

MCMASTER METODO MODIFIKACIJŲ LYGINAMASIS ĮVERTINIMAS

Antanas Vyšniauskas, Asta Pereckienė, Vida Kaziūnaitė

Lietuvos veterinarijos akademija, Veterinarijos institutas, Parazitologijos laboratorija, Mokslininkų g. 12, LT – 08662, Vilnius; tel./faks. (+370 5) 272 9727; el. paštas: helmint@ktl.mii.lt

Santrauka. Palygintas septynių McMaster metodo modifikacijų efektyvumas. Tyrimams panaudotos arklio išmatos, invazuotos strongilų kiaušinėliais. Kiekviena modifikacija iširta po 30 išmatų pavyzdžių. Modifikacijos vertintos pagal išaiškintų pozityvių mėginių kiekį, rastų kiaušinėlių skaičių ir jų svyravimus 1 g išmatų bei šių modifikacijų atlikimo sudėtingumą. Tirdami S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976) bei G. M. Urquhart (1996) modifikacijomis išaiškinome daugiausia pozityvių mėginių. Didžiausias helmintų kiaušinėlių skaičius 1 g išmatų rastas G. M. Urquhart (1996) modifikacija. Šį rezultatą įvertinome aukščiausiu efektyvumo koeficientu, kurį prilyginome 1. Tiriant kitomis modifikacijomis, rastas kiaušinėlių kiekis 1 g išmatų buvo dalijamas iš G. M. Urquhart (1996) modifikacija išaiškinto kiaušinėlių skaičiaus. Apskaičiuotas kiekvienos modifikacijos efektyvumo koeficientas buvo nuo 0,98 iki 0,66.

Vertinant modifikacijų stabilumą, mažiausi kiaušinėlių skaičiaus svyravimai nustatyti tiriant mėginius S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976) modifikacija. Lyginant modifikacijų sudėtingumą nustatyta, kad paprasčiausia yra D. Thienpont (1986), o sudėtingiausia – S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976) modifikacija, tačiau ji yra viena iš efektyviausių. Nors S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976) McMaster metodo modifikacija pagal kiaušinėlių skaičiaus vidurkį turi mažesnę efektyvumo koeficientą, mūsų nuomone, ji labiausiai tinka moksliniams tyrimams, nes tyrimo rezultatai yra patikimesni. Šia modifikacija buvo išaiškinti visi užsikrėtę mėginiai, o rastų kiaušinėlių kiekio svyravimas yra mažiausias. Šis tyrimas atliekamas ilgiau, nes būtina išmatas mirkyti ir centrifuguoti.

Raktažodžiai: arkliai, McMaster metodas, modifikacijos, strongilų kiaušinėliai.

COMPARATIVE ANALYSIS OF DIFFERENT MODIFICATIONS OF MCMASTER METHOD

Summary. The efficiency of seven modifications of McMaster method was compared. Investigations were based on analysis of horse faeces infected with strongyle eggs. Each modification was evaluated after examination of 30 faecal samples. The evaluation was based on the number of positive samples, total number of eggs, variation of EPG and complexity of modifications. Examination by S. A. Henriksen & K. Aagaard (1976) and G. M. Urquhart (1996) modifications have shown the largest number of positive samples. The highest EPG was obtained by G. M. Urquhart (1996) modification. To this result was given the grade of highest efficiency equalled to 1. Other modifications were evaluated dividing results of EPG by EPG obtained by G. M. Urquhart modification. Further, the efficiency coefficient of each modification was calculated. It varied from 0.98 to 0.66. The smallest variations of egg counts were obtained by S. A. Henriksen & K. Aagaard (1976) modification. It was concluded that D. Thienpont (1986) is the simplest, and S. A. Henriksen & K. Aagaard (1976) modification is the most complex, but with the highest performance. S. A. Henriksen & K. Aagaard (1976) modification of McMaster method had a lower efficiency coefficient according to EPG, and was most suitable for research as the results obtained by this modification were more reliable. Examination by S. A. Henriksen & K. Aagaard (1976) modification detected 100% of positive samples with minimal EPG variation, but for analysis it was spent more man-hours compared to the remaining methods.

Keywords: horses, McMaster method, modifications, strongyle eggs.

Įvadas. Koproscopiniai tyrimai, priklausomai nuo pasirinkto metodo, gali būti kokybiniai arba kiekybiniai. Kokybiniai tyrimai parodo, kokiais helmintais yra užsikrėtęs gyvulys, tuo tarpu kiekybiniai leidžia nustatyti ne tik užsikrėtimą helmintais, bet ir invazijos mastą. Tai labai svarbu nustatant gyvulio sveikatos būklę ir būtinybę taikyti atitinkamas dehelmintizavimo priemones.

Pastaruju metu koproskopiniams tyrimams atlikti vis dažniau taikomas McMaster metodas, pavadintas Australijoje gyvenusio mokslininko vardu. Tai yra standartinis, kiekybinis išmatų praskiedimo ir jose esančių kiaušinėlių flotacijos metodas, kai naudojamos specialios McMaster kameros. Naudojant flotacinį tirpalą helmintų kiaušinėliai iškyla prie viršutinio McMaster kameros paviršiaus, kur juos lengva suskaičiuoti, o nuosėdos nusėda ant kameros dugno. Tyrimas šiuo metodu nereikalauja sudėtingos laboratorinės įrangos, ypatingų reagentų ar didelių darbo sąnaudų, yra greitai atliekamas,

patogus ir pakankamai efektyvus ne tik moksliniuose tyrimuose, bet ir kasdieninėje veterinarinės kontrolės praktikoje.

McMaster metodą tobulino ne tik Sidnėjaus universiteto McMaster laboratorija, bet ir individualios laboratorijos, laboratorinės technikos panaudojimui ir rezultatų aiškinimui nustačiusios savo standartus (Gordon, Whitlock, 1939; Whitlock, 1948; Kassai, 1999). Daugelis tyrėjų pateikia įvairias McMaster metodo modifikacijas, kurios skiriasi tiriamų išmatų mėginio svoriu, pavyzdžių praskiedimo laipsniu, flotaciniu tirpalu, flotacijos laiku, užpildomų McMaster kameros langelių skaičiumi, tūriu ir tyrimo jautrumu (Anon, 1986; Dunn, Keymer, 1986; Proudman, Edwards, 1992; French et al., 1994; Craven et al., 1998; Meana et al., 1998; Roepstorff, Nansen, 1998; Varady et al., 2000; Osterman Lind et al., 2003; Cringoli et al., 2004). G. Cringoli su kitais mokslininkais pažymi,

kad atsiradusias daugybę McMaster metodo modifikacijų būtina jas standartizuoti (2004).

Mes manome, kad tikslinga įvertinti mūsų turimoje literatūroje aprašytų modifikacijų jautrumo skirtumus, pateikti efektyvumo koeficientus. Tai palengvintų kitų tyrėjų atliktų tyrimų interpretavimą.

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

Medžiagos ir metodai. Palyginamiesiems tyrimams pasirinkome šias McMaster metodo modifikacijas: S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976), D. Thienpont (1986), J. Grønvold (1991), G. M. Urquhart (1996) bei T. Kassai (1999).

Pateikiame trumpus taikytų McMaster metodo modifikacijų aprašymus.

S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976). Naudojamas prisotintas valgomosios druskos su cukrumi flotacinis tirpalas (lyg. sv. 1,27). 4 g šviežių išmatų sudedama į stiklainį, užpilama 56 ml vandens (santykiu 1:14). Išmatos gerai išmaišomos ir paliekamos stovėti 30 min. Tada mišinys pakartotinai išmaišomas ir filtruojamas per sietelį į kitą stiklainį. Išmaišius, į centrifuginį mėgintuvėlį supilama 10 ml filtrato ir centrifuguojama 7 min. 1 200 aps./min. Centrifuguoto mišinio supernatantas nusiurbiamas Pastero pipete, o nuosėdos paliekamos mėgintuvėlyje. Ant likusių nuosėdų užpilama iki 4 ml flotacinio tirpalo. Mėgintuvėlis supurtomas ir pipete užpildomi abu McMaster kameros langeliai. Mikroskopuojama praėjus ne mažiau kaip 2–3 min. padidinus 50 kartų. Modifikacijos jautrumas – 20 kiaušinėlių 1 g išmatų.

D. Thienpont (1986). Flotacijai naudojamas prisotintas valgomosios druskos tirpalas (lyg. sv. 1,2). 2 g šviežių išmatų sumaišoma su 60 ml flotacinio tirpalo. Gauta suspensija perkošiama per sietelį ir pašalinamos nuosėdos. Pastero pipete užpildomi abu McMaster kameros langeliai. Modifikacijos jautrumas – 100 kiaušinėlių 1 g išmatų.

J. Grønvold (1991). Autorius pateikia dvi modifikacijas, kurios skiriasi flotacinių tirpalų sudėtimi. Naudojami prisotinto valgomosios druskos (lyg. sv. 1,2) ir prisotinto valgomosios druskos su gliukoze (lyg. sv. 1,27) flotaciniai tirpalai. 4 g šviežių išmatų sudedama į plastikinį indelį, užpilama 56 ml flotacinio tirpalo ir maišoma, kol gaunama vienalytė suspensija, kuri perfiltruojama per sietelį. Gautu filtratu Pastero pipete užpildomi abu McMaster kameros langeliai. Mikroskopuojama po 2–3 min. Modifikacijos jautrumas – 50 kiaušinėlių 1 g išmatų.

G. M. Urquhart (1996). Tyrėjas pateikia dvi skirtingas modifikacijas. Vienoje jų reikalingas centrifugavimas. Abiem atvejais naudojamas prisotintas valgomosios druskos tirpalas.

Pirmas variantas. 3 g išmatų plastikiniame indelyje gerai sumaišoma su 42 ml vandens ir perkošiama per sietelį. Surinktas filtratas supurtomas ir juo užpildomas 15 ml centrifuginis mėgintuvėlis. Centrifuguojama 2 min. 2000 aps./min. Supernatantas nupilamas, o mėgintuvėlis užpildomas flotaciniu tirpalu iki ankstesnio lygio. Turinys sumaišomas ir Pastero pipete užpildomi abu McMaster

kameros langeliai. Modifikacijos jautrumas – 50 kiaušinėlių 1 g išmatų.

Antras variantas. 3 g išmatų homogenizuojama su 42 ml prisotintos druskos tirpalu. Gauta suspensija perfiltruojama per sietelį. Pastero pipete užpildomi abu McMaster kameros langeliai. Modifikacijos jautrumas – 50 kiaušinėlių 1 g išmatų.

T. Kassai (1999). Kiaušinėlių flotacijai naudojamas prisotintas valgomosios druskos tirpalas. 3 g išmatų sudedama į plastikinį indelį, užpilama 42 ml vandens ir gerai sumaišoma. Gauta suspensija perkošiama per sietelį (0,15 – 0,25 mm), išmaišoma ir įpilama į 15 ml centrifuginį mėgintuvėlį. Centrifuguojama 3 min. 1 500 aps./min. Supernatantas nupilamas arba nusiurbiamas Pastero pipete. Ant likusių nuosėdų užpilama 0,5 ml flotacinio tirpalo ir išmaišoma. Tada mėgintuvėlis flotaciniu tirpalu užpildomas iki originalios žymės. Užspaudus nykščiu mėgintuvėlio angą, sumaišomas jo turinys. Pastero pipete suspensija užpildomi abu McMaster kameros langeliai. Po 3 min. kiaušinėliai iškyla į paviršių. Modifikacijos jautrumas yra – 50 kiaušinėlių 1 g išmatų.

Pateiktos modifikacijos skyrėsi tiriamo mėginio svoriu, centrifugavimo laiku, apsisukimų skaičiumi per minutę, flotaciniu tirpalu, flotacijos laiku, skiedimo laipsniu bei jautrumu. Tiriant kai kuriomis McMaster metodo modifikacijomis centrifuguoti nereikėjo.

Norėdami įvertinti minėtas modifikacijas, SP UAB Vilniaus žirgyne iš pasirinkto arkliaus, natūraliai užsikrėtusio silpna strongilų invazija, tyrimui nuo gardo grindų paėmėme 1 kg 300 g šviežių išmatų. Pirmiausia jas labai kruopščiai išmaišėme, kad helmintų kiaušinėliai pasiskirstytų vienodai. Vadovaudamiesi modifikacijų aprašymais, atsverėme reikiamą svorio mėginį. Kiekvienai modifikacijai paruošėme po 30 mėginių, juos sudėjome į sandarius polietilinius maišelius ir šaldytuve iki tyrimo laikėme +4° C temperatūroje. Pozityvių mėginių išaiškinamumas tirtas helmintų kiaušinėlius skaičiuojant viename, dviejuose ir trijuose McMaster kameros langeliuose. Vertindami rezultatus viename kameros langelyje, kiaušinėlius skaičiavome pirmame, antrame ir trečiame langelyje atskirai, o tirdami dviejuose langeliuose, taikėme: pirmas+antras langelis, pirmas+trečias langelis ir antras+trečias langelis. Modifikacijas įvertinome skaičiuodami kiaušinėlius dviejuose langeliuose ir apskaičiuodami jų vidurkį. Kiaušinėlių kiekį, tirdami mėginius tik viename ar trijuose kameros langeliuose, taip pat perskaičiavome 1 g išmatų, atsižvelgėme į skiedimo laipsnį ir tirtą mėginio tūrį. Koproskopinius tyrimus atlikome per penkias dienas.

Mėginių mikroskopavimui naudojome patobulintą trijų langelių su borteliu McMaster kamerą, pagamintą Lietuvoje. Ją sudaro sujungtos dvi stiklo plokštelės, o bortelis mikroskopavimo metu apsaugo mikroskopo optiką – neleidžia flotaciniam tirpalui patekti ant mikroskopo stalielio. Viršutinė kameros plokštelė padengta nepermatoma plėvele, išskyrus tuos plotelius, kur išgraviruota gardelė. Aplink gardelę matomas skaidrus negraduotas laukelis. Helmintų kiaušinėliai skaičiuojami pačioje gardelėje, taip pat esantys ant linijos kairėje gardelės pusėje ir viršuje. Lietuvoje pagamintas McMaster kameras labai gerai įvertino Danijos

karališkasis parazitologijos centras, kuris patvirtino labai didelį jų tikslumą ir kokybę.

Tyrimams naudoti flotaciniai tirpalai buvo švieži ir laikomi kambario temperatūroje. Atliekdami bandymą vadovavomės daugelio mokslininkų tyrimais ir metodinėmis rekomendacijomis, kurias pateikiame. C. F. Ihler su kitais mokslininkais (1996), A. Joachim ir grupė tyrėjų (2001) nurodo, kad helmintų kiaušinėliai labai greitai embrionuoja, todėl koproskopinius tyrimus geriausia atlikti tą pačią dieną. Jei nėra galimybės iš karto tirti išmatų, jas reikia laikyti šaldytuve, plastikiniuose maišeliuose ne ilgiau kaip septynias dienas. J. Grønvold (1991), van J. A. Wyk ir L. van Wyk (2002) tyrimai parodė, kad kiaušinėliai ne taip greitai embrionuoja ir tyrimų rezultatai patikimi, kai aplinkos temperatūra yra +4 °C. L. J. Seivwright ir grupė tyrėjų teigia (2004), jog helmintų kiaušinėlių kiekis ženkliai mažėja priklausomai nuo mėginių laikymo trukmės, bet jų skaičius, helmintų invazijos intensyvumo vertinimui, lieka patikimas tris savaites. Mūsų atveju išmatų mėginiai buvo laikomi tik penkias dienas, todėl tyrimų rezultatai buvo patikimi. Kai išmatų daug, A. Roepstorff ir P. Nansen (1998) rekomenduoja perkoštus ir centrifuguotus mėgintuvėlius laikyti šaldytuve iki septynių dienų +4 °C temperatūroje, tada juos palaipsniui mikroskopuoti. Per tokį laiką nepastebėti žymesni kiaušinėlių skaičiaus pakitimai.

Norėdami gauti patikimus tyrimo rezultatus, pasinaudojome šiomis rekomendacijomis. T. Kassai siūlo (1999) paruoštą išmatų suspensiją labai gerai išmaišyti, kad kiaušinėliai vienodai pasiskirstytų tirpale, o McMaster kameros langelius užpildyti taip, kad nepakliūtų oro burbulų, kurie iškreipia skaičiavimo rezultatus. A. Roepstorff ir P. Nansen (1998) rekomenduoja užpildytą McMaster kamerą palikti stovėti 3 – 5 min. ir tik tada mikroskopuoti. Jų nuomone, galima laukti mažiausiai 3 min., kol kiaušinėliai flotaciniame tirpale iškyla. Labai svarbu, kad kiaušinėliams užtektų laiko iškilti į paviršių, kitaip skaičiavimas bus netikslus. Vadovaudamiesi S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976), J. Grønvold (1991) bei T. Kassai (1999) modifikacijų rekomendacijomis, užpildytas kameras laikėme 3 min. Tačiau, jei kiaušinėliai prieš mikroskopuojant bus per ilgai laikomi flotaciniame tirpale (15 – 20 min.), mėginiai gali tapti neskaidrūs, o kai kurių rūšių kiaušinėliai gali deformuotis ir nugrimzti, todėl maksimalus laukimo laikas turi būti ne ilgesnis nei 10 minučių. Šių mokslininkų rekomendacijomis vadovavomės ir atlikdami tyrimus su tomis modifikacijomis, kuriose nebuvo nurodytas flotacijos laikas.

Gautų rezultatų aritmetinis vidurkis (\bar{X}) apskaičiuotas pagal formulę:

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + \dots + X_n}{n} = \frac{\sum X}{n},$$

čia:

$X_{1,2,\dots}$ – kiaušinėlių skaičius mėginyje,

$\sum X$ – kiaušinėlių skaičiaus suma 30-yje mėginių,

n – tirtų mėginių skaičius ($n = 30$).

Dispersija (vidutinis kvadratinis nuokrypis) – plačiausiai taikoma kiekybiniais variacijų požymiams įvertinti ir skaičiuojama:

$$\sigma = \sqrt{\sum (x_i - x)^2 / (n - 1)},$$

čia:

x_i – konkreti reikšmė, t. y. vieno mėginio kiaušinėlių skaičius dviejuose langeliuose,

x – kiaušinėlių skaičiaus vidurkis, gautas ištyrus visus 30 mėginių dviejuose langeliuose,

n – tirtų mėginių skaičius ($n = 30$).

Rastų kiaušinėlių vidurkiai pateikiami su paklaidomis (rezultatas \pm paklaida). Standartinė vidurkio (\bar{X}) paklaida S_x apskaičiuojama pagal formulę:

$$S_x = \pm \sigma / \sqrt{n}.$$

Efektyvumo koeficientas apskaičiuotas pagal rastų helmintų kiaušinėlių skaičių 1 g išmatų skaičiuojant dviejuose McMaster kameros langeliuose. Aukščiausią efektyvumo koeficientą prilyginome 1. Juo įvertinome modifikaciją, kuria tiriant 1 g išmatų išaiškinta daugiausia kiaušinėlių. Kitomis modifikacijomis rastas kiaušinėlių skaičius 1 g išmatų buvo dalijamas iš modifikacijos, kuria tiriant išaiškinta daugiausia kiaušinėlių, skaičiaus. Taip sužinojome kiekvienos modifikacijos efektyvumo koeficientą, kuris buvo mažesnis už 1. Kad būtų galima suvienodinti rezultatus, gautus, tiriant įvairiomis McMaster metodo modifikacijomis, reikia rastų helmintų kiaušinėlių skaičių padalinti iš tos modifikacijos, kuria buvo atliekamas tyrimas, efektyvumo koeficiento.

Skirtumas tarp McMaster metodo modifikacijų įvertintas pagal skirtumo patikimumo kriterijų, t. y. Stjudento t-kriterijų:

$$t = x_1 - x_2 / \sqrt{S_{x_1}^2 + S_{x_2}^2},$$

čia:

x_1 ir x_2 – lyginamų modifikacijų kiaušinėlių skaičiaus vidurkis,

S_{x_1} ir S_{x_2} – lyginamų modifikacijų paklaidos.

Duomenys statistiškai patikimi, kai $P < 0,05$ arba kai apskaičiuotas $t > 1,96$.

Kadangi, vertindami rezultatus viename kameros langelyje, kiaušinėlius skaičiavome pirmame, antrame ir trečiame langelyje atskirai, o tirdami dviejuose langeliuose naudojome šiuos derinius – pirmas+antras langelis, pirmas+trečias langelis ir antras+trečias langelis, tai apskaičiavome kiaušinėlių skaičiaus vidurkių skirtumo procentą (y):

$$y = \frac{(x_1 - x_2) \cdot 100\%}{x_1},$$

x_1 – rastas didžiausias kiaušinėlių skaičiaus vidurkis,

x_2 – rastas mažiausias kiaušinėlių skaičiaus vidurkis.

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

Rezultatai. Bandymo metu norėjome išsiaiškinti optimaliausią skaičiuojamų McMaster kameros langelių kiekį (1 lentelė). Iš pateiktos lentelės matyti, kad, tiriant mėginius viename McMaster kameros langelyje, nė viena modifikacija neužtikrino 100% išaiškinamumo. Pastebėtas labai didelis rezultatų skirtumas tarp S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976) bei D. Thienpont (1986) modifikacijų. Tiriant S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976) modifikacija, iš 30 užsikrėtusių buvo išaiškinta nuo 29 iki 30 mėginių, o D. Thienpont (1986)

modifikacija – tik 12–19. Skaičiuojant helmintų kiaušinėlius dviejuose kameros langeliuose S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976) bei G. M. Urquhart (1996) modifikacijomis, visais atvejais rasti helmintų kiaušinėliai. Mažiausiai išaiškinta D. Thienpont (1986) modifikacija – nuo 24 iki 27 iš 30 invazuotų mėginių. Atliekant tyrimą trijuose McMaster kameros langeliuose,

visiškai išaiškinta S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976), G. M. Urquhart (1996) (abu variantai), T. Kassai (1999) bei J. Grønvold (1991) su prisotintu druskos tirpalu modifikacijomis. Pakankamai gerus rezultatus parodė D. Thienpont (1986) ir J. Grønvold (1991) su prisotintu druskos tirpalu ir gliukoze modifikacijos. Jomis išaiškinta po 29 mėginius iš 30 invazuotų.

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

McMaster metodo modifikacija ir flotacinis tirpalas	Tirta mėginių	Rastas užsikrėtusių <i>Strongylus spp.</i> helmintais mėginių skaičius						
		Viename langelyje			Dviejuose langeliuose			Trijuose langeliuose
		I-me	II-me	III-me	I+II	I+III	II+III	I+II+III
S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976) NaCl+cukrus	30	30	29	30	30	30	30	30
G.M. Urquhart (1996) prisot. NaCl	30	28	30	30	30	30	30	30
T. Kassai (1999) prisot. NaCl	30	29	24	27	29	30	30	30
J. Grønvold (1991) prisot. NaCl	30	28	29	17	30	28	30	30
G.M. Urquhart (1996) (sutrump. variantas) prisot. NaCl	30	28	22	25	29	30	28	30
J. Grønvold (1991) pr. NaCl+gliukozė	30	22	23	25	28	28	29	29
D. Thienpont (1986) prisot. NaCl	30	17	19	12	25	24	27	29

Modifikacijas įvertinome ir pagal rastų helmintų kiaušinėlių skaičių 1 g išmatų (2 lentelė). Visais atvejais, t. y. tiriant viename, dviejuose ir trijuose McMaster kameros langeliuose, geriausius rezultatus parodė G. M. Urquhart (1996) ir T. Kassai (1999) modifikacijos. Mažiausiai kiaušinėlių rasta tiriant J. Grønvold (1991) su prisotintu druskos tirpalu ir gliukoze modifikacija.

Atlikę bandymą siekėme išsiaiškinti, kuri iš septynių modifikacijų yra stabiliausia, t. y., kuri duoda mažiausią rezultatų išbarstymą. Tiriant viename McMaster kameros langelyje, rezultatai labiausiai svyravo naudojant G. M. Urquhart (1996), o mažiausiai – S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976) modifikacija (2 lentelė). Analogišką koreliaciją nustatėme ir tirdami dviejuose langeliuose. Lygindami gautus rezultatus viename ir dviejuose kameros langeliuose matome, kad, skaičiuojant kiaušinėlius dviejuose langeliuose, rezultatų skirtumo procentas yra žymiai mažesnis.

Atsižvelgdami į tai, kad dažniausiai helmintų kiaušinėliai skaičiuojami dviejuose McMaster kameros langeliuose, remdamiesi gautais rezultatais, apskaičiavome modifikacijų efektyvumo koeficientus, kurie buvo nuo 1 iki 0,66 (2 lentelė). Efektyviausia buvo G. M. Urquhart (1996) modifikacija, kurią įvertinome 1, o mažiausiai efektyvi – J. Grønvold (1991) modifikacija su prisotintu druskos tirpalu ir gliukoze.

Vertindami modifikacijas pagal tyrimo sudėtingumą nustatėme, kad paprasčiausias yra J. Grønvold (1991), D.

Thienpont (1986) ir G. M. Urquhart (1996) sutrumpinto varianto modifikacijos, o sudėtingiausios – S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976), G. M. Urquhart (1996) ir T. Kassai (1999). S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976) modifikacija iš visų trijų yra sudėtingiausia.

Vadovaudamiesi Stjudento kriterijumi, pagal rastų kiaušinėlių kiekio vidurkį apskaičiavome modifikacijų skirtumo patikimumą (3 lentelė). Patikimus skirtumus gavome lygindami G. M. Urquhart (1996) ir T. Kassai (1999) modifikacijas su J. Grønvold (1991) (abu variantai) ir G. M. Urquhart (1996) trumpesniu modifikacijos variantu. Be to, patikimas skirtumas gautas, lyginant S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976) modifikaciją su J. Grønvold (1991) modifikacija, kur flotacijai naudojamas prisotintas druskos tirpalas su gliukoze. Visais kitais atvejais gauti skirtumai buvo nepatikimi.

Aptarimas. Skaičiuojant kiaušinėlius viename McMaster kameros langelyje, išaiškinama mažiau užkrėstų gyvūnų ir gaunamas didesnis rastų kiaušinėlių kiekio svyravimas tiriamuose mėginiuose. Tačiau, mikroskopuojant pavyzdžius dviejuose ir trijuose kameros langeliuose, tyrimų rezultatai buvo labai panašūs. Taigi laboratorijos, kurios naudoja dviejų langelių McMaster kameras, atlikdamos tyrimus gali gauti pakankamai patikimus rezultatus, tačiau, turint trijų langelių kameras, išaiškinamumo procentas didesnis.

Mūsų nuomone, vertinant gautus rezultatus pagal rastų helmintų kiaušinėlių skaičių, efektyviausios yra G. M. Urquhart (1996), T. Kassai (1999) bei S.A. Henriksen ir K. Aagaard (1976) McMaster metodo modifikacijos (2 lentelė). Visoms joms buvo reikalingas centrifugavimas, tačiau modifikacijos skyrėsi tiriamo mėginio svoriu, flotacijai naudojamais tirpalais, cetrifugavimo laiku, apsisukimų skaičiumi per minutę, jautrumu ir tuo, kad taikant S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976) modifikaciją

vandeniui atskiestos išmatos dar 30 min. mirkomos vandenyje. Mirkymas ir pakartotinis maišymas užtikrina, kad net ir kietesni išmatų gumulėliai visiškai išsileistų. Ši procedūra nebūtina, jei dėl diarėjos išmatos yra minkštos. Mirkyti negalima, kai išmatos iš karto užpilamos flotaciniu tirpalu, nes kiaušinėliai, ilgiau palaikyti flotaciniame tirpale, deformuojasi (Roepstorff, Nansen, 1998).

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

McMaster metodo modifikacija ir flotacinis tirpalas	Rastų <i>Stongylus spp.</i> kiaušinėlių skaičiaus vidurkis 1g išmatų (\pm paklaida)										Efektyvumo koeficientai
	Viename langelyje				Dviejuose langeliuose					Trijuose langeliuose I+II+III	
	I-me	II-me	III-me	Rezultatų skirtumas, %	I+II	I+III	II+III	Vidurkis	Rezultatų skirtumas, %		
G. M. Urquhart (1996) prisot. NaCl	147 \pm 18	150 \pm 13	243 \pm 24	39,5%	148 \pm 12	195 \pm 17	197 \pm 12	180 \pm 12	24,9%	180 \pm 12	1
T. Kassai (1999) prisot. NaCl	200 \pm 27	163 \pm 25	167 \pm 24	18,5%	182 \pm 19	183 \pm 20	165 \pm 22	177 \pm 18	9,8%	177 \pm 18	0,98
S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976) NaCl+cukrus	143 \pm 17	159 \pm 16	164 \pm 17	12,8%	151 \pm 14	154 \pm 14	156 \pm 11	154 \pm 11	3,2%	155 \pm 12	0,85
D. Thienpont (1986) prisot. NaCl	140 \pm 26	140 \pm 22	167 \pm 29	16,2%	140 \pm 16	153 \pm 20	153 \pm 16	149 \pm 13	8,5%	149 \pm 13	0,83
J. Grønvold (1991) prisot. NaCl	143 \pm 13	153 \pm 16	97 \pm 20	32,2%	148 \pm 12	120 \pm 13	123 \pm 13	131 \pm 11	18,9%	129 \pm 11	0,73
G. M. Urquhart (1996) (sutrump. variantas) prisot. NaCl	150 \pm 18	110 \pm 18	127 \pm 17	26,7%	130 \pm 13	138 \pm 10	118 \pm 14	129 \pm 10	14,5%	129 \pm 10	0,72
J. Grønvold (1991) NaCl+gliukozė	110 \pm 18	103 \pm 15	140 \pm 20	26,4%	107 \pm 10	125 \pm 14	122 \pm 15	118 \pm 11	14,4%	118 \pm 11	0,66

3 lentelė. McMaster metodo modifikacijų palyginimas pagal Studento kriterijų

Eilės Nr.	McMaster metodo modifikacija	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
1.	G. M. Urquhart (1996)		N	N	N	P	P	P
2.	T. Kassai (1999)	N		N	N	P	P	P
3.	S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976)	N	N		N	N	N	P
4.	D. Thienpont (1986)	N	N	N		N	N	N
5.	J. Grønvold (1991) prisot. NaCl	P	P	N	N		N	N
6.	G. M. Urquhart (1996) sutrump. v.	P	P	N	N	N		N
7.	J. Grønvold (1991) prisot. NaCl+gliukozė	P	P	P	N	N	N	

P – patikimas skirtumas

N – nepatikimas skirtumas

Lyginant McMaster metodo modifikacijas, kai nereikia centrifuguoti, pagal kiaušinėlių skaičių 1 g išmatų efektyvesnė yra D. Thienpont (1986) modifikacija (2 lentelė). Ji skyrėsi tik tuo, kad rekomenduojama mėginius praskiesti santykiu 1:30. Pagal išaiškintų užkrėstų mėginių kiekį, geresnius rezultatus parodė sutrumpintas G. M. Urquhart (1996) modifikacijos variantas (1 lentelė). Todėl galima daryti prielaidą, kad mėginių skiedimas gali daryti įtaką rezultatų patikimumui.

Paprasčiausios ir greičiausiai atliekamos yra J. Grønvold (1991), D. Thienpont (1986) ir G. M. Urquhart (1996) sutrumpinto varianto modifikacijos. Jas atliekant nereikia centrifuguoti, tačiau necentrifuguoti mėginiai nėra tokie skaidrūs, todėl mikroskopavimas yra varginantis ir trunka ilgiau.

Įvairioms modifikacijoms buvo naudojami ne tik skirtingi flotaciniai tirpalai, bet ir skirtingas flotacijos laikas. Prisotinti druskos su gliukoze ir druskos su cukrumi tirpalai turi didesnę lyginamąją svorį, lengviau iškelia helmintų kiaušinėlius į paviršių, yra klampesni, todėl lengviau užpildoma McMaster kamera.

Atliekant visas modifikacijas buvo skiedžiama santykiu 1:14, išskyrus D. Thienpont (1986), kur rekomenduojama skiesti santykiu 1:30. Nors ši modifikacija nereikalauja centrifugavimo, laikoma paprasta ir greita, mūsų nuomone, smarkiai praskiedus nukenčia jos jautrumas (100 kiaušinėlių 1 g išmatų).

Mūsų tiriamų modifikacijų jautrumas svyravo nuo 20 iki 100 kiaušinėlių 1 g išmatų. Lygindami gautus rezultatus matome, kad modifikacijos veiksmingumas visiškai nepriklauso nuo jos jautrumo. G. M. Urquhart (1996) modifikacija buvo efektyviausia, nors jos jautrumas yra 50 kiaušinėlių 1 g išmatų, tuo tarpu S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976) modifikacijos jautrumas yra 20 kiaušinėlių 1 g išmatų. D. Thienpont (1986) modifikacijos jautrumas yra 100 kiaušinėlių 1 g išmatų, tačiau jos efektyvumo koeficientas yra didesnis už tų, kurių jautrumas yra 50 kiaušinėlių 1 g išmatų. Jei tyrimas atliekamas trijų langelių McMaster kameromis, mūsų tirtos modifikacijos pagal invazuotų mėginių išaiškinamumą buvo pakankamai efektyvios, todėl helmintozinės situacijos aiškinimui gali būti pritaikyta bet kuri iš jų. Moksliniams tyrimams tikslingiausia naudoti dviejų arba trijų langelių McMaster kameras, tyrimus atliekant S. A. Henriksen ir K. Aagaard (1976) modifikacija. Tada gauti tyrimo rezultatai yra stabilesni. Nors šis tyrimas atliekamas ilgiau (būtina išmatas mirkyti ir centrifuguoti), šia modifikacija išaiškinti visi užsikrėtę mėginiai, o rastų kiaušinėlių skaičiaus svyravimas mažiausias.

Literatūra

1. Anon. Manual of veterinary parasitological laboratory techniques. Ministry of Agriculture. 1986. 24p.
2. Craven J., Bjørn H., Henriksen S. A., Nansen P., Larsen M., Lendal S. Survey of anthelmintic resistance on Danish horse farms, using 5 different methods of calculating faecal egg count reduction. *Equine Vet. J.* 1998. Vol. 30. P. 289–293.
3. Cringoli G., Rinaldi L., Veneziano V., Capelli G., Scala A. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dentriticum* in sheep. *Vet. Parasitol.* 2004. Vol. 123. P. 121–131.
4. Dunn A., Keymer A. Factors affecting the reliability of the McMaster technique. *J. Helminthol.* 1986. Vol. 60. P. 260–262.
5. French D. D., Chapman M. R., Klei T. R. Effects of treatment with ivermectin for five years on the prevalence of *Aanoplocephala perfoliata* in three Louisiana pony herds. *Vet. Rec.* 1994. Vol. 135. P. 63–65.
6. Gordon H. McL., Whitlock H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. Counc. Sci. Ind. Res.* 1939. Vol. 12. P. 50–52.
7. Grønvold J. Laboratory diagnoses of helminths Common routine methods used in Denmark. In: Nansen P., Grønvold J., Bjørn H. Seminars on parasitic problems in farm animals related to fodder production and management. Tartu, Estonia. 1991. P. 47–48.
8. Henriksen S. A., Aagaard K. A simple flotation and McMaster method. *Nord Vet. Med.* 1976. Vol. 28 (7–8). P. 392–397.
9. Ihler C. F., Bjørn H. Use of two in vitro methods for the detection of benzimidazole resistance in equine small strongyles (*Cyathostoma spp.*). *Vet. Parasitol.* 1996. Vol. 65. P. 117–125.
10. Joachim A., Dülmer N., Dauschies A., Roepstorff A. Occurrence of helminths in pig fattening units with different management systems in Northern Germany. *Vet. Parasitol.* 2001. Vol. 96. P. 135–146.
11. Kassai T. *Veterinary helminthology.* Oxford. 1999. P. 260.
12. Meana A., Luzon M., Corchero J., Gómez-Bautista M. Reliability of coprological diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection. *Vet. Parasitol.* 1998. Vol. 74. P. 79–83.
13. Osterman Lind E., Eysker M., Nilson O., Uggla A., Höglund J. Expulsion of small strongyle nematodes (*cyathostomin spp.*) following deworming of horses on a stud farm in Sweden. *Vet. Parasitol.* 2003. Vol. 115. P. 289–299.
14. Proudman C. J., Edwards G. B. Validation of a centrifugation/flotation technique for the diagnosis of equine cestodiasis. *Vet. Rec.* 1992. Vol. 131. P. 71–72.
15. Roepstorff A., Nansen P. Simple McMaster technique. Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine. Food and agriculture organization of the united nations. Rome. 1998. P. 47–56.
16. Seivwright L. J., Redpath S. M., Mougeot F., Watt L., Hudson P. J. Faecal egg counts provide a reliable measure of *Trichostrongylus tenuis* intensities in free-living red grouse *Lagopus scoticus*. *J. Helminthol.* 2004. Vol. 78. P. 69–76.
17. Thienpont D., Rochette F., Vanparijs O. F. J. Diagnosing helminthiasis by coprological examination. Beerse, Belgium. 1986. P. 40–41.
18. Urquhart G. M., Armour J., Duncan J. L., Dunn A. M., Jennings F. W. *Veterinary Parasitology.* Oxford. 2002. 307 p.
19. Van Wyk J. A., Van Wyk L. Freezing of sheep faeces invalidates *Haemonchus contortus* faecal egg counts by the McMaster technique. *J. Vet. Res.* 2002. Vol. 69. P. 299–304.
20. Várady M., Kőnigová A., Čorba J. Benzimidazole resistance in equine cyathostomes in Slovakia. *Vet. Parasitol.* 2000. Vol. 94. P. 67–74.
21. Whitlock H. V. Some modifications of the McMaster helminth egg-counting technique and apparatus. *J. Counc. Sci. Ind. Res.* 1948. Vol. 21. P. 177–180.