

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ
КОЛИЧЕСТВЕННЫХ МЕТОДОВ КОПРООВОСКОПИИ**

Д.Ю. ДЕРКАЧЕВ

аспирант

В.А. ОРОБЕЦ

доктор ветеринарных наук

И.В. ЗАИЧЕНКО

кандидат ветеринарных наук

*Ставропольский Государственный Аграрный Университет,
e-mail: derkachev89@mail.ru, orobets@yandex.ru, Igorzaichenko@mail.ru*

Дана сравнительная оценка эффективности прижизненных копрологических методов диагностики гельминтозов: МакМастера, Котельникова–Хренова и концентратора Mini Parasep при искусственной закладке яиц в фекалии. Подробно приведено описание этих методов диагностики. Не установлено различия в эффективности методов МакМастера и Котельникова–Хренова с использованием счетной камеры ВИГИС, которые оказались более эффективными, чем концентратор Mini Parasep. При закладке 20 экз. яиц гельминтов в 1 г фекалий яйца не обнаружены в 60 % проб методом МакМастера, в 63 % проб – методом Котельникова–Хренова и в 72 % проб – методом Mini Parasep. При концентрации 50 яиц в 1 г фекалий методом МакМастера и Котельникова–Хренова не обнаружены яйца в 36 % проб, а методом Mini Parasep – в 42 % проб фекалий. При концентрации 200 и 300 яиц в 1 г фекалий яйца гельминтов обнаружены в пробах всеми тремя методами. Методы исследований фекалий более точны при концентрации 100 и более яиц в 1 г фекалий. С повышением концентрации внесенных в фекалии яиц эффективность методов повышалась. Менее точным оказался метод Mini Parasep, который проявлял эффективность при наличии более 200 яиц в 1 г фекалий. Чувствительность метода варьировала от 0 до 81 % в зависимости от концентрации яиц в пробах фекалий, что указывает на его недостаточную эффективность. Наличие посторонних частиц в исследуемых пробах фекалий затрудняет исследование проб и поэтому некоторые яйца гельминтов могут быть не обнаружены.

Ключевые слова: диагностика, копроовоскопия, метод МакМастера, счетная камера ВИГИС, метод Котельникова–Хренова, метод Mini Parasep, эффективность.

Известно, что изучение видового состава гельминтов у собак и кошек, распространения гельминтозов, экстенсивности и интенсивности инвазии, а также возрастной и сезонной динамики их зараженности необходимо в по-

знании эпизоотологии гельминтозов домашних плотоядных животных и эпидемиологии инвазионных болезней в каждой климато-географической зоне. Это - основа в разработке интегрированных мер профилактики и терапии опасных зоонозов [4].

В последнее время разработан ряд методов диагностики гельминтозов, особенно в области молекулярной биологии, биохимии и иммунологии (ПЦР, иммуноферментный анализ и др.). Однако эти методы на сегодняшний день дорогостоящие и не всегда применимы в повседневной практике [11]. По этой причине копрологический метод, в котором используют пробы фекалий для обнаружения паразитарных элементов (например, яиц и личинок гельминтов, ооцист и цист простейших) и подсчета их числа, является наиболее распространенным [14, 21, 22].

Важно не только обнаружение и идентификация паразитарных элементов, но и определение их числа [18]. Подсчет числа яиц играет ключевую роль в мониторинге зараженности гельминтами, в определении степени загрязнения пастбищ, в эпидемиологических исследованиях или для установления эффективности антигельминтика [22]. Все методы подсчета яиц, которые определяют число паразитарных элементов в грамме фекалий: яиц, личинок, ооцист и цист, основаны на микроскопическом исследовании проб фекалий.

Разработано несколько методов и их последующих модификаций: стандартизированные методы Котельникова–Хренова [8], Бермана–Орлова, Дарлинга, Щербовича, Фюллеборна [1]. Однако, методика МакМастера, разработанная в лаборатории МакМастер Университета Сиднея, является наиболее универсальной техникой подсчета яиц в ветеринарной паразитологии. Она была рекомендована «Всемирной ассоциацией за прогресс ветеринарной паразитологии» (WAAVP) для оценки эффективности антигельминтных препаратов у животных [23], а также для определения резистентности гельминтов к антигельминтикам [12].

Имеются сообщения о сравнении различных методов диагностики. Эффективность традиционных методов копроовоскопической диагностики изучали без точного подсчета яиц гельминтов [2, 5, 6, 7, 9]. Поэтому оценка количественных методов диагностики с искусственной закладкой яиц более достоверна.

Целесообразность и эффективность проведения дегельминтизации определяются копроскопическими исследованиями [4, 23]. Сравнительная оценка некоторых методов копрологической диагностики приведена в некоторых работах [2, 13, 16, 20]. Однако, существуют определенные трудности в выборе наиболее эффективного и простого в применении метода количественной диагностики гельминтозов, который можно было бы широко использовать в ветеринарной практике. Таким образом, изыскание эффективных методов диагностики гельминтозов весьма актуально.

Целью наших исследований было проведение сравнительной оценки эффективности копроскопических прижизненных методов МакМастера, Котельникова–Хренова и метода с использованием концентратора Mini Parasep в диагностике гельминтозов.

Материалы и методы

Яйца гельминтов *Toxocara canis* получали из фекалий собаки, зараженной токсокарами. Для проверки чувствительности и точности методов были выбраны определенные концентрации яиц: низкая (20 яиц), средняя (100–200 яиц) и высокая (500 яиц). Подготовили по 30 пробирок Эппендорфа для каждой из следующих концентраций яиц: 50, 100 и 300 яиц в грамме. Перед оценкой каждого метода точное число яиц добавляли в незараженные фекалии, после чего образец исследовали.

Метод Котельникова–Хренова [8] с использованием счетной камеры ВИГИС. Из общего объема перемешанной пробы фекалий брали 1 г и помещали в пластмассовый стаканчик, заливали 5 мл флотационного раствора аммиачной селитры плотностью 1,38, тщательно перемешивали пластмассовой палочкой и доводили до объема 30 мл. Взвесь фильтровали через металлическое ситечко в другой стаканчик и тщательно перемешивали. Затем быстро переносили пипеткой взвесь в одну из ячеек камеры объемом 0,5 мл и заполняли ее. Перед заполнением каждой последующей ячейки счетной камеры смесь перемешивали. Яйца, всплывая, размещались на нижней поверхности верхней пластины. Для подсчета яиц в 1 г фекалий умножали число яиц, выявленных в одной ячейке, на коэффициент 60 (в расчете на объем в 30 мл).

Концентратор Mini Parasер. В пробирки, содержащие 2,4 мл 10%-ного раствора формалина, добавляли по 0,9 мл этилацетата и 0,5 г фекалий, тщательно встряхивали. Центрифугировали при 1000 об./мин в течение трех минут. Откручивали крышку пробирки и сливали жидкую часть. Добавляли каплю физиологического растворов и образца на предметное стекло. Перемешивали, накрывали покровным стеклом и исследовали все поле. Найденное число яиц умножали на коэффициент 2, так как исследуется всего 0,5 г фекалий.

Метод МакМастера [24]. В ступке смешивали 1 г фекалий с 5 мл воды. Полученную суспензию пропускали через ситечко в центрифужные пробирки объемом 10 мл. Затем центрифугировали при 2000 об./мин в течение двух минут. После чего удаляли супернатант и к осадку добавляли 10 мл флотационного раствора Бреза [9], содержащего насыщенный раствор сульфата магния с насыщенным раствором тиосульфата натрия и дистиллированной водой в соотношении 3 : 3 : 1 при плотности 1,280. Осадок и флотационный раствор тщательно перемешивали и центрифугировали в течение одной минуты при 2000 об./мин. Затем пробирку аккуратно переворачивали три раза и из её центра брали 1 мл суспензии, которым заполняли обе части камеры МакМастера. Число найденных яиц умножали на коэффициент 33.

Для микроскопического исследования образцов фекалий по методу МакМастера использовали счетную камеру МакМастера, усовершенствованную МАФФ [17]. Все образцы исследовали с помощью микроскопа Микмед-6 при увеличении в 100 раз.

Для учета результатов испытаний эффективности трех методов использовали непараметрический тест Крускала-Уоллиса [15]. Для статистического анализа применяли компьютерную программу Statistica версии 9 (StatSoft, Inc, 2009). Для сравнения точности и чувствительности методов рассчитывали отношения образцов, которые позволяют обнаружить точное число яиц относительно допустимого предела ± 10 и ± 20 % соответственно.

Результаты и обсуждение

Всего проанализировано 450 проб фекалий с использованием трех методов (табл.).

Методом МакМастера при низкой концентрации (20 яиц) не обнаружены яйца в 60 % проб, при методе Котельникова–Хренова – в 63 %, и при использовании пробирок Mini Parasер – в 72 % проб фекалий.

При концентрации 50 яиц в грамме методом МакМастера не обнаружены яйца в 36 % исследованных проб. Метод Котельникова–Хренова в той же концентрации показал аналогичные результаты – 36 %. Несколько хуже получены результаты с применением пробирок Mini Parasер – 42 %.

В концентрации 200 и 300 яиц в грамме яйца обнаружены в пробах всеми тестируемыми методами.

Результаты сравнения трех выбранных методов показывают, что метод с использованием пробирок Mini Parasер проявил несколько худшую диагностическую эффективность, что связано с ручным методом диагностики. Ис-

пользование автоматического комплекса ParaSys, специально изготовленного для пробирок Mini Parasep, может повысить эффективность.

Результаты оценки методов МакМастера, Котельникова–Хренова и Mini Parasep

| Внесено яиц гельминтов в 1 г фекалий | Метод диагностики | Пробы, в которых не обнаружены яйца, % | Допустимый предел, % | |
|--------------------------------------|----------------------|--|----------------------|------|
| | | | ± 10 | ± 20 |
| 20 | МакМастер | 60 | 0 | 0 |
| 20 | Котельникова–Хренова | 63 | 0 | 0 |
| 20 | Mini Parasep | 72 | 0 | 0 |
| 50 | МакМастер | 36 | 0 | 0 |
| 50 | Котельникова–Хренова | 36 | 0 | 0 |
| 50 | Mini Parasep | 42 | 0 | 0 |
| 100 | МакМастер | 9 | 30 | 67 |
| 100 | Котельникова–Хренова | 9 | 30 | 62 |
| 100 | Mini Parasep | 15 | 15 | 39 |
| 200 | МакМастер | 0 | 63 | 81 |
| 200 | Котельникова–Хренова | 0 | 63 | 81 |
| 200 | Mini Parasep | 9 | 15 | 56 |
| 300 | МакМастер | 0 | 89 | 100 |
| 300 | Котельникова–Хренова | 0 | 87 | 100 |
| 300 | Mini Parasep | 0 | 33 | 81 |

После сравнения трех выбранных методов очевидно отсутствие существенной разницы между методами МакМастера и Котельникова–Хренова с использованием счетной камеры ВИГИС. Эти методы точны при наличии более 100 яиц в грамме. Чувствительность методов МакМастера и Котельникова–Хренова варьировала в обоих допустимых пределах (± 10 и ± 20 %) от 0 (при концентрации 20 яиц) до 100 % (при высокой концентрации). Третий сравниваемый метод с пробирками Mini Parasep дает точные результаты только в концентрации более 200 яиц в грамме фекалий. Чувствительность метода варьировала в обоих допустимых пределах (± 10 и ± 20 %) от 0 % (при концентрации 20 яиц) до 81 % (при высокой концентрации), что указывает на его неточность. Наличие других частиц в рассматриваемой суспензии делает исследование проб более трудным и некоторые яйца гельминтов могут быть не выявлены.

Точное обнаружение паразитарных элементов, а также диагностика паразитозов имеют важное значение в ветеринарной паразитологии. Из-за простоты, скорости и специфики микроскопия по-прежнему остается основным диагностическим методом во многих лабораториях.

Литература

1. Akbaev M.Sh. Veterinarnaja gel'mintologija / Pod red. Akbaeva M.Sh. - М.: Kolos, 1998. - S. 82-106.
2. Vasil'eva E.A. Jepizootologija trematodozov krupnogo rogatogo skota i sovershenstvovanie sistemy protivotrematodoznych meroprijatij v Respublike Altaj: Dis. ... kand. vet. nauk. – Novosibirsk, 2010. – 147 s.

3. *Gorshkova G.G.* Dikrocelioz krupnogo rogatogo skota v Respublike Tatarstan: Jepizootologija, diagnostika i terapija: Dis. ... kand. vet. nauk. – Kazan', 2004. – 167 s.
4. *Demidov N.V.* Fasciolez. Spravochnik po veterinarnoj gel'mintologii / Pod red. Ershova B.C. - M.: Kolos, 1964. - S. 40-53.
5. *Kac L.S.* Usovershenstvovanie metoda prizhiznennoj diagnostiki trematodoznyh zabojevanij // Nauch.-teh. bjul. - Novosibirsk, 1981. - Vyp. 50. - S. 31-34.
6. *Latypov D.G.* Gel'mintozy krupnogo rogatogo skota v respublike Tatarstan (jepizootologija diagnostika terapija): Dis. ... d-ra vet. nauk. – M., 2010. – 336 s.
7. *Lutfullin M.H., Latypov D.G., Gorshkova G.G., Timerbaeva R.R.* Metod Shherbovicha dlja diagnostiki trematodozov // Vet. konsultant. - 2002. - № 11. - S. 14-15.
8. *Migacheva L.D., Kotel'nikov G.A.* Metodicheskie rekomendacii po ispol'zovaniju ustrojstv dlja podscheta jaic gel'mintov // Bjul. Vses. in-ta gel'mintol. – 1987. - Vyp. 48. - S. 81-83.
9. *Hrenov V.M.* Usovershenstvovanie koproskopičeskoj diagnostiki gel'mintozov zhvachnyh i svinej: Avtoref. dis. ... kand. vet. nauk. – M., 1978. – 24 s.
10. *Breza M.* The improvement of the swine faeces coproscopic examination methodology using a new flotation solution and mucagel // Vet. Cas. – 1959. - № 8. – P. 569–576.
11. *Chiodini P.L.* New Diagnostics in Parasitology // Infect. Dis. Clin. – 2005. - № 19. – P. 267–270.
12. *Coles G.C., Bauer C., Borgsteede F.H.M. et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance // Vet. Parasitol. – 1992. - № 44. – P. 35–44.
13. *Cringoli G., Rinaldi L., Veneziano V. et al.* 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 dendriticum* in sheep // Vet. Parasitol. – 2004. - № 123. – P. 121–131.
14. *Cringoli G., Rinaldi L., Maurelli M.P., Utzinger J.* FLOTAC: new multivalent techniques for quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans // Nat. Protoc. – 2010. - № 5. - P. 503–515.
15. *Kruskal W.H., Wallis W.A.* Use of ranks in one-criterion variance analysis // J. of the Am. Stat. Assoc. – 1952. – V. 47, № 260. - P. 583-621.
16. *Levecke B.A., Behnke J.M., Ajjampur S.S.* Comparison of the sensitivity and fecal egg counts of the McMaster egg counting and Kato-Katz thick smear methods for soil-transmitted helminthes // J. PLoS Negl Trop Dis. – 2011. - № 5(6). – P. 12-20.
17. MAFF. Fisheries and Food, Reference Book: Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques, Ministry of Agriculture, HMSO, London. – 1986. - V. 418. – P. 5.
18. *McKenna N.Z.* The diagnostic value and interpretation of faecal egg counts in sheep // Vet. J. - 1981. - № 29. – P. 129–132.
19. *Nichols J., Obendorf D.L.* Application of a composite faecal egg count procedure in diagnostic parasitology // Vet. Parasitol. – 1994. - № 52. – P. 337–342.
20. *Pereckiene A., Kaziunaite V., Vyšniauskas A. et al.* A comparison of modifications of the McMaster method for the enumeration of *Ascaris suum* eggs in pig faecal samples // Vet. Parasitol. – 2007. - № 149. – P. 111–116.
21. *Roepstorff A., Nansen P.* Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine // FAO Animal Health Manual. - 1998. – 191 p.
22. *Ward M.P., Lyndal-Murphy M., Baldock F.C.* Evaluation of a composite method for counting helminth eggs in cattle faeces // Vet. Parasitol. -1997. - № 73. – P. 181–187.

23. Wood I.B., Amaral N.K., Bairden K. et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine) // Vet Parasitol. – 1995. - № 58. – P. 181-213.

24. Zajicek D. Comparison of the efficiency of two quantitative ovoskopic methods (article in Czech) // Vet Med. – 1978. - № 23. – P. 275-280.

Comparative assessment of efficiency quantitative methods of coproovoscopy

D.Yu. Derkachev

postgraduate

V.A. Orobets

doctor of veterinary sciences

I.V. Zaichenko

PhD in veterinary sciences

Stavropol State Agricultural University

e-mail: derkachev89@mail.ru, orobets@yandex.ru, Igorzaichenko@mail.ru

The comparative assessment of efficiency of the coprologic methods of diagnosis of helminthosis is given: MakMaster, Kotelnikov–Hrenov and Mini Parasep concentrator at an artificial laying of eggs in feces. The description of these methods of diagnostics is in detail provided. It isn't established differences in efficiency of methods of MakMaster and Kotelnikov–Hrenov with use of the calculating chamber which appeared more effective, than the Mini Parasep concentrator. At a laying of 20 expl. of eggs of helminths in 1 g of feces of egg aren't found in 60 % of tests by MakMaster's method, in 63 % – by method Kotelnikov–Hrenov and in 72 % – by Mini Parasep method. At concentration of 50 eggs in 1 g of feces Makmaster and Kotelnikov-Hrenov's method didn't find eggs in 36 % of tests, and by Mini Parasep method – in 42 % of tests. At concentration of 200 and 300 eggs in 1 g of feces eggs are found in tests by all three methods. Methods of researches of feces are more exact at concentration of 100 and more eggs in 1 g of feces. With increase of concentration of the eggs brought in feces efficiency of methods increased. The Mini Parasep method which showed efficiency in the presence of more than 200 eggs in 1 g of feces appeared less exact. Sensitivity of a method varied from 0 to 81 % depending on concentration of eggs in tests of feces that points to its insufficient efficiency. Existence of foreign particles in the studied tests of feces complicates research of tests and therefore some eggs of helminths can be not found.

Keywords: diagnostics, coproovoscopy, Makmaster's method, calculating chamber, Kotelnikov–Hrenov's method, Mini Parasep method, efficiency.