės modifikacijas nustatėme, kad efektyviausia buvo VII modifikacija, kurios jautrumas yra 100 kiaušinėlių 1 g išmatų ir rekomenduojama smarkiai (1:30) mėginius praskiesti. Ši modifikacija buvo veiksmingesnė už IV, V bei VI, kurių jautrumas yra 50 kiaušinėlių 1 g išmatų, o mėginiai skiedžiami 1:14. Mūsų nuomone, esant stipriai helmintų invazijai, pakankamai didelis dauginimo koeficientas davė gerą rezultatą.

Manome, kad koproskopiniams tyrimams tikslingiausia naudoti dviejų arba trijų langelių McMaster kameras, tyrimus atlikti pirmos grupės I, II ir III modifikacijomis. Šiomis modifikacijomis išaiškinti visi užsikrėtę mėginiai, rasta daugiausia helmintų kiaušinėlių 1 g išmatų, taigi ir efektyvumo koeficientai yra aukščiausi, o tyrimo rezultatų svyravimai – nedideli. Tačiau moksliniams tyrimams geriausia būtų rinktis S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976) – I modifikaciją, kuri yra pati stabiliausia. Atliekant avių koproskopinius tyrimus papildomas paruoštų mėginių mirkymas, rekomenduojamas taikant šią modifikaciją, palengvina tolygų kietų gumulėlių pasiskirstymą išmatų suspensijoje. Modifikacijos autorių teigimu, šis flotacinis tyrimas yra daug efektyvesnis už lig šiol taikytus koproskopinius tyrimus, ir esant plačiai paplitusioms trichostrongilų ir askaridžių invazijoms, kiaušinėlių flotacijai geriausia naudoti prisotintos druskos su cukrumi tirpalą (Henriksen, Aagaard, 1976).

Literatūra

- Allonby E. W. Annual report of the F. A. O. sheep and goat development project, Kenya. 1975.
- Amarante A. F. T., Craig T.M., Ramsey W. S., El-Sayed N. M., Desouki A. Y., F. W. Bazer Comparison of naturally acquired parasite burdens among Florida Native, Rambouillet and cross-breed ewes. *Vet. Parasitol.* 1999. Vol. 85. 61–69.
- Anon. Manual of veterinary parasitological laboratory techniques. Ministry of Agriculture. 1986. 3rd ed. P. 24.
- Armour J. and Ogbourne C. P. 1982. Bovine ostertagiasis: A review and annotated bibliography. Commonwealth Institute of Parasitology Misc. Publ. No. 7. CAB, Farnham Royal, Slough, U. K.
- Bisset S. A., Morris C. A. Feasibility and implications of breeding sheep for resilience to nematode challenge. *Int. J. Parasitol.* 1996. Vol. 26. P. 857–868.
- Bjørn H. Anthelmintic resistance in parasitic nematodes of domestic animals. Seminars on parasitic problems in farm animals related to fodder production and management. Nansen P., Grønvold J., Bjørn H. The Estonian academy of sciences. Tartu. Estonia. 1991. P. 47–48. (P. 311)
- Coles G.C., Bauer C., Borgsteede F. H. M., Geerts S., Klei T. R., Taylor M. A., Walleer P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W. A. A. V. P.) methods of the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 1992. Vol. 44. P. 35–44.
- Coles G. C., Jackson F., Pomroy W. E., Prichard R. K., von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor M.A., Vercruyse J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 2006. Vol.136. P. 167–185.
- Coop R. L. Holmes P. H. Nutrition and parasite interaction. *Int. J. Parasitol.* 1996. 26:951–962.
- Gordon H. M., Whitlock H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. Counc. Sci. Ind. Res.* 1939. Vol. 12. P. 50-52.
- Grønvold J. Laboratory diagnoses of helminths common routine methods used in Denmark. 1991. Seminars on parasitic problems in farm animals related to fodder production and management. Nansen P., Grønvold J., Bjørn H. The Estonian academy of sciences. Tartu. Estonia. P. 47–48. pp. 311.
- Hansen J., Perry B. The epidemiology and control of helminth parasites of ruminants. 1994. Ireland. pp. 171.
- Henriksen S. A., Aagaard K. A simple flotation and McMaster method. *Nord Vet. Med.* 1976. Vol. 28 (7–8). P. 392-397.
- Hunt K. R., Taylor M. A. Use of the egg hatch assay on sheep faecal samples for the detection of benzimidazole resistant worms. *Vet. Rec.* 1989. Vol. 125. P. 153–154.
- Kassai T. Veterinary helminthology. Oxford: Butterworth – Heinemann. 1999. pp. 260.
- Kimambo A. E., MacRae J. C., Walker A., Watt C. F. Coop R. L. Effect of prolonged subclinical infection with *Trichostrongylus colubriformis* on the performance and nitrogen metabolism of growing lambs. *Vet. Parasitol.* 1988. Vol. 28. 191–203.
- Lyndal-Murphy M. Anthelmintic resistance in sheep in Australian standard diagnostic techniques for animal diseases. Edt. Corner L. A., Bagust T., J. 1993. P. 3–9.
- Martin P. J., Anderson N., Jarrett R. G. Resistance to benzimidazole anthelmintics in field strains of *Ostertagia* and *Nematodirus* in sheep. *Ast. Vet. J.* 1985. Vol. 62. P. 38–43.
- Mes T. H. M., Ploeger H. W., Terlouw M., Kooyman F. N. J., Van der Ploeg M. P. J., Eysker M. A novel method for the isolation of gastro-intestinal nematode eggs that allows automated analysis of digital images of egg preparations and high throughput screening. *Parasitology.* 2001. Vol. 123. P. 309–314.
- MacRae J. C. Metabolic consequences of intestinal parasitism. *Proc. Nutr. Soc.* 1993. 52:121–130.
- Miller J. E., Barras S. R. Ivermectin *Haemonchus contortus* in Louisiana lambs. *Vet. Parasitol.* 1994. Vol. 55. P. 343–346.
- Miller J. E., Bahirathan M., Lemarie S. L., Hembry F. G., Kearney M. T., Barras S. R. Epidemiology of gastrointestinal nematode parasitism in Suffolk and Gulf Coast Native sheep with special emphasis on relative susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. *Vet. Parasitol.* 1998. Vol. 74. P. 55–74.
- Nichols J., Obendorf D. L. Application of a composite faecal egg count procedure in diagnostic parasitology. *Vet. Parasitol.* 1994. Vol. 52. P. 337–342.
- Niezen J. H., Robertson H. A., Waghorn G. C. Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which six con-

trasting forages. Vet. Parasitol. 1998. Vol. 80. P. 15–27.

Gauta 2007 08 20

25. Niezen J. H., Waghorn T. S., Charleston W. A. G., Waghorn G. C. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. J. Agric. Sci. 1995. Vol. 125. P. 281–289.
26. Poppi D. P., MacRae J. C., Brewer A., Coop R. L. Nitrogen transactions in the digestive tract of lambs exposed to the intestinal parasite, *Trichostrongylus colubriformis*. Br. J. Nutr. 1986. Vol. 55. P. 593–602.
27. Prezidente P. J. A. Methods for the detection of resistance to anthelmintics. In: Anderson N., Waller P. J. (Eds.), Resistance in nematodes in anthelmintics drugs. Division of Animal Health, CSIRO, Australia. 1985. pp. 13–27.
28. Rahman W. A. and Collins G. H. Changes in liveweight gain and blood constituents in experimental infection of goats with a goat-derived compared with a sheep-derived strain of *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol. 1991. Vol. 38. P. 145–153.
29. Rahman W. A. and Collins G. H. Changes in liveweight gain and blood constituents and worm egg output in goats artificially infected with a sheep-derived strain of *Haemonchus contortus*. Br. Vet. J. 1990. Vol. 146. P. 543–550.
30. Rossanigo C. E., Gruner L. Accuracy of two methods for eggs counting eggs of sheep nematode parasites. Vet. Parasitol. 1991. Vol. 39. P. 115–121.
31. Sangster N. C., Whitlock H. V., Russ L. G., Gunaran M., Griffin D. L., Kelly J. D. *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* resistant to levamisole, morantel tartrate and thiabendazole: occurrence of field strains. Res. Vet. Sci. 1979. Vol. 27. P. 106–110.
32. Sinder T. G., Williams J. C., Karns P. A., Markovits J. E. and Romaine T. L. High concentration of serum gastric immunoreactivity and abomasal mucosal hyperplasia in calves infected with *Ostertagia ostertagi* and/or *Trichostrongylus axei*. Am. J. Vet. Res. 1988. 49:2101–2104.
33. Smith-Buijss C. M. C., Borgsteede F. H. M. Effect of cool storage of faecal samples containing *Haemonchus contortus* on the results of an in vitro egg development assay to test for anthelmintic resistance. Res. Vet. Sci. 1986. Vol. 40. P. 4–7.
34. Thienpont D., Rochette F., Vanparijs O.F.J. Diagnosing helminthiasis by coprological examination. Second edition 1986. Janssen Research Foundation, Beerse, Belgium. P. 40-41. (P. 208)
35. Urquhart G. M., Armour J., Duncan J.L., Dunn A. M., Jennings F. W. Veterinary Parasitology, Blackwell Science Ltd., Oxford, UK. Second edition 1996, reprinted in 2002. pp. 307.
36. Vyšniauskas A., Pereckienė A., Kaziūnaitė V. Comparative analysis of different modifications of McMaster method. Veterinarija ir zootechnika (in lithuanian). 2005. Vol. 29. P. 61–66.
37. Ward M. P., Lyndal-Murphy M., Baldock F. C. Evaluation of a composite method for counting helminth eggs in cattle faeces. Vet. Parasitol. 1997. Vol. 73. P. 181–187.
38. Woolaston R. R., Baker R. L. Prospects of breeding small ruminants for resistance to internal parasites. Int. J. Parasitol. 1996. Vol. 26. P. 845–855.
39. Yu F., Bruce L. A., Calder A. G., Milne E., Coop R. L., Jackson F., Horgan G. W., MacRae J. C. Subclinical infection with the nematode *Trichostrongylus colubriformis* increases gastrointestinal tract leucine metabolism and reduces availability of leucine for other tissues. J. Anim. Sci. 2000. Vol. 78. P. 380–390.
40. Антипин Д., Ершов В. С., Золоторев Н. А., Саляев В. А. Паразитология и инвазионные болезни сельскохозяйственных животных. Москва. 1956. 480 в.