

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ОЗЁРНОГО И РЕЧНОГО РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА»**

ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЫБ

МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2009

Авторы: Чернышёва Н.Б., Кузнецова Е.В., Воронин В.Н., Стрелков Ю.А.

СОДЕРЖАНИЕ

Полное паразитологическое вскрытие рыб

1. Общие положения	4
2. Порядок исследования	5
3. Исследование кожного покрова рыб, плавников, носовой и ротовой полостей	6
4. Исследование жабр	6
5. Исследование брюшной полости и внутренних органов	7
6. Исследование головного и спинного мозга	8
7. Исследование хрящей	9
8. Исследование мышц	9
9. Исследование глаз	9
10. Методы фиксации паразитов	10
11. Методы окраски паразитов	12
Необходимое оборудование и реактивы	15
Рецепты фиксаторов и красителей	17
Литература	20

ПОЛНОЕ ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКОЕ ВСКРЫТИЕ РЫБ

1. Общие положения

Для оценки эпизоотической ситуации на водоёме исследование рыб проводят по методу полного паразитологического вскрытия. Этот метод, разработанный проф. Догелем В.А., был дополнен его учениками и последователями. Для исследования отбирают живых или погибающих рыб всех возрастных категорий в следующих количествах: личинок и мальков не менее 25 экземпляров, сеголетков 15-25, годовиков и всех рыб остальных возрастных групп по 15 экземпляров. Необходимость вскрытия именно такого количества рыб, при котором результаты исследования статистически достоверны, обоснованы Г.К. и М.Г. Петрушевскими в их работе (Петрушевский, Петрушевская, 1960). В некоторых случаях (регулярные наблюдения, исследование рыб, получающих искусственные корма, однотипность паразитофауны и т.п.) достаточно неполное паразитологическое вскрытие рыб. Результаты исследований вносят в рабочий журнал, где указывают дату, место вылова, пол, возраст, вес и длину рыбы, с данными паразитологического исследования с предварительным и окончательным определением вида найденных паразитов. Обездвиживание рыбы проводят путем разрушения спинного мозга с помощью препаровальной иглы или ножницами, делая надрез спины за головой до позвоночной артерии. Для обездвиживания рыбы можно использовать анестетики.

Длину рыбы измеряют от конца рыла до конца чешуйного покрова (АВ) и до конца хвостового плавника (АД). Лососевых рыб измеряют от конца рыла до развилки хвостового плавника (АС). Толщину рыбы измеряют штангенциркулем.

Для определения возраста рыб берут несколько чешуек в районе спины, на которых считают годовые кольца. У безчешуйных рыб берут отолиты, и после обработки их в молочной кислоте или на спилах считают годовые кольца. Чешую и отолиты рыб можно хранить длительное время, сопроводив подробной этикеткой.

При вскрытии рыб необходимо придерживаться следующей схемы. Сначала осматривают ткани или органы, обращая внимание на их цвет, размер, форму, консистенцию и наличие патологических признаков, снимая видимых невооруженным глазом паразитов. Затем ткани и органы исследуют компрессионным методом под микроскопом МБС. Для этого необходимо перенести ткань или орган на стекло 9 x 12 см, разделить на небольшие кусочки, продавливая предметным стеклом. Предметное стекло удобнее держать так, чтобы 1/3 или 1/4 стекла выступала за пределы большого стекла, как рукоятка, с помощью которой его легче сдвигать при нахождении паразита. После этого небольшой кусок продавленной ткани переносится на предметное стекло, накрывается покровным и просматривается под микроскопом при малом (10 x 20) и большом (10 x 40) увеличении.

2. Порядок исследования

2.1. Полное паразитологическое исследование рыб проводят в следующем порядке: кровь, кожа, плавники, носовая и ротовая полости, жабры, желчный и мочевой пузыри, брюшная полость, почки, сердце, пищеварительный тракт, печень, селезенка, гонады, головной и спинной мозг, хрящи, мышцы, глаза.

2.2. Для внешнего осмотра рыбу кладут в кювету. С поверхности тела снимают видимых простым глазом пиявок, рачков, глохий. Чёрные пятна на теле карповых рыб могут заключать в себе цисты с личинками сосальщика *Posthodiplostomum cuticula*. В толще чешуи и на плавниках рыб Дальневосточного комплекса паразитируют метацеркарии *Metagonimus yokogawai*. В чешуйных кармашках карпов всех возрастов паразитирует нематода *Philometroides lusiana*. Необходимо отмечать все найденные патологические признаки (повреждения, язвы, опухоли, пятна, налёт, сильное ослизнение, отсутствие слизи на коже рыбы и т.д.).

2.2. Для обнаружения кровепаразитов кровь берут пастеровской пипеткой из сердца, жаберной или хвостовой артерии и делают мазки (Крылов, 1974). Для предотвращения свёртывания крови и закупорки её в тонкой части пипетки, пипетку необходимо промывать лимоннокислым натрием. Мазок делают тонким шлифованным стеклом. Для этого на край обезжиренного стекла наносят каплю крови. Шлифованным стеклом касаются капли, которая растекается вдоль края стекла. После этого медленно продвигаем стеклом каплю к другому краю стекла, для того чтобы элементы крови растеклись в один слой. Препарат подсушивают, фиксируют, с этикеткой хранят сухими до окрашивания. В крови рыб могут паразитировать простейшие (жгутиконосцы родов *Trypanosoma* и *Cryptobia*, вегетативные стадии микроспоридий) и грегарины.

2.3. Подсчет количества крупных паразитов (рачков, гельминтов, глохий, цисты микроспоридий) проводят в абсолютных числах, а мелких (инфузорий и других простейших) – в относительных. То есть подсчитывают количество паразитов в десяти полях зрения микроскопа и определяют средний показатель. При этом высчитывают экстенсивность и интенсивность инвазии, индекс обилия по каждому паразиту в отдельности для каждого вида и возраста рыб.

2.4. Обнаруженных паразитов необходимо фиксировать, этикетировать и сохранять для дальнейшей камеральной обработки

3. Исследование кожного покрова рыб, плавников, носовой и ротовой полостей

3.1. При наружном осмотре кожного покрова и плавников рыб собирают, предварительно определяют и фиксируют всех паразитов, видимых невооружённым глазом (цисты миксоспоридий, микроспоридий, гложидии, паразитические ракообразные, пиявки и др.). Затем делают соскоб с поверхности тела. Его кладут на предметное стекло, добавляют в него воду, накрывают покровным стеклом и просматривают под микроскопом МБС, при малом (видны триходины, хилодонеллы, апиозомы, ихтиофтириусы, моногенеи и др.), и большом (видны костии, жгутиконосцы, споры миксоспоридий и др.) увеличениях. У молоди рыб первого года жизни мазок слизи берут со всей поверхности тела, у годовиков и старше – с нескольких участков тела.

3.2. Плавники отрезают, кладут на стекло в капле воды и просматривают под микроскопом МБС, растягивая иглками. Между лучами могут быть цисты миксоспоридий, цисты *Dermocystidium*, метацеркарии трематод, паразитические раки, гложидии. Далее делают соскоб и просматривают его под микроскопом при малом и большом увеличениях (видны простейшие).

3.3. В носовой полости рыб возможно нахождение паразитических простейших, рачков *Paraergasilus gylovi*, мелких моногеней. В носовые ямки крупных рыб пипеткой впрыскивают воду, оттягивая обратно водой слизь с паразитами. У молоди рыб носовые ямки малы и труднодоступны. С.С. Юхименко (1972) предложил следующий метод исследования носовых полостей мелких рыб. Следует под контролем микроскопа МБС, придерживая голову рыбы, препаровальной иглкой разорвать носовую перегородку и сделать несколько круговых движений внутри полости, подрезая и наматывая слизь на иглу. Комочки слизи исследуют на предметном стекле в капле воды.

3.4. В ротовой полости можно обнаружить трематод (*Azygia lucia* при гибели щуки выходит из кишечника в ротовую полость), рачков, пиявок, моногеней, метацеркарий трематод и простейших. Для нахождения последних необходимо сделать мазок и просмотреть его под микроскопом при малом и большом увеличении.

4. Исследование жабр

4.1. Вырезают жаберную крышку и просматривают её с внутренней стороны, где могут находиться нематоды, моногении, рачки.

4.2. Жаберные дуги вырезают, помещают в чашку Петри по порядку, так как на разных жаберных дугах количество паразитов различно. Собирают видимых паразитов, их подсчитывают и фиксируют. Затем препаровальными иглами перебирают жаберные лепестки

под микроскопом МБС для нахождения моногеней, цист миксоспоридий, цист дермоцистидиум, личинок трематод, рачков и др. паразитов. После этого делают соскоб с жаберных лепестков на предметное стекло в капле воды, накрывают его покровным стеклом и просматривают под микроскопом при малом и большом увеличениях (видны простейшие, споры миксоспоридий, микроспоридии).

5. Исследование брюшной полости и внутренних органов

Рыбу следует класть головой к левой руке исследователя, чтобы при её вскрытии не повредить мочевой пузырь. Сначала делают поперечный разрез в районе грудных плавников, далее продольным разрезом вскрывают брюшную стенку. Ножницы держат так, чтобы их тупой конец был внизу и чуть приподнят и, не доходя до анального отверстия рыбы, их следует повернуть в сторону спины до основания ребер. Затем, разрезая боковую часть тела рыбы, доводят ножницы до грудных плавников. Выделив пузыри, рыбу накрывают влажной марлей, чтобы она не подсыхала.

5.1. Желчный пузырь. Зажав пинцетом желчный проток, аккуратно отделяют желчный пузырь от печени, и помещают его на предметное стекло. Осторожно разрезают стенку пузыря. Делают соскоб с внутренней стенки пузыря на предметное стекло, накрывая его покровным, просматривают под малым и большим увеличением микроскопа (видны жгутиконосцы, споры и плазмодии миксоспоридий, метацеркарии трематод). Добавлять воду на стекло не следует, т.к. плазмодии миксоспоридий при нарушении осмотического давления разрываются. Желчь также просматривают под микроскопом.

5.2. Мочевой пузырь. Для выделения мочевого пузыря, необходимо пинцетом захватить мочевые канальца, которые располагаются внутри почек и вести их до ануса, где они сливаются. У мелких карповых рыб нужно вынуть концы мочеточников и прямой кишки и под контролем микроскопа МБС отделить мочевой пузырь. Мочевой пузырь разрезают и делают соскоб с внутренней стороны, просматривают под малым и большим увеличениях микроскопа. В мочевом пузыре рыб могут паразитировать миксоспоридии, трематоды, триходины. В мочеточниках встречаются трематоды рода *Phyllodistomum*.

5.3. Вскрытую брюшную полость только после извлечения желчного и мочевого пузырей, осматривают, при обнаружении крупных паразитов (лигула, амфилина и др.) их извлекают и фиксируют для дальнейшего изучения. В брыжейках рыб можно найти метацеркарии трематод, личинок дифиллоботриумов. Затем из брюшной полости извлекают внутренние органы, раскладывают их в чашки Петри, смочив водой.

5.4. Почки. Исследуют компрессионным методом, просматривают под микроскопом МБС (видны метацеркарии трематод, цисты миксоспоридий) и малом и большом увеличении микроскопа (видны споры и плазмодии миксоспоридий, жгутиконосцы, триходины).

5.5. Сердце. На поверхности сердца рыб можно обнаружить личинок трематод, цисты миксоспоридий. Вскрывают полость сердца, содержимое синуса и желудочка, а также стенку органа, просматривают под микроскопом МБС компрессионным методом. В крови можно обнаружить трематод рода *Sanquinicola*.

5.6. Пищеварительный тракт. Следует разделить пищеварительный тракт на пищевод, желудок, кишечник и просматривать их раздельно. Каждый участок аккуратно разрезают вдоль и его содержимое просматривают компрессионным методом под микроскопом МБС. При этом извлекают всех червей в солонку, их промывают и фиксируют спиртом для дальнейшего изучения, определения. Затем скальпелем делают соскоб со слизистой кишечника и его просматривают под большим увеличением микроскопа (видны кокцидии, миксоспоридии). Содержимое кишечника также просматривают под микроскопом.

5.7. Печень. На поверхности печени рыб можно обнаружить белые цисты ленточных червей, личинок трематод, круглых червей. Печень исследуют компрессионным методом под микроскопом МБС (видны цисты миксоспоридий).

5.8. Селезёнка. Исследуют компрессионным методом под микроскопом МБС. В селезёнке рыб можно обнаружить метацеркарии трематод, личинки нематод, цисты миксоспоридий.

5.9. Гонады. Исследуют компрессионным методом и просматривают под микроскопом МБС (видны цисты миксоспоридий, полиподиумов, плероцеркоидов ленточные черви, метацеркарии трематод), малым и большим увеличением микроскопа (видны микроспоридии, миксоспоридии). Икринки осетровых рыб, заражённые полиподиумом, крупнее и темнее здоровых. Икринки осетровых рыб, поражённые микроспоридиями рода *Sossoneta*, крупнее здоровых, грязновато-белого цвета. Содержимое зарежённой икринки – белая мутная жидкость со спорами микроспоридий.

5.10. Плавательный пузырь осматривают, разрезают и делают соскоб с внутренней поверхности, которой просматривают под микроскопом МБС, малым и большим увеличением микроскопа (видны миксоспоридии, метацеркарии трематод, нематоды).

6. Исследование головного и спинного мозга

Головной и спинной мозг рыб исследуют компрессионным методом под микроскопом для обнаружения в них миксоспоридий, микроспоридий, метацеркарий трематод.

7. Исследование хрящей

Для обнаружения микоспоридий *Myxosoma cerebralis* – паразита молоди первого года жизни лососевых рыб компрессионным методом исследуют черепные и межпозвоночные хрящи. Для выделения спор необходимо мелко раскрошить (растереть в ступке) хрящи, залить водой и просмотреть вытяжку под микроскопом.

8. Исследование мышц

У головы рыб надрезают кожу и снимают ее как чулок, открывая мышечную ткань. Скальпелем делают поперечные разрезы до хребта, отворачивая слой мышц, просматривают их, как будто листая страницы (видны цисты микоспоридий, личинки червей). Затем небольшие куски мышц исследуют компрессионным методом под микроскопом МБС (видны личинки трематод, личинки нематод, цисты микоспоридий), малом и большом увеличении микроскопа (видны споры микоспоридий, метацеркарии *Opisthorchis felinus*, плероцеркоиды *Diphilobothrium latum*).

9. Исследование глаз

Из впадины извлекают глазное яблоко, кладут его в солонку и аккуратно разрезают. Извлекают хрусталик, стекловидное тело и содержимое передней камеры глаза, раскрывают отдельно на предметном стекле, просматривая под микроскопом МБС. В хрусталиках рыб паразитируют метацеркарии трематод семейства *Diplostomidae*, в стекловидном теле - метацеркарии трематод семейства *Diplostomidae*, личинки нематод *Desmidacercella*, в глазной жидкости - микоспоридий, метацеркарии трематод. Соскоб с внутренних стенок глаза исследуют компрессионным методом под микроскопом МБС. Обнаруженных метацеркарий трематод извлекают, считают (отдельно инвазионных и неинвазионных) и отмывают в пресной воде. Если метацеркарий в хрусталике много (десятки и сотни), отмывку их удобнее проводить в 0,2 л стаканчике методом отмучивания и последовательных сливов. У живых метацеркарий подтверждают их принадлежность к роду *Diplostomum* и выявляют специфические особенности морфологии. Для этого собранных метацеркарий помещают на предметное стекло с лункой и исследуют их под малым увеличением микроскопа, обращая основное внимание на форму их тела, количество и характер расположения известковых телец. По форме и размерам известковых телец дифференцируют метацеркарий рода *Diplostomum* от таковых рода *Tylodelphys* (у первых известковые тельца имеют шаровидную форму и разные размеры, у вторых - они овальные и одинакового размера). Количество и характер расположения известковых телец в теле метацеркарий рода *Diplostomum* – один из важных морфологических

особенностей этого вида. В глазах у одной рыбы могут одновременно паразитировать несколько видов рода *Diplostomum*. Известковые тельца отсутствуют у недостигших инвазионной стадии развития (чаще у молоди рыб) и утративших инвазионность метацеркарий (чаще у рыб старше пяти лет). Метацеркарии трематод без известковых телец только считают, не собирая для дальнейшей обработки и определения до вида. Видовая принадлежность возбудителей диплостомозов рыб определяется только по инвазионным метацеркариям.

10. Методы фиксации паразитов

10.1. Мазки крови фиксируют в стаканчике с метанолом или смесью спирта и эфира (разведение 1:1) в течение 2-3 минут, подсушивают на воздухе, этикетируют и хранят в сухом виде, завернув в бумагу.

10.2. Простейших (инфузорий родов *Apiosoma*, *Scyphidia*, *Capriniana*, *Chillodonella* и др.) фиксируют в жидкости Шаудина. Слизь с содержащимися в ней паразитами тонким слоем размазывают по покровному стеклу, прикрепляют его к расщеплённой спичке и подсушивают до стадии, когда жидкость не стекает, но мазок ещё влажный. Затем стекло опускают мазком вниз в бюкс с жидкостью Шаудина на 10 минут. Затем мазок промывают 70° спиртом и переносят на 3- 5 минут в раствор йода в 70° спирте, разведённым до цвета крепкого чая, для удаления сулемы, входящей в состав фиксатора. После этого мазок промывают 70° спиртом –5-10 минут для удаления остатков йода. Мазки хранят в стаканчике с 70° спиртом до окрашивания.

10.3. Простейших класса жгутиконосцы фиксировать в смеси растворов Шаудина с ледяной уксусной кислотой. В 20 мл жидкости Шаудина капают 1 капля кислоты (непосредственно перед употреблением), слегка нагревают смесь до появления паров. Влажный мазок опускают в часовое стекло с подогретой смесью на 2-5 минут. Далее промывают в 70° спирте две минуты, затем переносят в смесь йод с 70° спиртом на две минуты и споласкивают 70° спиртом. Хранить в стаканчике со спиртом.

10.4. Триходин оставляют на покровном стекле до подсыхания слизи, в которой были найдены паразиты. Затем стекла переносят в сухую склянку или коробочку, накрывают этикеткой и хранят до последующей окраски. На дно стаканчика кладут чистую бумагу, на неё складывают стекло мазком вниз и сверху кладут этикетку.

10.5. При обнаружении спор микроспоридий на предметное стекло капают жидкий желатин-глицерин и накрывают каплю покровным стеклом. Если спор много (раздавлена крупная циста), то можно сделать несколько препаратов. Для этого нужно снять покровное стекло, капнуть на предметное стекло каплю смеси желатин-глицерин и накрыть чистым

покровным стеклом. А из покровного стекла со спорами сделать второй препарат (на чистое предметное стекло, капнуть желатин-глицерин и накрыть покровным стеклом). Это необходимо для того, чтобы лежали в один слой.

10.6. Кокцидий фиксируют методом, предложенным Мольнаром (Molnar, 1977). Мазок слизи на предметном стекле накрывают покровным стеклом, добавляют под него несколько капель 4 % формальдегида или 2,5 % глутаральдегида и обмазывают канадским бальзамом покровное стекло по периметру. Размер и структура ооцист сохраняется от 4 недель до 1 года.

10.7. Моногеней (рода *Dactylogirus*, *Gyrodactylus* и др.) фиксируют в жидком желатин-глицерине (Гусев, 1978, 1983). Для этого следует положить 2-3 червя с каплей воды на предметное стекло. Для распрямления живых червей можно добавить каплю 0,5 –1,0 % раствора аммиака или слегка подогреть стекло, проводя им над пламенем спиртовки до момента вытягивания червей; отсосать избыток воды, дать подсохнуть, и только после этого капнуть жидкий желатин-глицерин и накрыть покровным стеклом. Покровные стёкла должны быть обезжиренными и тонкими. Класть стекло нужно выпуклой стороной вниз, иначе при положении вогнутой стороны образуется пузырёк, и слой желатин-глицерина будет толстым. Глядя в бинокляр, надавить иглой на покровное стекло, пока хитиновые образования червей не станут хорошо видными. Далее следует проверить (под большим увеличением микроскопа) достаточно ли сплющены черви, если недостаточно, то, подогрев препарат снизу, нужно снова надавить иглой покровное стекло над объектами. Для длительного хранения препараты следует обмазать по краю покровного стекла горячей смесью воска с канифолью, контроль работы следует вести под микроскопом МБС.

Для изготовления временных препаратов предложен другой метод фиксации моногеней (Ergens, 1969). Заранее готовится смесь пикрат аммония, который капают под покровное стекло с моногенями. Но следует помнить, что пикрат аммония сохнет быстрее, желатин-глицерин и если ставить препараты на ребро, то реактив может вытечь.

Моногеней рода *Diplozoön* фиксируют методом, предложенным Хотеновским (1974). Для этого червей кладут на предметное стекло в капле воды, подогревают, накрывают покровным стеклом. Затем покровное стекло снимают, на него переносят червя, избыток воды удаляют. Стекло с паразитом опускают на предметное стекло с каплей фиксатора Ван-Клива на 20-30 мин в чашку Петри. Фиксатор добавляют по мере испарения. Затем паразит переводится в пробирку с 70° спиртом до изготовления препарата. Также для определения паразита до вида перед фиксацией у червя необходимо отрезать задний отдел тела, положить его на предметное стекло, капнуть жидкий желатин-глицерин и накрыть покровным стеклом так, чтобы были хорошо видны все крючки.

10.8. Трематод отмывают от слизи, кладут на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и пипеткой подливают 70° спирт с одной стороны стекла, а с другой - оттягивают воду фильтровальной бумагой до тех пор, пока препарат полностью не заполнится спиртом. Фиксация закончена, если гельминт потерял прозрачность. Затем аккуратно снимают покровное стекло, и червей переносят в пробирку с этикеткой, заполненной 70° спиртом. Для фиксации трематод можно использовать реактив Ван-Клива, который готовится заранее. Предметные стёкла с паразитами в чашке Петри заливают реактивом. Фиксация считается законченной, когда черви станут непрозрачными. Затем паразитов переносят в пробирку с 70° спиртом.

Метацеркарий мелких трематод (рода *Diplostomum*, *Cotylurus*, *Paracrinogonimus* и др.) фиксируют и окрашивают одновременно. Фиксацию и окраску метацеркарий проводят уксуснокислым кармином путем окраски живых метацеркарий в минимальном количестве воды в пробирке объемом 4-5 мл. Соотношение объема краски и воды в пробирке должно быть не менее 10:1. Все последующие манипуляции с трематодами осуществляют в той же пробирке путем смены реактивов тонкой пипеткой. Через 15-20 минут краску сливают, заменив таким же объемом 1% раствором соляной кислоты в 70° этиловом спирте на 5-10 минут. На этой стадии работы можно хранить метацеркарии трематод для дальнейшей камеральной обработки.

10.9. Ленточных червей фиксируют также как трематод, кроме того, что стекла, на которых проводится фиксация 70° спиртом, должны быть толще, а время фиксации больше. Если черви крупные, то на стекло, следует ставить грузик для большего уплощения червя.

10.10. Нематод фиксируют горячим 70° спиртом в длинной пробирке. При этом пробирку следует держать пинцетом отверстием от себя. После фиксации нематод хранят в пробирке с 70° спиртом и этикеткой. Круглых червей можно фиксировать и хранить в жидкости Барбагалло.

10.11. Скребней, ракообразных, гложидий и пиявок фиксируют 70° спиртом или 4 % раствором формальдегида в небольшой пробирке, где они в последующем хранятся с этикеткой. Перед фиксацией скребней нужно отмыть от слизи и продавить между стёклами так, чтобы их хоботок вывернулся наружу. Фиксируют между стёкол до потемнения скребня. Для большего уплощения червя на стекло ставят грузики.

11. Методы окраски паразитов

1.1. Мазки крови окрашивают азур-эозином (краска Романовского) или метиленовой синью. Имеющуюся в продаже краску Романовского перед окраской разводят дистиллированной водой из расчета 2-3 капли краски на 1 мл воды. Продолжительность окраски 20-40 минут. Эритроциты окрашиваются в красный или розовый цвет, протоплазма

паразитов и лейкоцитов – в синий, ядра паразитов – в красный, ядра лейкоцитов – в фиолетовый.

Раствор метиленовой сини перед употреблением разводят дистиллированной водой 1:10. Мазки крови окрашивают в течение 30 секунд, затем промывают водой и дифференцируют в течение нескольких секунд 5-10 % водным раствором танина. Эритроциты окрашиваются в красно-фиолетовый цвет, протоплазма простейших кровепаразитов – ярко-голубой, ядра лейкоцитов – фиолетовый.

11.2. Для окраски паразитических инфузорий используют железный гематоксилин Гейденгайна. Мазки промывают в воде и помещают на 24 часа в 3 % раствор железоаммиачных квасцов. Затем переносят в 1 % спиртовой раствор гематоксилина на несколько часов и дифференцируют 1 % раствором железоаммиачных квасцов. Также инфузории можно окрашивать гематоксилином Делафильда или квасцовым кармином. Для окраски ядер инфузорий предлагается холодный способ окраски по Фельгену (Роскин, 1957).

Паразитических жгутиконосцев окрашивают железным гематоксилином или методом Романовского-Гимза.

11.3. Инфузорий семейства Trichodiniidae подвергают импрегнации азотнокислым серебром по Клейну. На мазок с триходинами капают 1 % раствор азотнокислого серебра, выдерживают в темноте 10 минут. Затем ставят под кварцевую лампу или солнечный свет до потемнения инфузорий, промывают водой и дифференцируют в растворе гипосульфита натрия, контролируя под микроскопом МБС степень очистки триходин от серебра (крючья должны быть темными). После этого мазки несколько раз промывают водой, просушивают, капают бальзам и накрывают покровным стеклом. Препараты хранят в темноте.

11.4. Трематод, цестод и скребней окрашивают квасцовым кармином. Для этого фиксированных в 70° спирте гельминтов промывают несколько часов в проточной или часто сменяемой воде, затем помещают в краску на одну минуту или несколько часов в зависимости от толщины гельминта. Степень окраски паразитов контролируют под микроскопом МБС. Окрашенных паразитов переносят в дистиллированную воду на несколько минут, излишки жидкости убирают фильтровальной бумагой, проводят через спирты возрастающей крепости (70°, 80°, 96°), выдерживая в них по несколько минут. Обезвоженных паразитов просветляют гвоздичным маслом или ксилолом и заливают бальзамом.

Метацеркарий родов Diplostomidae, Cotylurus проводят через спирты возрастающей крепости (85° и два раза 96° этиловый спирт) и просветляют диметилфталатом (диметиловый эфир фталевой кислоты). Диметилфталат вносят в пробирку пипеткой, медленно выпуская его по стенке пробирки в спирт. Метацеркарии при этом оказываются на границе спирта и

диметилфталата. Просветление считается законченным при опускании метацеркарий на дно пробирки. Затем поверхностные слои в пробирке удаляют, заменяя их диметилфталатом.

Для изготовления постоянных препаратов из метацеркарий трематод необходимо иметь две консистенции бальзама – жидкий и густой. Вначале на предметное стекло стеклянной палочкой наносят капли густого бальзама – по горизонтали 5-7 капель и по вертикали также 5-7 (по трафарету под стеклом). Затем паразитов из диметилфталата переносят в капли бальзама по одному, располагая их ротовыми присосками в одну сторону. После этого на покровное стекло капают жидкий бальзам и накрывают метацеркарий. После подсыхания бальзама на стекле по горизонтали тушью пишут буквы, а по вертикали – цифры под каждым паразитом.

Цестод, так же как трематод, можно окрашивать гематоксилином Майера в течение 30 минут или 24 часов в зависимости от последующей дифференцировки или без неё. Дифференцировку гельминтов проводят в 1 % солянокислом спирте под контролем микроскопа МБС с последующим перенесением в проточную воду на 20-30 минут.

11.5. Временные препараты из скребней и нематод не окрашивают, а помещают в неразведенную молочную кислоту или лактофенольный раствор, которые просветляют гельминтов, делая их пригодными для исследования под микроскопом. Мелкие формы гельминтов помещают в 1-2 капли молочной кислоты на 1-2 дня. Крупных нематод просветляют молочной кислотой 3-10 дней в пробирках, бюксах или чашках Петри.

Приготовление постоянных микроскопических препаратов нематод осуществляют следующим образом. Живых нематод, фиксированных в горячем 70° спирте, переносят через сутки в 96° спирт на несколько часов (в зависимости от величины нематод) и абсолютный спирт на 3-5 минут. Выдержав гельминтов в гвоздичном или хеноподиевом масле или карбоксилале 2-5 минут, их помещают на чистое предметное стекло и заливают бальзамом.

11.6. Ракообразных выдерживают двенадцать часов в трёх каплях воды и одной капле глицерина, затем двенадцать часов в двух каплях воды и двух каплях глицерина, ещё двенадцать часов в одной капле воды и трёх каплях глицерина. Это необходимо для того, чтобы рачки не сморщивались. На предметном стекле рачка расправляют, капают жидкий желатин-глицерин и накрывают покровным стеклом. Если рачок крупный, то на концах покровного стекла делают парафиновые ножки.

Для изготовления постоянных препаратов ракообразных предлагается другой способ. На тонкое предметное стекло шпателем наносят мазок разогретого до 55°С парафина, в центр мазка капают маленькую каплю глицерина, в которую помещают отпрепарированные части рачка (уже проведенные через смесь воды с глицерином), расправляют стеклянной иглой.

Каплю накрывают покровным стеклом. Препарат нагревают над спиртовкой, пока не расплавится парафин. Рачок оказывается в капле глицерина, защищённого парафином.

11.7. Из глохидий делают желатин-глицериновые препараты. Отбирают как раскрытые, так и закрытые створки паразитов. Клюв с шипиками измеряют и зарисовывают. У закрытых створок измеряют размеры.

Необходимое оборудование и реактивы

Оптика

Микроскоп бинокулярный стереоскопический МБС-1, МБС-9, МБС-10, МС-2 с увеличением 8 x 7

Микроскоп биологический с бинокулярной насадкой, с окуляром 10, 15, и объективами 20, 40 и 90.

Окуляр-микрометр

Объектив-микрометр

Рисовальный аппарат типа РА-1, РА-4, РА-7

Фотоаппарат

Осветитель или настольная лампа

Инструменты

Ножницы разного размера прямые и изогнутые

Скальпели разного размера

Пинцеты разного размера хирургические и анатомические

Препаравальные иглы разной толщины

Пипетки медицинские и с оттянутыми концами

Линейка и штангенциркуль

Весы

Стёкла и посуда

Стёкла размером 9 x 12 см– 10 шт.

Предметные стёкла (7,5 x 2,5 см) – 10-20 шт.

Обезжиренные предметные стёкла для мазков крови

Шлифованное стекло

Покровные стёкла (18 x 18 мм или 24 x 24 мм)

Солонки или часовые стёкла

Чашки Петри

Пробирки, высотой 40 или 60 мм
Крупные пробирки
Материальные банки с притёртой пробкой
Бюксы - 4 шт. для фиксации простейших в растворе Шаудина
Стаканчик с притёртой пробкой для хранения простейших в спирте
Стаканчик или коробочка для хранения сухих мазков с триходинами
Мерные цилиндры
Воронки
Кристаллизаторы
Спиртовка
Эмалированные кюветы для вскрытия рыб
Ёмкости для воды и перевозки рыбы
Компрессоры для аэрации воды

Вспомогательные материалы

Тетрадь или блокнот
Карандаши мягкие и твёрдые
Тушь, ручки или водостойкие маркёры
Бумага для упаковки препаратов
Калька для этикеток, хранящихся в спирту
Кружки, колечки из бумаги для этикеток
Бумага фильтровальная
Вата гигроскопическая для уплотнения пробирок в материальной банке
Полотенца для рук, тряпки, марля
Мыло или стиральный порошок
Лейкопластырь или клейкая лента для упаковки препаратов
Халат
Клеёнка
Рыболовные снасти (крючки, блесна, лески)

Реактивы

Спирт 96°, 80°, 70°
Формальдегид 4 %
Дистиллированная вода
Метиловый спирт или смесь 96° спирта и эфира
Лимоннокислый натрий

Жидкость Шаудина – 20 мл
Спиртовой раствор йода - 20 мл
Жидкость Барбагалло – 50 мл
Реактив Ван-Клива – 100 мл
Хлористый натрий (поваренная соль) - 50-100 мл
Уксуснокислый кармин – 100 мл
Подкисленный спирт - 100 мл
Азотнокислое серебро 1% раствор, хранящийся в тёмном флаконе
Глицерин-желатин
Пикрат аммония
Иммерсионное масло или вазелиновое масло
Жидкость Буэна
Раствор Романовского-Гимза
Сулема – насыщенный раствор
Квасцовый кармин
Гематоксилин Гейденгайна, Майера, Делафильда
Ксилол или гвоздичное масло
Бальзам канадский
Канифольная замазка
Парафин

Рецепты фиксаторов и красителей

Азур-эозин. Азура 110,8 г, эозина 3 г, химически чистого глицерина 250 мл и метилового спирта 250 мл.

Вода. Для разведения реактивов используется дистиллированная вода.

Гематоксилин Майера. 1 г гематоксилина растворяют в 1 л дистиллированной воды с последующим добавлением 0,2 г йодноватокислого натрия и 50 г калийных квасцов.

Глицерин-желатиновая смесь. 7 г пищевого желатина размачивают в течение 2-3 часов в 42 мл дистиллированной воды, добавляют 50 г чистого глицерина с 0,5 г карболовой кислоты. Полученную смесь нагревают на водяной бане при помешивании до получения однородной жидкости. Полученную жидкость фильтруют в термостате через фильтровальную бумагу. Фильтрованный глицерин-желатин разливают тёплым по небольшим пробиркам, держа их в наклонной плоскости. Пробирку с глицерин-желатином нужно всегда держать закрытой, чтобы туда не попала пыль, и открывать перед употреблением. Не использовать корковые пробки.

Железный гематоксилин. 0,5 г кристаллического гематоксилина растворяют в 10 мл 96° спирта, разбавляют 90 мл дистиллированной воды и выливают в колбу. Колбу затыкают неплотной ватной пробкой и ставят «созревать» на 3-4 недели. По истечении этого времени краситель готов к употреблению. Перед окраской раствор разбавляют дистиллированной водой в 2 раза. Раствор должен быть тёмно красноватого цвета. Если раствор чёрный, то краска не годится к употреблению.

Жидкость Барбагалло. 7 г поваренной соли растворить в 1 л дистиллированной воды с последующим добавлением 3 мл формалина.

Жидкость Буэна. Готовят раствор пикриновой кислоты – 15 частей и формалина – 5 частей. Перед употреблением добавляют 1 часть ледяной уксусной кислоты.

Жидкость Шаудина. Для приготовления жидкости Шаудина необходимо иметь насыщенный раствор сулемы и 96° спирта или ещё лучше абсолютный спирт. Насыщенный раствор сулемы готовят так: 35 г порошка сулемы растворяют в 500 мл горячей воды. Дают раствору остыть. На дне сосуда должны выпасть кристаллы сулемы. Затем берут 2 части насыщенного раствора сулемы и 1 часть спирта. Хранить жидкость Шаудина надо в посуде с плотной пробкой, в темноте. Обращаться с этим фиксатором нужно очень осторожно, поскольку сулема – сильный яд. Необходимо следить за тем, чтобы фиксатор не попадал на металлические, особенно алюминиевые части приборов и оборудования, так как при соприкосновении с сулемой они могут прийти в негодность.

Канифольная замазка. Берут 7 г канифоли и 2 г воска. Составные части оплавливают в фарфоровой чашечке. Перед употреблением канифольную замазку необходимо разогреть. Смесь наносят по краю покровного стекла спичкой. Поскольку замазка быстро застывает, обведённый препарат следует слегка подогреть для более равномерного распределения замазки воеруг стекла.

Квасцовый кармин. 10 мг алюмокалиевых квасцов растворяют в 200 мл дистиллированной воды, прибавляют 1 г мелкорастёртого кармина и кипятят в течение 10-15 минут. Затем краситель фильтруют и добавляют кристаллик тимола, чтобы предохранить его от развития плесени.

Лактофенольный раствор. Состоит из 2 частей глицерина, 1 части молочной кислоты, 1 части карболовой кислоты и 1 части дистиллированной воды.

Метиленовая синь. 1 г метиленовой сини и 2,5 г буры растворяют в 100 мл горячей воды.

Пикрат аммония. Насыщенный раствор пикриновокислого аммония (1 г порошка на 100 мл дистиллированной воды) смешивают с глицерином в отношении 1:1. При работе

необходимо иметь в виду, что порошкообразный пикриновокислый аммоний при нагревании свыше 40° С взрывается.

Раствор Романовского. Готовят два раствора - 1 г азура II растворяют в 1 л прокипячённой дистиллированной воды и 1 г эозина в 1 л воды. Растворы хранят отдельно. Перед употреблением к 1 мл нейтральной дистиллированной воды прибавляют по 2 капли каждого раствора.

Спирты. Для фиксации и хранения биологических объектов используется спирты различной крепости. Их изготавливают из 96° спирта. Для получения 70° спирта, нужно к 100 мл исходного спирта прибавить 40 мл дистиллированной воды.

100° спирт (абсолютный). Для приготовления абсолютного спирта в 96° спирт добавляют обезвоженный (прокалённый) медного купороса. Обезвоженный медный купорос можно приготовить из кристаллического прокаливанием последнего в фарфоровой чашке. Прокаливание ведут при непрерывном помешивании. Прокалённый медный купорос – порошок белого цвета. Пожелтение купороса указывает на то, что его перекалили и такой реактив использовать нельзя, голубоватый цвет указывает на неполное обезвоживание. Готовый, безводный купорос всыпают в бутылку с притёртой пробкой примерно на ¼ объёма, доливают до верха 96° спиртом и взбалтывают. Через 2-3 дня абсолютный спирт готов к употреблению.

Уксуснокислый кармин. В 100 мл 40 %-ной уксусной кислоты растворить (на водяной бане) 3 - 4 г мелко растёртого в порошок кармина. Раствор охлаждают и фильтруют.

Физиологический раствор. Для хладнокровных животных используется 0,65г поваренной соли на 100 г дистиллированной воды. Для теплокровных – 0,9 г.

Фиксатор Ван-Клива. 85 частей 85 %-го спирта смешать с 10 частями формалина и 5 частями ледяной уксусной кислоты.

Формалин. 40 %-ный продажный формальдегид. Для получения 4 %-го формальдегида к 9 частям воды добавляют 1 часть формалина. Для получения 10 %-го формальдегида к 1 части формалина добавляют 3 части воды.

Литература

Бауер О.Н., Мусселиус В.А., Стрелков Ю.А.- Болезни прудовых рыб // М., «Лёгкая и пищевая промышленность», 1981: 320 с.

Быховская-Павловская И.Е. Паразитологическое исследование рыб // Изд. АН СССР, 1952, М.-Л.: 3-63.

Гусев А.В. Методика сбора материалов по моногенеям // М., 1978: 3-34.

Гусев А.В. Методика сбора и обработка материалов по моногенеям, паразитирующим у рыб // 1983, Л., «Наука»: 48 с.

Евсеева Н.В. Охрана здоровья рыб в аквакультуре: Методическое руководство по изучению паразитов пресноводных рыб для спецкурсов по паразитологии, ихтиопатологии и болезням рыб // 2008, Петрозаводск, Изд. ПетроГУ: 44 с.

Крылов О.Н. Методические указания по гематологическому обследованию рыб в водной токсикологии // Л., 1974: 3-39.

Мусселиус В.А., Ванятинский В.Ф., Вихман А.А. Лабораторный практикум по болезням рыб // М., «Лёгкая и пищевая промышленность», 1983: 296 с.

Петрушевский Г.К., Петрушевская М.Г. Достоверность количественных показателей при изучении паразитофауны рыб // 1960, Паразит. сб. ЗИН АН СССР, 19: 333-343.

Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника // 1957, Гос. изд. «Советская наука», М.: 3-467.

Хотеновский И.А. Методика изготовления препаратов из диплозоонов // 1974, Зоол. журн., т. 53, вып. 7: 1079-1080.

Юхименко С.С. Методика обследования носовых полостей молоди рыб // 1972, Паразитология, т. VI, вып. 1: 83-84.

Ergens R. The suitability of ammonium-picrate-glycerin in preparing slides of lower Monogenoidea // Folia Parasitol., 1969, vol. 16, № 4: 320.