



**ЛАБОРАТОРНЫЙ  
ПРАКТИКУМ  
ПО БОЛЕЗНЯМ  
РЫБ**

# ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО БОЛЕЗНЯМ РЫБ

под ред. проф. В. А. Мусселиус

Допущено Управлением руководящих кадров и учебных заведений Минрыбхоза СССР в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности 1013 «Ихтиология и рыбоводство» и для учащихся средних специальных учебных заведений, обучающихся по специальности 1018 «Ихтиология и рыбоводство»

МОСКВА

«ЛЕГКАЯ И ПИЩЕВАЯ ПРОМЫШЛЕННОСТЬ»

1983

**Лабораторный практикум по болезням рыб/В. А. Муссели-  
Л 12 ус, В. Ф. Ванятинский, А. А. Вихман и др.; под ред.  
В. А. Мусселиус. — М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1983. —  
296 с.**

В учебном пособии в соответствии с программой изложены общие вопросы организации и оборудования специализированных лабораторий. Описаны общие методы ихтиопатологических исследований: клинического, эпизоотологического, гематологического и др., используемых при изучении всех болезней рыб. Освещено изучение инфекционных болезней рыб: бактериальных, вирусных и микозных. Представлены данные по изучению возбудителей инвазионных и незаразных болезней рыб. Предназначен в качестве учебного пособия для студентов вузов и учащихся техникумов.

Л  $\frac{4002030100-110}{044(01)-83}$  110-83

ББК 47.2  
639.2

Рецензенты: кафедра зоологии и физиологии (канд. биол. наук **Е. Б. Евдокимова**) и кафедра гидробиологии (канд. биол. наук **А. И. Васюков**) Калининградского технического института рыбной промышленности и хозяйства, проф. **О. Н. Бауер** и Центральная ихтиопатологическая инспекция Минрыбхоза СССР (канд. биол. наук **И. Н. Вербицкая**).

## ОТ АВТОРОВ

Изучение курса болезней рыб невозможно без практикума. Параллельно с теоретическим изучением тех или иных болезней по учебнику необходимы практические занятия, на которых студент изучает возбудителей болезни, их морфологию, культуральные и биохимические свойства, методы выделения, окраски, дифференциальной диагностики и др. Кроме того, на практических занятиях студент изучает методику вскрытия рыбы, изготовления препаратов, определения возбудителей с помощью световой и электронной микроскопии, взятие патологического материала и др.

Завершив теоретический курс и практические занятия, молодой специалист должен приобрести навыки проведения клинического, эпизоотологического и лабораторного исследований, постановки диагноза, рекомендовать меры борьбы с тем или иным заболеванием, а также на основании проведенных обследований уметь предупредить возникновение эпизоотий.

Первый лабораторный практикум по инвазионным болезням рыб был создан проф. Э. М. Ляйманом в 1951 г. С тех пор в ихтиопатологии произошли большие изменения: появились новые болезни и соответственно новые разделы курса, значительно увеличился объем информации по ранее известным болезням, появились новые и значительно усовершенствовались старые методы исследований. Все это вместе взятое и побудило авторов взяться за написание настоящей книги, которую мы посвящаем проф. Э. М. Ляйману. Цель книги — помочь студентам изучить курс ихтиопатологии, освоить не только теоретическую, но и его практическую часть. Мы надеемся также, что настоящий практикум поможет улучшить качество подготовки специалистов. Разумеется, проведение практических занятий требует соответственно оборудованной лаборатории при кафедре вуза или техникума, причем преподаватели техникума могут использовать лишь те занятия или часть их, которые включены в соответствующую программу.

Каждая тема разделена на занятия. Изложение занятий дается по единой схеме: вводная часть каждого занятия напоминает студенту существо темы, далее по этапам изложен порядок проведения работы, при этом вначале определен перечень необходимого материально-технического обеспечения. Большое внимание уделено описанию методов выделения и изучения возбудителей болезней, их свойств, идентификации, ибо это особенно важно для правильной постановки диагноза. В конце каждого занятия помещены контрольные вопросы для самопроверки и указана рекомендуемая литература (цифры в скобках).

В приложениях указаны различные вспомогательные материалы, необходимые при проведении практических работ, особенно при их подготовке: рецепты приготовления питательных сред, реактивов, красителей, ведомости по сбору статистических данных, некоторые вспомогательные расчеты и т. п. Все эти сведения используются не только студентами, но и преподавателями.

Разумеется, каждый раздел книги отражает специфические особенности той науки (вирусологии, паразитологии и др.), методы которой излагаются в данной главе. Учитывая это, авторы сознательно допускали в отдельных случаях небольшие повторения, которые лишь улучшат усвоение материала.

Книга рассчитана на студентов рыбохозяйственных вузов и учащихся техникумов, обучающихся по специальности ихтиология и рыбоводство. Нам кажется, что практикум может быть использован также сотрудниками зональных ихтиопатологических инспекций, особенно работниками диагностических групп, а также ихтиопатологами, рыбоводами производственных лабораторий, ветеринарными специалистами, занимающимися болезнями рыб.

Авторы искренне благодарят официальных и неофициальных рецензентов, которые очень внимательно ознакомились с рукописью и дали много ценных советов.

За все замечания и предложения, направленные на улучшение настоящей книги, авторы заранее приносят искреннюю благодарность и просят направлять их в Издательство «Легкая и пищевая промышленность» по адресу: 113035, Москва, М-35, 1-й Кадашевский пер., д. 12.

## **Глава I. ОБЩИЕ МЕТОДЫ ИХТИОПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

В работе ихтиопатолога тесно переплетаются общие и частные (специальные) методы исследования. Общими считаются методы, которые используют для постановки диагноза и характеристики болезни любой природы, как заразной, так и незаразной. К ним относится ряд полевых и лабораторных методов. Полевые исследования проводят непосредственно в хозяйстве или на водоеме. Они включают эпизоотологическое и клиническое обследование рыб. Патологоанатомическое вскрытие рыб, гематологические, гистологические, биохимические, иммунологические и некоторые другие исследования осуществляют в лаборатории.

Данные, полученные при проведении этих работ, очень важны для выяснения причин возникновения заболеваний, течения и распространения болезни, однако не всегда позволяют определить возбудителя. Для этой цели служат частные или специальные методы диагностики: вирусологические, бактериологические и паразитологические методы, которые, безусловно, также относят к лабораторным методам.

### **ЛАБОРАТОРИЯ ИХТИОПАТОЛОГИИ, ЕЕ СТРУКТУРА И МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ**

Для проведения ихтиопатологического исследования необходима лаборатория. В системе Минрыбхоза СССР существуют ихтиопатологические лаборатории нескольких типов: учебные, производственные и научно-исследовательские. Организация работы в лабораториях разных типов определяется стоящими перед ними задачами. Лаборатории высших и средних учебных заведений отрасли должны знакомить учащихся с основными методами диагностики, профилактики и терапии болезней рыб. Производственные лаборатории осуществляют контроль за состоянием здоровья рыб в хозяйствах и промысловых водоемах, принимают меры по предупреждению и ликвидации заболеваний рыб. Такие лаборатории созданы при зональных ихтиопатологических инспекциях и управлениях рыбного хозяйства. Специалисты-ихтиопатологи имеются также в хозяйствах и на комбинатах. Ихтиопатологические лаборатории научно-исследовательских институтов изучают заболевания, наносящие наибольший ущерб рыбному хозяйству, раз-

рабатывают и внедряют высокоэффективные методы борьбы с болезнями рыб. Токсикологические исследования осуществляют отдельные лаборатории.

Организация работы лаборатории включает разработку ее структуры, подбор кадров и создание материально-технической базы.

### **Занятие 1. Структура и материально-техническое обеспечение лаборатории ихтиопатологии, общие правила работы в лаборатории**

**Содержание.** Ознакомление учащихся с основными подразделениями и размещением лаборатории, проводящей исследование заразных и незаразных болезней рыб.

**Материальное обеспечение.** Лаборатория ихтиопатологии.

**Организация и проведение работы.** Особенностью организации работы лаборатории ихтиопатологии является изучение всех основных групп заболеваний рыб — заразных (инфекций и инвазий) и незаразных болезней, что требует создания соответствующих подразделений. Подразделение инфекционной патологии включает бактериологическую, вирусологическую и микологическую группы. Изучение заболеваний различной природы требует освоения разных методов исследования возбудителей. В современной ихтиопатологии все шире применяются гематологические, иммунологические и биохимические методы, позволяющие оценить состояние организма рыб и прогнозировать возникновение и течение заболеваний. Поэтому специалисты подразделений и групп, прошедшие общую подготовку по болезням рыб, должны специализироваться в отдельных областях ихтиопатологии.

При проведении ихтиопатологических исследований большое значение имеет оснащение лаборатории. Материально-техническая база лаборатории включает специальное лабораторное помещение, лабораторное оборудование, реактивы, лабораторную посуду.

Во время работы в лаборатории необходимо соблюдать правила личной и коллективной безопасности.

**Порядок проведения работы следующий.**

Вначале преподаватель знакомит учащихся с задачами и структурой лабораторий по изучению болезней рыб, общими правилами работы с приборами и реактивами, а затем демонстрирует размещение подразделений в учебной лаборатории и объясняет особенности их работы. Рекомендуются организовать посещение лаборатории ихтиопатологии научно-исследовательских институтов, а также ветеринарных или медицинских диагностических лабораторий.

Лаборатория ихтиопатологии состоит из нескольких помещений (кабинет, лаборантская и т. д.), отличающихся по целевому назначению, оборудованию и режиму работы (рис. 1). В комнате кабинетного типа проводят анализ эпизоотологических данных, обработку результатов лабораторных работ и при необходимости — некоторые лабораторные исследования, например микроско-

пию фиксированных препаратов. В комнате для лабораторных работ (лаборантской) исследуют рыбу (осмотр, вскрытие, взятие патологического материала), изучают патологический материал и выделенных возбудителей. Для проведения стерильных работ при изучении возбудителей инфекционных заболеваний в лабораторной оборудуют бокс. Воздух и поверхность предметов в боксе должны быть стерильными. С этой целью помещение бокса герметизируют, а бокс оборудуют бактерицидными облучателями.

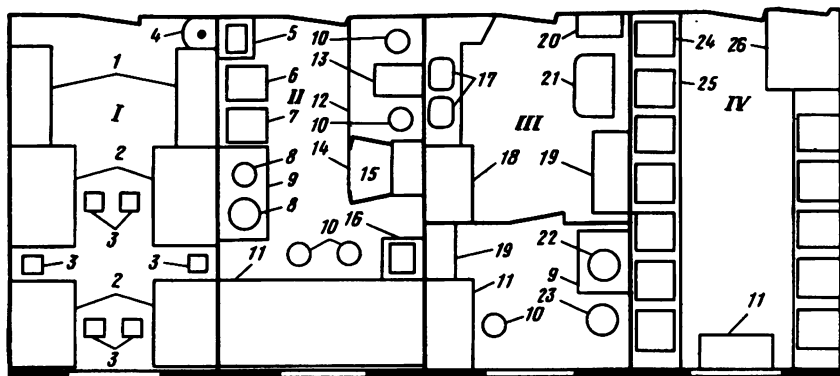


Рис. 1. Схема размещения икhtiопатологической лаборатории:

1 — кабинет; 11 — лабораторная; III — препараторская; IV — аквариальная; 1 — канцелярский шкаф; 2 — канцелярский стол; 3 — стул; 4 — раковина; 5 — мойка; 6 — холодильник; 7 — термостат; 8 — центрифуга; 9 — стеллаж для приборов; 10 — стол винтовой; 11 — стол лабораторный; 12 — бокс; 13 — стол в боксе; 14 — предбоксник; 15 — шкаф в предбокснике; 16 — стеллаж для аналитических весов; 17 — ванна для промывки посуды; 18 — шкаф вытяжной; 19 — шкаф лабораторный; 20 — противопожарный комплект; 21 — шкаф сушильный; 22 — дистиллятор; 23 — автоклав; 24 — аквариум; 25 — стеллаж для аквариумов; 26 — туалет

В бокс входят через предбоксник, где надевают чистый халат. В предбокснике размещают шкаф для хранения стерильной посуды. При отсутствии помещения для бокса используют настольные боксы, выпускаемые промышленностью (УНБК-1) или изготовленные на местах (рис. 2). В боксе имеются бактерицидная и осветительная лампы. В стенках бокса делают круглые отверстия и затягивают их манжетами, плотно охватывающими руки работающего. Для предотвращения облучения персонала бокс при стерилизации закрывают светонепроницаемым материалом. В торцевых стенках имеются двери, через которые до стерилизации вносят необходимые материалы.

Препараторская служит для приготовления питательных сред, стерилизации материалов, мытья посуды. Часть комнаты отделяется перегородкой для размещения автоклава и дистиллятора. Препараторскую оборудуют вытяжным шкафом.

Лабораторные помещения должны отвечать ряду общих требований. Освещенность на рабочих местах должна быть не менее 60 лк. Стены бокса и лабораторной окрашивают светлой масляной краской для облегчения влажной уборки и дезинфекции. лабора-

торные столы покрывают кислотоупорным пластиком или кафельной плиткой. Полы застилают линолеумом. В помещении лаборатории оборудуют приточно-вытяжную вентиляцию, водопровод и канализацию, кроме того, подводят электроэнергию и газ.

Аквариальная лаборатория ихтиопатологии служит для проведения различных исследований, связанных с изучением болезней рыб: определением патогенности возбудителей, поиском эффективных лечебных и профилактических средств и т. д. Большое значение

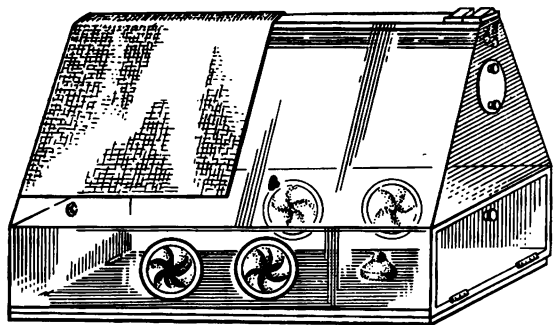


Рис. 2. Настольный бокс

имеет качество поступающей в аквариумы воды. Аквариальная может снабжаться водой из разных источников: водопроводной сети, артезианских скважин, прудов и т. д. Вода из каждого источника имеет определенные свойства. Так, водопроводная вода в городах может содержать остаточный хлор, а также примеси железа. Артезианская вода в ряде случаев имеет повышенную минерализацию, а в промышленных районах может содержать химические отходы производства. Качество поверхностных вод зависит в значительной степени от наличия промышленных и сельскохозяйственных предприятий на водосборной площади. Необходимо организовать периодический контроль за качеством поступающей в аквариальную воды и применять в зависимости от характера проводимых исследований определенный метод водоподготовки. Водоподготовка общего типа включает фильтрацию, аэрацию и регулировку температуры. В ряде случаев необходима дополнительная обработка воды: ультрафиолетовое облучение с целью стерилизации, пропускание через сорбенты для извлечения нежелательных примесей и др. Особенности работы аквариальной лаборатории ихтиопатологии заключаются в том, что при изучении заразных заболеваний следует принять меры для предупреждения распространения возбудителя и заноса его в водоемы. Для этого сбрасываемую из аквариумов воду обеззараживают дезинфектантами, к которым чувствителен изучаемый возбудитель, а рыбу после учета опыта уничтожают.

В лаборантской и препаратурской размещают основное оборудование лаборатории (см. занятие 2). Помимо оборудования лаборатория должна быть обеспечена необходимым набором реактивов. Реактивы выпускаются промышленностью в различном виде и разной степени чистоты. На каждой емкости с реактивом должна быть этикетка со следующими данными: название реактива и его формула, квалификация (чистый — ч., химически чистый —

х. ч., чистый для анализа — ч. д. а., технический — техн.), номер ГОСТа, номер партии или серии, дата изготовления и срок годности. Абсолютно недопустимо хранение и использование реактивов без этикеток! При подборе пробки к емкости следует учитывать свойства реактивов. Органические растворители, кислоты и галогены (йод, бром) хранят в сосудах с притертой стеклянной пробкой. Щелочь содержат в емкости с резиновой пробкой, в которую вставляют хлоркальциевую трубку с твердой натронной известью для поглощения углекислоты. Ядовитые вещества хранят в сейфе, и доступ к ним имеет только ответственное лицо. Все легковоспламеняющиеся вещества (например, эфиры, спирты) содержат отдельно от других реактивов в металлических ящиках с асбестовой прокладкой вдали от источников тепла и электроэнергии; эти вещества должны находиться на рабочих местах в количестве, не превышающем суточной потребности. Следует осторожно обращаться с баллонами, содержащими газы в сжатом и жидком состоянии. Используемые в работе жидкости, содержащие сильные кислоты и щелочи, необходимо нейтрализовать перед сбросом в канализацию. Особенности работы с реактивами, применяемыми при отдельных методах исследования больных рыб, будут описаны в соответствующих разделах практикума.

Сотрудники лаборатории во время работы должны соблюдать ряд общих правил:

содержать в чистоте помещение лаборатории, размещать мебель и оборудование с учетом максимального удобства в работе в соответствии с инструкциями по эксплуатации приборов и противопожарной безопасности;

правильно организовывать рабочие места, поместив вблизи работающего лишь те материалы, которые необходимы для проведения текущих исследований; хранить неиспользуемые аппаратуру и материалы в специально отведенных местах; поддерживать чистоту и порядок на рабочем месте; по окончании работы отключать и зачехлять приборы, дезинфицировать зараженную посуду, патологический материал, поверхность стола и руки; не выносить из лаборатории патологический материал и культуры возбудителей без специального разрешения руководителя лаборатории; не выходить за пределы лаборатории в рабочих халатах; зараженный материал и возбудителей, подлежащих дальнейшему исследованию, помещать в зависимости от характера исследования в соответствующий прибор или хранилище, а помещение опечатывать;

не допускать нарушений личной и коллективной безопасности: эксплуатировать приборы в точном соответствии с инструкциями, не оставлять без присмотра работающие приборы, периодически проводить техосмотр оборудования; правильно хранить и использовать сильнодействующие вещества; содержать в порядке аптечку первой помощи, в которой должны находиться следующие медикаменты: настойка йода, нашатырный спирт, борная кислота, перманганат калия, питьевая сода, лейкопластырь, бинты, вата, защитный крем для рук и вазелин; содержать в готовности сред-

ства пожаротушения: ящик с песком, асбестовый картон, кошму и огнетушитель;

проводить инструктаж по правилам работы в лаборатории со вновь поступающими и периодически — с работающими сотрудниками; обучать персонал правилам пользования аптечкой первой помощи и средствами пожаротушения.

Структура, материально-техническое обеспечение и режим работы лаборатории определяются задачами, которые стоят перед ней, и характером соответствующих исследований. Организация работы при отдельных видах исследования (бактериологических, вирусологических и др.) будет описана в соответствующих занятиях.

### Контрольные вопросы [25, 27, 41]

1. Назовите подразделения лаборатории ихтиопатологии, проводящей исследования в полном объеме.
2. Какие элементы включает материально-техническая база лабораторий?
3. Дайте характеристику помещения лаборатории ихтиопатологии.
4. Каковы особенности работы в аквариальной лаборатории ихтиопатологии?
5. Назовите основные правила работы с реактивами.
6. Перечислите общие правила работы в лаборатории ихтиопатологии.

## Занятие 2. Лабораторное оборудование, применяемое в ихтиопатологических исследованиях

**Содержание.** Ознакомление с принципами работы основных приборов и устройств, применяемых в лаборатории ихтиопатологии.

**Материальное обеспечение.** Люминесцентный микроскоп, термостат, сушильный шкаф, дистиллятор, водяная баня, автоклав, ртутно-кварцевый облучатель, центрифуга, рН-метр, мерные стаканы и цилиндры, градуированные пипетки, ручные дозаторы.

**Организация и проведение работы.** При проведении лабораторных работ используют различное оборудование: приборы, приспособления для дозированного внесения жидкостей, инструменты и т. д. Приборы, применяемые в лаборатории ихтиопатологии, делят на группы общего и специального назначения. Специальные приборы применяют при определенных методах исследования: бактериологических, вирусологических и др. Приборы общего назначения используют при разных методах исследования; они включают микроскопическую технику, устройства для поддержания температуры, аппаратуру для очистки воды, стерилизаторы, центрифуги, рН-метры, фотоэлектроколориметры, нефелометры и спектрофотометры, приборы для взвешивания.

С рядом приборов (весами, фотоэлектроколориметрами и др.) учащихся знакомят при прохождении других дисциплин. На данном занятии будут рассмотрены лишь некоторые приборы, приспособления и инструменты, применяемые в ихтиопатологии.

Порядок проведения работы следующий.

Преподаватель вначале объясняет принципы работы приборов и устройств, а затем демонстрирует их в действии.

**Микроскоп.** Микроскопические исследования в ихтиопатологии включают изучение возбудителей и тканей рыб при воздействии на них лучей видимой части спектра, ультрафиолетовых лучей и с помощью электронной микроскопии. Для просмотра препаратов в лучах видимой части спектра применяют микроскопы разных марок, например, стереоскопические микроскопы МБС-1 и МБС-2, обеспечивающие прямое и объемное изображение предмета в проходящем и отраженном свете. Эти приборы удобны для изучения патологического материала и мелких возбудителей инвазионных болезней при увеличении в 3,5—88 раз. Микроскопы марок МБИ-2, МББ-1, МБ-6 позволяют рассматривать объекты в проходящем свете при увеличении в 1350—3375 раз.

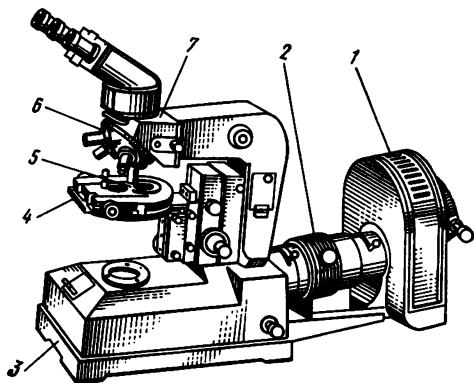


Рис. 3. Люминесцентный микроскоп МЛ-2 (из Пешкова, 1962);

1 — источник ультрафиолетового света; 2 — световод; 3 — основание микроскопа; 4 — механизм крепления и перемещения препарата; 5 — препарат; 6 — револьверное устройство с объективами; 7 — бинокулярная насадка

В современной ихтиопатологии все шире применяется особый метод световой микроскопии, названный люминесцентным. Принцип метода заключается в том, что при освещении исследуемого материала ультрафиолетовыми лучами длиной до 360 нм некоторые вещества начинают светиться, испуская лучи видимой части спектра. Первичное свечение материала связано со свечением его собственных компонентов (ядра клеток, цитоплазматические включения). Вторичное свечение возникает при обработке исследуемого материала специальными веществами — флуорохромами. Флуорохромы соединяются с компонентами материала, что позволяет выявить структуры, не видимые при первичном свечении. Для проведения люминесцентной микроскопии используют микроскопы МЛ-2, МЛ-3, МЛД-1 и др. Основные узлы микроскопа МЛ-2 представлены на рис. 3 (пульт питания на рис. 3 не показан). Микроскоп позволяет рассмотреть объекты в отраженном свете при освещении сверху и в проходящем свете при освещении снизу. При отсутствии специального люминесцентного микроскопа используют обычные световые микроскопы в сочетании с особым источником света — люминесцентными осветителями ОСЛ-1, ОИ-18 и ОИ-28, а также устройством ОИ-17, монтируемым на микроскопе. Метод люминесцентной микроскопии позволяет детально изучить строение возбудителей и тканей рыб, получить цветное изображение объекта и исследовать непрозрачные объекты. В со-

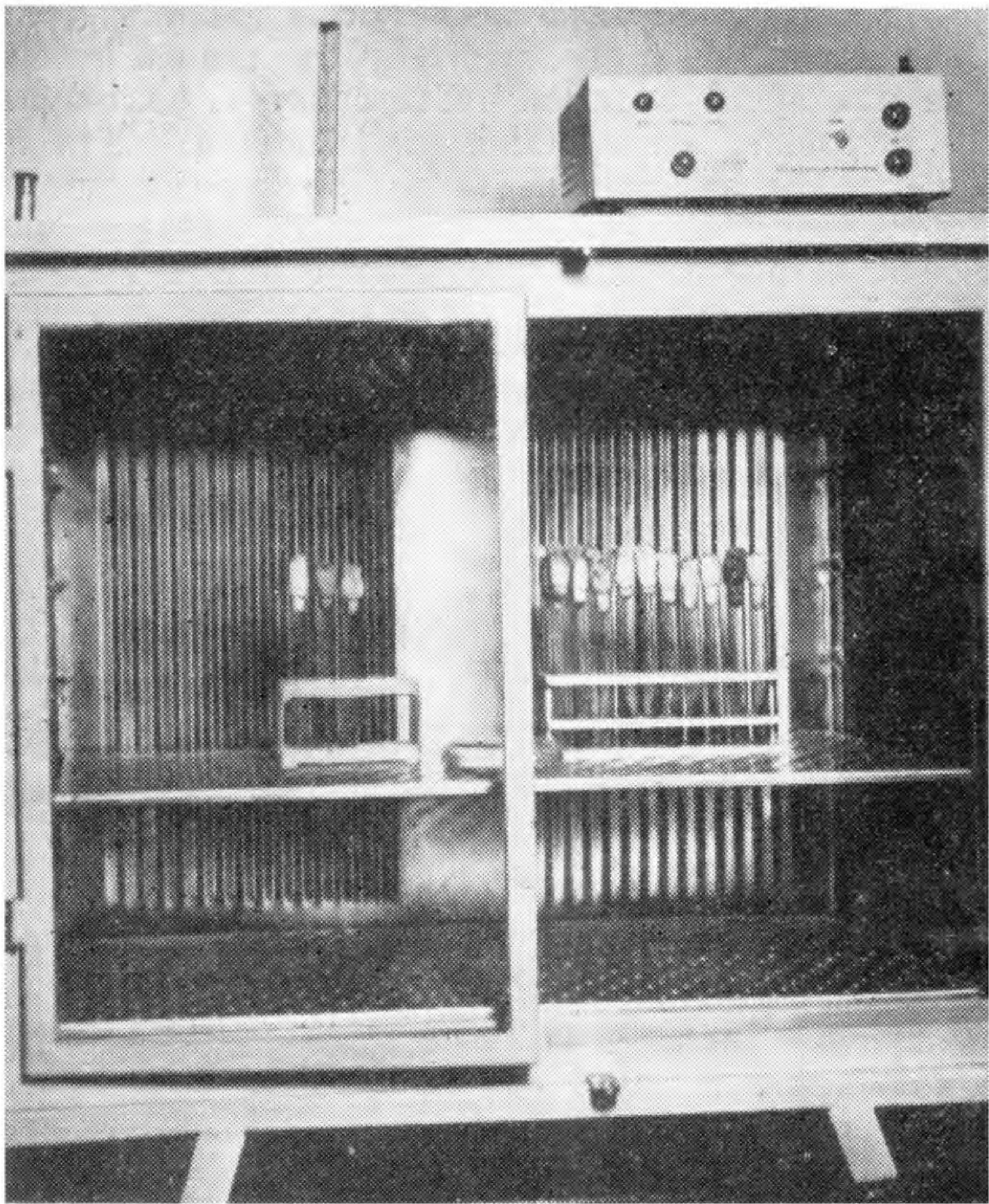


Рис. 4. Термостат с водяной рубашкой ЗЦ-1125М

четании с иммунологическими методами люминесценция дает возможность более точно установить природу возбудителей при диагностике заболеваний.

**Термостат.** Для выращивания бактерий и грибов, культивирования вирусов, изучения иммунитета и гистологических исследований необходимо выдерживать материал при постоянной температуре. Приборы, которые автоматически поддерживают определенную температуру воздушной или водной среды в рабочей камере, называют термостатами. Стенки прибора для улучшения теплоизолирующих свойств делают двухслойными. Между стенками находятся воздух или вода. На рис. 4 представлен общий вид термостата с водяной рубашкой ЗЦ-1125М, поддерживающего температуру 28—55°C. В верхней части корпуса прибора смонтирован блок управления, в котором помещены все элементы терморегулирующего устройства. В камере имеется датчик температуры. В нижней части прибора расположены нагревательные элементы. Для сушки и стерилизации лабораторной посуды применяют сушильные шкафы, например шкаф ШС-40М. Сушильный шкаф

принципиально устроен так же, как термостаты на 25—60°C, но приспособлен для создания более высоких температур (200°C).

Водяные бани и погружные термостаты служат для поддержания определенной температуры водной среды. Во внутренней камере этих приборов находится жидкость, в которую помещают штатив с пробями. Регулировка температуры воды от 30 до 100°C осуществляется автоматически с помощью контактного термометра, соединенного с электронагревателями. На верхней крышке погружного термостата смонтирован двигатель, приводящий в движение мешалку и насос для перекачки подогретой воды в другие емкости. Поддержание стабильной температуры в открытых емкостях от 25 до 85°C может быть осуществлено также с помощью погружного термостатирующего устройства УТП-1. Устройство состоит из двух разобщенных блоков: блока нагрева и перемешивания и блока управления.

При отсутствии автоматических нагревающих приборов используют электроплитку, на которую устанавливают металлическую емкость с водой. Пробирки с пробями и пробирку с термометром помещают в металлическую сетку или штатив и погружают в воду. Затем температуру в бане доводят до необходимой величины, следя за показаниями термометра. Температуру поддерживают на определенном уровне, включая или отключая плитку.

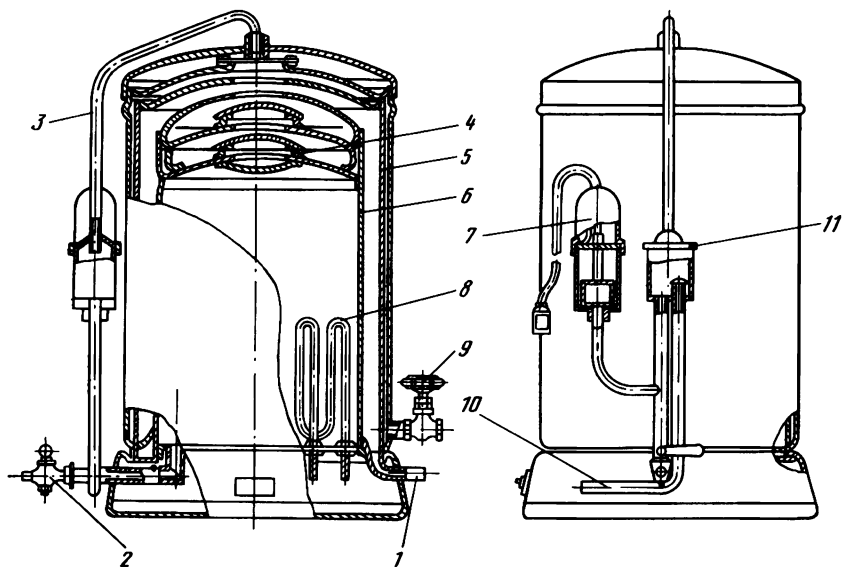


Рис. 5. Схема устройства дистиллятора Д-25 (модель 784) (из Кац и Канторович, 1976):

1 — ниппель для выпуска дистиллята; 2 — спускной кран; 3 — сливная трубка; 4 — отражательный экран; 5 — конденсатор; 6 — камера испарения; 7 — датчик уровня воды; 8 — нагревательные элементы; 9 — вентиль для подачи воды в камеру испарения; 10 — отвод для сброса воды в канализацию; 11 — уравниватель

Для создания температуры 4—6°C используют бытовые холодильники. Длительное замораживание материала осуществляют в морозильных камерах бытовых холодильников или в специальных морозильниках типа МШ (Минский завод холодильников), обеспечивающих температуру до —25°C.

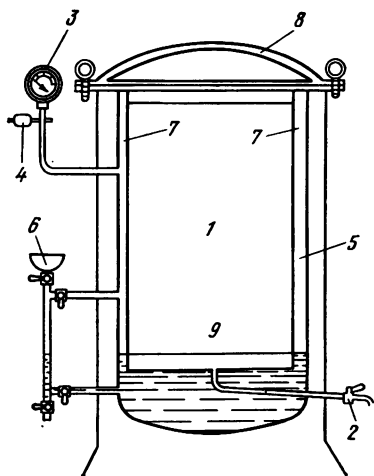


Рис. 6. Схема устройства автоклава (из Борисова и др., 1979):

1 — стерилизационная камера; 2 — кран для выпуска воздуха; 3 — манометр; 4 — предохранительный клапан; 5 — водопаровая камера; 6 — воронка для заполнения автоклава водой; 7 — отверстия для поступления пара в стерилизационную камеру; 8 — крышка; 9 — подставка для размещения стерилизуемого материала

При вирусологических и других исследованиях требуется вода с определенными физико-химическими свойствами. В таких случаях применяют повторную дистилляцию или пропускают воду через ионообменники. Для двукратной перегонки воды используют бидистилляторы БД-2 и БД-4.

**Автоклав.** При проведении микробиологических исследований необходимо приготовить стерильные питательные среды, растворы реактивов, посуду и т. д. Широко распространенным методом стерилизации является автоклавирование. Стерилизация в автоклаве осуществляется с помощью нагретого пара под давлением. Схема устройства прибора показана на рис. 6. Материал в металлических биксах или сетках загружают в стерилизационную камеру, которая сообщается с водопаровой камерой. Обе камеры герметически изолированы от атмосферного воздуха при помощи крышки. В водопаровую камеру заливают дистиллированную

**Дистиллятор.** Для приготовления питательных сред и растворов реактивов необходимо пользоваться очищенной водой. Одним из распространенных методов очистки воды является перегонка (дистилляция), которая осуществляется с помощью дистилляторов Д-1 производительностью 4—5 л/ч и Д-25 (модель 784) производительностью 25 л/ч. Устройство дистиллятора Д-25 показано на рис. 5. В камере испарения воду нагревают до кипения. Образовавшийся пар поступает в конденсатор, который охлаждается водопроводной водой, непрерывно протекающей между стенкой конденсатора и наружным стальным кожухом прибора. Сконденсированный пар в виде дистиллята вытекает через пиппель. В верхней части испарительной камеры находятся отражательные экраны, сепарирующие пар и обеспечивающие чистоту дистиллята. По мере выкипания воды в камере через вентиль поступают новые порции водопроводной воды, уровень которой поддерживается уравниателем.

воду и после герметизации автоклава нагревают ее с помощью электронагревательных элементов. По достижении необходимого давления пара им заполняют стерилизационную камеру, вытесняя из нее воздух. По окончании продувки вентиль закрывают и давление повышают до требуемой величины, определяемой по манометру. По окончании стерилизации прекращают сообщение между водопаровой и стерилизационными камерами, выпускают пар и конденсат и специальным приемом подсушивают материал под вакуумом. Затем давление в камере уравнивают с атмосферным и автоклав разгружают.

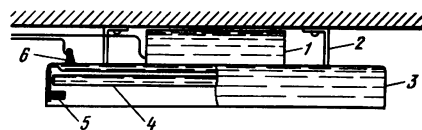


Рис. 7. Схема устройства бактерицидного облучателя ОБП:

1 — пускорегулирующий аппарат; 2 — скоба для крепления облучателя; 3 — отражатель; 4 — лампа; 5 — стартёр; 6 — винт заземления

Шприцы и инструменты стерилизуют кипячением в электрических стерилизаторах (например, С-87), которые представляют собой оборудованные электрическим подогревом металлические ванны с крышкой.

Бактерицидный облучатель. Для стерилизации воздуха и поверхности предметов в помещениях лаборатории применяют стационарные и переносные облучатели. Стерилизацию (необратимые изменения микробных клеток, а затем их гибель) осуществляют с помощью ультрафиолетовых лучей (УФЛ), излучаемых бактерицидной лампой, укрепленной в штативе и соединенной с электропитающим устройством. В стационарном бактерицидном облучателе ОБП, устанавливаемом на потолке или стене (рис. 7), используют лампы ДБ 30-1 (БУФ-30). Передвижной облучатель ОРК-21 позволяет устанавливать необходимое расстояние от лампы до объекта, так как лампа с рефлектором подвижно закреплена на вертикальной стойке.

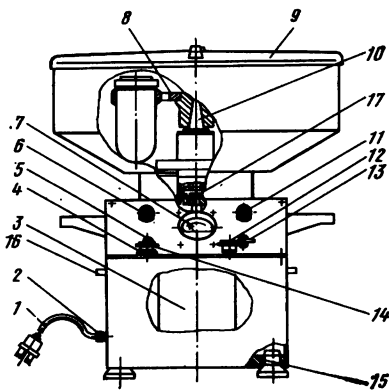


Рис. 8. Схема устройства стационарной лабораторной центрифуги ЦЛС-3:

1 — шнур питания; 2 — клемма заземления; 3 — электропривод; 4 — кнопка останова; 5 — включение часового механизма; 6 — сигнал торможения; 7 — указатель частоты вращения; 8 — ротор; 9 — крышка; 10 — конусный вал; 11 — сигнал «Сеть»; 12 — регулятор оборотов; 13 — тумблер «Сеть»; 14 — электромеханические часы; 15 — основание прибора; 16 — дверь; 17 — муфта

Центрифуга. Для разделения частиц и отделения их от растворителя при обработке патологического материала и культур возбудителей применяют центрифугирование. Принцип работы центрифуги заключается в том, что при вращении пробирок с материалом возникает центробежная сила, отбрасывающая частицы с большей плотностью, чем жидкость, на дно пробирки. Сущест-



Рис. 9. Настольная центрифуга ЦЛН-2

ся стаканы принимают горизонтальное положение, и частицы в пробах под действием центробежной силы движутся по направлению к дну пробирки. Угловой ротор представляет собой усеченный металлический конус, в котором имеются открытые сверху каналы для помещения проб. Преимуществом такого ротора являются меньшие потери на трение и высокая скорость вращения при небольших габаритах центрифуги. Угловой ротор установлен, в частности, на настольной центрифуге ЦЛН-2 (рис. 9).

Поскольку пробы при центрифугировании нагреваются, то при работе с неустойчивыми веществами и возбудителями применяют охлаждение. Малогабаритные центрифуги могут быть помещены непосредственно в холодильную камеру. Для осаждения больших объемов материала используют рефрижераторные центрифуги ЦЛР-1 и УВР-1, которые снабжены холодильной установкой, автоматически поддерживающей заданную температуру во внутренней камере. Для осаждения вирусов и высокомолекулярных соединений применяют ультрацентрифуги, развивающие скорость свыше 25 000 об/мин в условиях пониженной температуры и вакуума.

**pH-метр.** Для точного измерения величины pH в растворах реактивов и питательных средах в лабораторных условиях применяют специальные приборы — pH-метры, например модель pH-340. Схема прибора представлена на рис. 10. В корпусе прибора размещены элементы измерительного устройства и электронный усилитель. На лицевую панель корпуса выведены приспособления для управления прибором и шкала милливольтметра, градуированная в единицах pH. Корпус подключен к датчику, предназна-

вует большое количество типов и моделей центрифуг. В ихтиопатологии используют центрифуги с регулируемым температурным режимом, рефрижераторные центрифуги и ультрацентрифуги. Все приборы имеют ряд общих элементов: вращающееся приспособление с гнездами для проб (ротор), электродвигатель, регулятор скорости вращения ротора и кожух с крышкой. Схема устройства стационарной лабораторной центрифуги ЦЛС-3 дана на рис. 8. Центрифуга снабжена двумя съемными роторами: крестообразным (он показан на рисунке) и угловым. При вращении крестообразного ротора свободно качающиеся

ченному для крепления электродов и установления сосуда с испытуемым раствором. При погружении стеклянного электрода в исследуемую пробу между поверхностью электрода и раствором происходит обмен ионами и возникает разность потенциалов  $E_x$ , величина которой пропорциональна концентрации ионов водорода в испытуемом растворе. Для измерения  $E_x$  создают электрическую цепь, содержащую два электрода. Внутренний электрод находится

в стеклянном электроде. Внешний (вспомогательный) электрод соединен с контролируемым раствором с помощью емкости и трубки, заполненной раствором хлорида калия. Ионы калия через пористую перегородку непрерывно

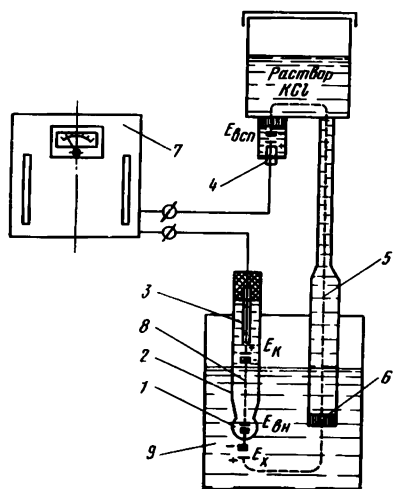


Рис. 10. Схема устройства рН-метра (из Крючковой и др., 1977):

1 — шарик из литиевого стекла; 2 — стеклянный электрод; 3 — внутренний контактный электрод; 4 — внешний контактный электрод; 5 — трубка с раствором хлорида калия; 6 — пористая перегородка; 7 — корпус прибора; 8 — раствор во внутренней части электрода; 9 — раствор снаружи электрода

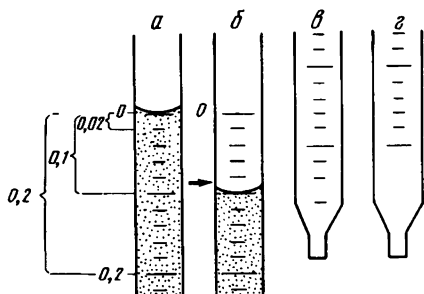


Рис. 11. Измерительная шкала градуированных пипеток:

а — шкала с делениями на 0,02 мл; б — установление мениска на отметке 0,1 мл; в — концевая пипетка; г — концевая пипетка

но просачиваются в испытуемый раствор. Возникающая в цепи электродвижущая сила измеряется с помощью милливольтметра, находящегося в корпусе основного прибора.

Мерная лабораторная посуда. Необходимым условием проведения лабораторного исследования является наличие специальной посуды. Виды посуды, правила ее использования и подготовки различны при разных методах исследования и приводятся на практических занятиях. Особое внимание следует уделить изучению правил работы с мерной посудой: градуированными пипетками, бюретками, мерными стаканами и колбами. При заполнении посуды мениск жидкости устанавливается на уровне деления, от которого начинают отмеривание жидкости. Следует учитывать, что мениск имеет вид темного слоя, имеющего верхнюю и нижнюю поверхности, поэтому различают соответственно верхний и нижний мениски. Для повышения точности и стандартности

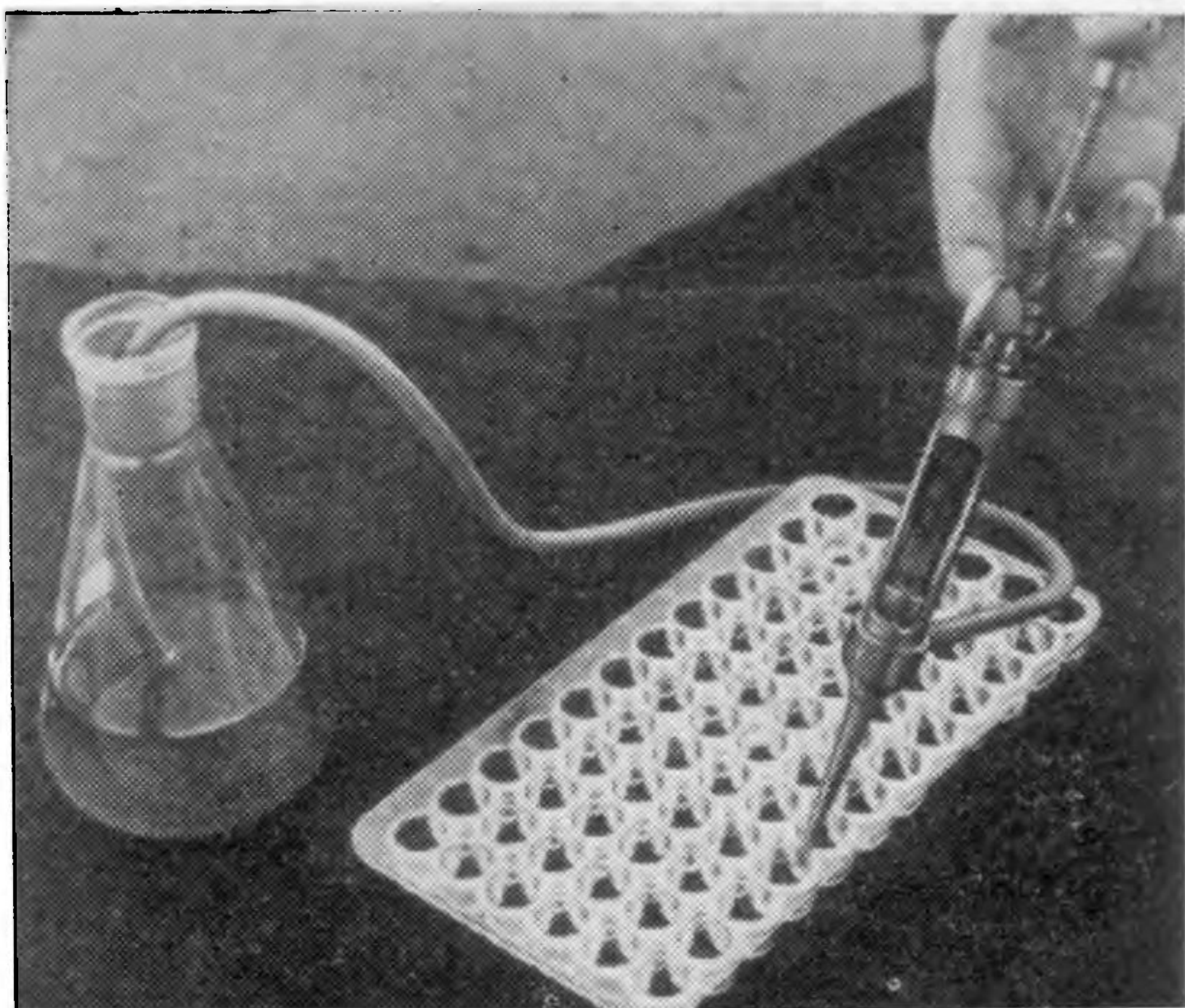


Рис. 12. Шприцевой ручной дозатор

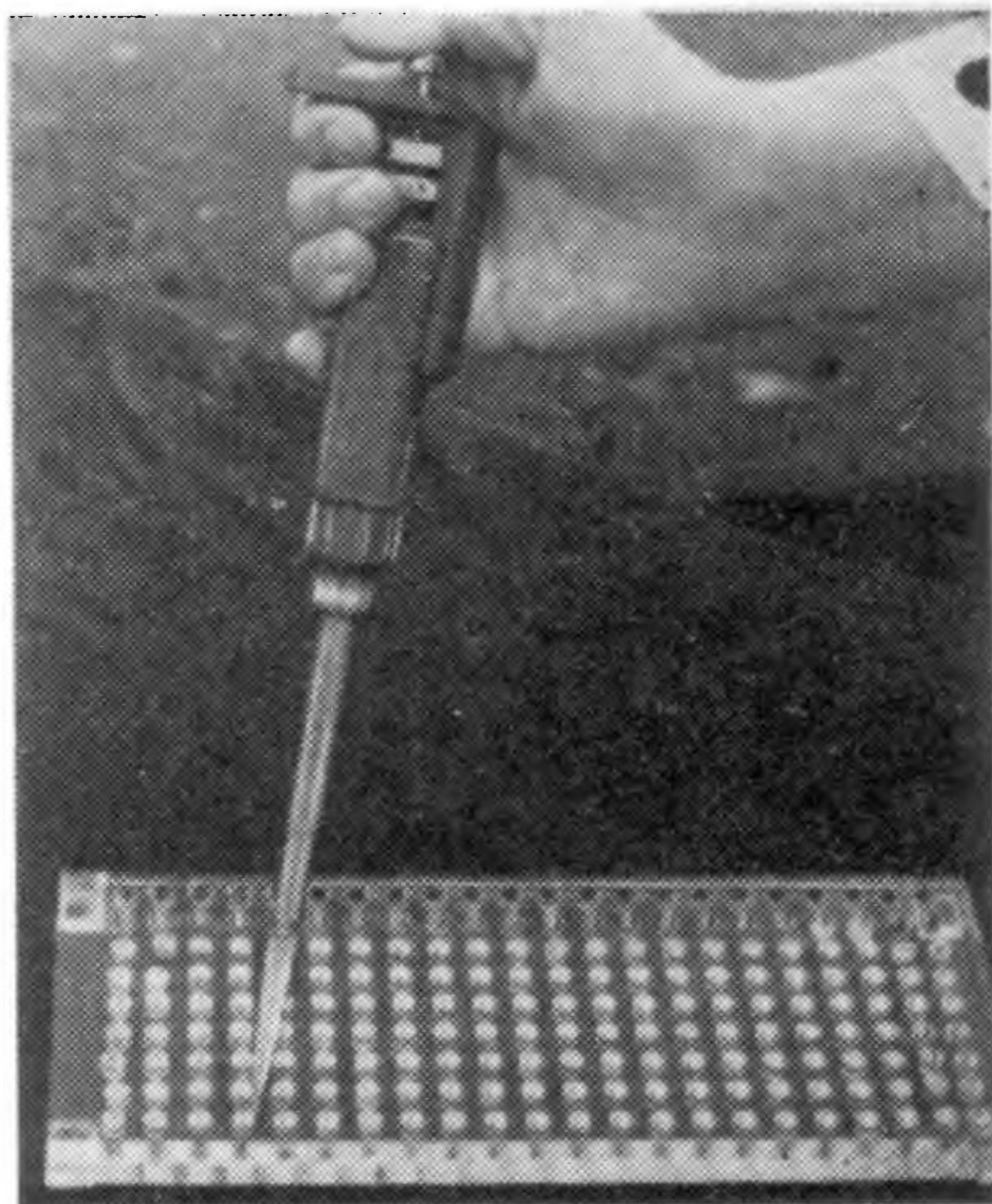


Рис. 13. Ручной дозатор ПЛ01

зации отмеривания жидкостей следует пользоваться нижним мениском, который совмещают с верхним краем необходимого деления шкалы мерного сосуда.

Для точного отмеривания жидкостей с помощью градуированных пипеток необходимо установить величины объемов, указанных на шкале пипетки. Для этого находят две соседние цифры на шкале. На рис. 11, а этими цифрами являются «0» и «0,2». Поскольку между ними находится 10 делений, то каждое деление соответствует объему  $0,2 \text{ мл} : 10 = 0,02 \text{ мл}$ . Пятое деление, отмеченное более длинной полосой, соответствует объему 0,1 мл при выпускании жидкости от нулевой отметки (рис. 11, б). Перед работой с пипетками необходимо определить, как расположена шкала делений. У одних пипеток шкала достигает конца пипетки (концевые пипетки) (рис. 11, в), у других последнее деление шкалы расположено выше конца пипетки (неконцевые пипетки) (рис. 11, г). Способы заполнения пипеток бывают разные. Насасывания материала ртом следует избегать, желательно пользоваться резиновыми баллончиками. При работе с пипетками необходимо плавно набирать и выпускать жидкость из пипетки, прикоснувшись кончиком пипетки к стенке емкости. Глаз работающего должен находиться на уровне мениска жидкости в пипетке.

Для мерного разлива небольших объемов растворов при массовых исследованиях очень удобны ручные дозаторы разных типов. Дозатор непрерывного действия состоит из шприца, снабженного подпружиненным поршнем и насадкой с ниппельными клапанами, пропускающими жидкость лишь в одном направлении (рис. 12). При подготовке устройства к работе вначале вращением штока поршня устанавливают дозу, опускают конец подающей

трубки в раствор и несколькими движениями поршня засасывают раствор в дозатор. Разовое внесение доз жидкости от 2 до 1000 мкл производят с помощью комплекта пипеток ПЛО1 (рис. 13). Пипетки снабжены съемными наконечниками. Жидкость всасывают и вытесняют из наконечника за счет изменения давления в камере, находящейся в корпусе пипетки.

Одним из способов исследования рыб является их вскрытие, для проведения которого необходим набор инструментов и приспособ-

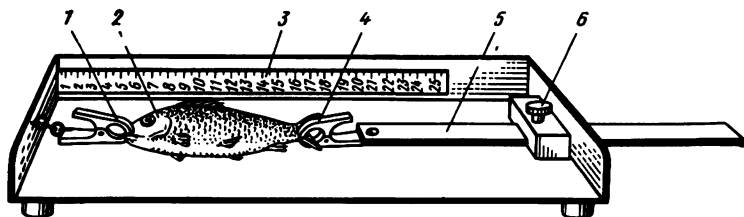


Рис. 14. Столик для вскрытия рыб:

1, 4 — зажимы; 2 — рыба; 3 — линейка; 5 — подвижная планка; 6 — винт, прижимающий планку

собления для фиксации тела рыбы. Из инструментов наиболее часто используют пинцеты, ножницы, скальпели; их хранят в упаковке из плотного материала, имеющей гнезда для каждого инструмента.

Фиксацию рыб длиной до 10 см проводят на прямоугольном куске пенопласта с помощью препаровальных игл. Рыб длиной более 10 см можно фиксировать в кювете, залитой парафином. Удобно пользоваться столиком, предложенным А. А. Вихманом и А. И. Фокиным (рис. 14). Один зажим прикрепляют к голове рыбы, другой — к хвосту. Подвижную планку выдвигают вправо так, чтобы тело рыбы было слегка растянуто в горизонтальной плоскости, и закрепляют планку винтом. К верхнему бортику столика прикреплена линейка для измерения длины тела. Столик выполнен из металла, что облегчает стерилизацию столика и тела рыбы при выделении возбудителей инфекционных заболеваний.

Приборы и приспособления специального назначения, применяемые при отдельных видах исследования (бактериологических, вирусологических и др.), будут описаны в соответствующих разделах.

#### Контрольные вопросы [22, 25, 27]

1. Назовите основные приборы общего назначения, применяемые при ихтиопатологических исследованиях.
2. Как устроен люминесцентный микроскоп?
3. Каковы принципы устройства термостатов?
4. Как устроен автоклав?
5. Опишите принцип работы центрифуги.
6. Как устроен рН-метр?
7. Каковы основные правила работы с градуированными пипетками?

Для оценки эпизоотологической ситуации хозяйств и постановки диагноза необходимо использовать данные эпизоотологического, клинического и патологоанатомического исследований рыбы, которые проводят в рыбоводном хозяйстве, водоеме. При этом осматривают десятки и сотни рыб, обращая внимание на их поведение, внешний вид, отмечают все отклонения от нормы. Данные, полученные при проведении этих работ, записывают в соответствующие документы или оформляют в виде акта эпизоотологического обследования. Такие многолетние и правильно оформленные материалы позволяют не только оценивать, но и прогнозировать эпизоотическую ситуацию хозяйства, водоема.

### Занятие 3. Эпизоотологическое обследование хозяйства

**Содержание.** Порядок проведения эпизоотологического обследования, составление акта обследования.

**Материальное обеспечение.** Занятие не требует специального материального обеспечения, так как проводится на рыбоводном хозяйстве с использованием местных документов и материалов.

**Организация и проведение работы.** Эпизоотологическое обследование — один из основных методов эпизоотологии, позволяющих изучить течение заболевания, собрать анамнез, выяснить причину возникновения, динамику развития и пути его распространения.

Для возникновения болезни в водоеме необходимо наличие источника заразного начала, факторов передачи возбудителя и восприимчивых организмов. Источником заразного начала в водоеме в большинстве случаев является больная рыба, выделяющая в воду возбудителей заболевания. Элементы внешней среды, которые способствуют передаче возбудителя от больной рыбы к здоровой, называются факторами передачи. К ним относятся рыба, икра, вода и почва водоемов, птицы, беспозвоночные, а также рыбоводный инвентарь, орудия лова и т. д. Очень часто проявлению и распространению болезней способствуют и другие факторы, провоцирующие возникновение болезни или усиливающие его и называемые стрессорами, или стресс-факторами. К ним относятся резкое изменение температуры, нарушение гидрохимического режима, воздействие на рыб токсикантов, переуплотненные посадки, плохое качество корма, обловы рыбы и др.

Обязательным условием возникновения и развития заболевания является наличие в водоеме видов рыб, восприимчивых к данной болезни. Так, например, акклиматизация буффало, обладающих высокой восприимчивостью к *Leishmania elegans*, привела к многочисленным вспышкам лернеоза, тогда как до этого на местных видах рыб (карпе, карасе и др.) это заболевание регистрировали

редко. Регулируя численность восприимчивых к имеющемуся в данном водоеме заболеванию рыб, можно менять форму эпизоотического процесса. Так, например, введение поликультуры растительноядных рыб, не восприимчивых к краснухе, в карповые хозяйства южных районов нашей страны изменило типичную картину течения в них этого заболевания.

В развитии эпизоотий различают отдельные стадии: 1 — меж-эпизоотическая стадия, для которой характерны спорадические случаи заболевания; 2 — предэпизоотическая стадия, для которой характерно быстрое увеличение числа заболевших рыб; 3 — стадия развития, при которой число больных рыб резко возрастает; 4 — стадия максимального подъема, для которой характерно наибольшее число рыб с типичными клиническими признаками; 5 — стадия угасания, при которой число больных рыб постепенно уменьшается.

Таким образом, правильно и тщательно собранные данные эпизоотологического обследования помогут быстро и объективно оценить причину возникновения заболевания, выяснить пути его распространения, определить факторы, способствующие развитию болезни, и наметить эффективные меры борьбы.

Порядок проведения работы следующий.

1. Эпизоотологическое обследование хозяйства. Работу следует проводить с небольшой группой студентов, выезжая в неблагополучное по какому-либо заболеванию хозяйство. Там прежде всего собирают анамнез, т. е. проводят опрос ихтиопатологов, рыбоводов, прудовых рабочих и других очевидцев, для выяснения эпизоотической ситуации. При этом также знакомятся с имеющейся в хозяйстве документацией: ихтиопатологическим журналом, журналом эпизоотического состояния, ветеринарными свидетельствами (форма 1), выданными органами Госветслужбы на ввозимую в хозяйство рыбу и икру (приложение 1).

Осматривают неблагополучные пруды, проводят клиническое обследование больной рыбы (см. занятие 5). В лаборатории проводят патологоанатомическое и паразитологическое обследование рыбы (см. занятие 37).

По лабораторному журналу выясняют гидрохимический и гидробиологический режимы прудов, в которых отмечено данное заболевание. Уточняют вид и возраст выращиваемой там рыбы, плотность посадки, количество и качество вносимого корма, его поедаемость, наличие естественной кормовой базы. Собранный материал обобщают в виде акта эпизоотологического обследования.

2. Составление акта эпизоотологического обследования хозяйства. Акт эпизоотологического обследования составляет группа специалистов в составе не менее трех человек, включая кого-либо из руководителей обследуемого хозяйства. Акт составляют в произвольной форме, однако с соблюдением последовательности изложения.

## Общие данные

1. Время проведения обследования.
2. Должность, место работы, фамилии, имена и отчества обследующих.
3. Характеристика хозяйства (карповое, форелевое, тепловодное, полносистемное, нагульное и т. д.).
4. Когда впервые отмечено заболевание.
5. Имеется ли вблизи неблагополучный по этому заболеванию водоем, хозяйство и когда там наложен карантин, ограничение.

Санитарно-эпизоотическая характеристика обследуемого хозяйства

6. Дата организации хозяйства.
7. Характеристика прудов хозяйства. Количество и площадь прудов по категориям. Наличие новых площадей. Особенности водоснабжения. Место расположения неблагополучного пруда, его связь с водосточником, подробная характеристика (выростной, нагульный и т. д., площадь, какой год эксплуатируется).
8. Какая, когда и откуда поступала в хозяйство рыба. Что записано в сопровождающем ветеринарном свидетельстве.
9. Подвергалась ли эта рыба обследованию (где, какому).
10. Какой профилактической обработке была подвергнута.
11. Где содержалась рыба после завоза (наличие карантинных прудов и их состояние).
12. Как часто и когда проводилось ихтиопатологическое обследование рыбы в хозяйстве.
13. Гидрохимическая, гидробиологическая и гидрологическая характеристики пруда, в котором имеется больная рыба.
14. Рыбоводная характеристика прудов. Виды рыб, возраст, плотность посадки.
15. Количество и качество даваемого рыбе корма. Его поедаемость. Условия хранения корма.
16. Санитарное состояние водосточника.
17. Характеристика возникшего заболевания: а) восприимчивость рыб разного вида и возраста к данному заболеванию; б) основные особенности течения болезни; в) клинические и патологоанатомические изменения; г) результаты паразитологического вскрытия.

## Заключение

В заключении излагают соображения об этиологии болезни, возможных источниках и носителях заболевания, путях и способе его распространения, намечаются основные меры профилактики и борьбы с данным заболеванием.

## Контрольные вопросы [4, 5, 40, 49, 50]

1. Какова основная цель эпизоотологического обследования?
2. Что такое анамнез?
3. Какие документы изучаются при эпизоотологическом обследовании?
4. Кто составляет акт эпизоотологического обследования?
5. По какой форме составляется акт?
6. Что дается в заключении акта эпизоотологического обследования?

### Занятие 4. Контроль за эпизоотическим состоянием рыбноводных хозяйств и статистическая отчетность

Содержание. Ознакомление с основными документами ихтиопатологического контроля (формами № 312 и 324) и формами статистической отчетности (формы № 3-вет и 3-рх).

**Материальное обеспечение.** Образцы ихтиопатологического журнала и журнала эпизоотического состояния и учета лечебно-профилактических мероприятий, форм статистической отчетности.

**Организация и проведение работы.** Контроль за эпизоотическим состоянием хозяйства, своевременной постановкой диагноза, проведением профилактических и лечебных мероприятий возлагается на ихтиопатолога хозяйства. Наблюдения, результаты ихтиопатологического обследования рыбы и другие проводимые мероприятия ихтиопатолог регистрирует в журнале эпизоотического состояния и учета лечебно-профилактических мероприятий и журнале ихтиопатологического контроля, которые являются постоянно действующими документами в рыбоводном хозяйстве. Кроме того, 2 раза в год он обязан оформлять 2 формы статистической отчетности: форму № 3-вет «Отчет о болезнях рыб», которую отправляют главному ветеринарному врачу района, и форму № 3-рх «Отчет о болезнях рыб в рыбоводных хозяйствах Министерства рыбного хозяйства СССР», которую высылают в рыбтрест или рыбокомбинат области или края (т. е. вышестоящей по подчиненности организации).

Порядок проведения работы следующий.

1. Ведение журнала эпизоотического состояния и учета лечебно-профилактических мероприятий. Журнал эпизоотического состояния хозяйства ведет по утвержденной Минрыбхозом СССР форме № 312 (приложение 2а) главный ихтиопатолог рыбоводного хозяйства.

Эпизоотический журнал заполняют ежедневно по категориям прудов (выростные, нагульные и т. д.). По данным этого журнала можно проследить за ходом эпизоотического процесса и его ликвидацией. В нем указывают сроки наложения и снятия карантина или ограничения, а также основные способы борьбы с данной эпизоотией.

2. Ведение ихтиопатологического журнала. Ихтиопатологический журнал рыбоводного хозяйства является учетным документом. Он выдается вышестоящей рыбохозяйственной организацией, заполняется главным или старшим ихтиопатологом и главным рыбоводом хозяйства. Журнал (форма № 324, утвержденная Минрыбхозом СССР) состоит из 62 с. и содержит 8 разделов (приложение 2б). Ихтиопатологический журнал заполняют два раза в год в двух экземплярах. Один экземпляр хранят в хозяйстве, другой — в ихтиопатологическом подразделении вышестоящей рыбохозяйственной организации.

3. Заполнение формы статистической отчетности № 3-вет (полугодовая) «Отчет о болезнях рыб». Отчет составляют на основании актов обследования эпизоотического состояния рыбоводного хозяйства и данных «Журнала эпизоотического состояния» и «Ихтиопатологического журнала» по утвержденной форме (приложение 2в).

4. Заполнение формы статистической отчетности № 3-рх (полугодовой) «Отчет о болезнях рыб в рыбоводных хозяйствах Мин-

рыбхоза СССР». Отчет составляют на основании данных «Журнала эпизоотического состояния» (форма № 312) и «Ихтиопатологического журнала рыбоводного хозяйства Минрыбхоза СССР» (форма № 324) по утвержденной форме (приложение 2г).

#### Контрольные вопросы [40, приложение 2]

1. Какие сведения заносятся в «Журнал эпизоотического состояния и лечебно-профилактических мероприятий»?
2. Из каких частей состоит «Ихтиопатологический журнал»?
3. Кто заполняет формы № 312 и 324?
4. Какие формы статистической отчетности заполняются в рыбоводных хозяйствах?
5. К какому сроку и кому отправляются формы статистической отчетности?

### З а н я т и е 5. Проведение клинического и патологоанатомического обследования рыб

**Содержание.** Ознакомление с порядком проведения клинического осмотра, ходом патологоанатомического вскрытия.

**Материальное обеспечение.** Аквариум, сачок, ведро, столик для фиксации рыбы, ножницы, скальпель, пинцет, препаровальные иглы, чашки Петри, глазная пипетка, дистиллированная вода, рабочая тетрадь.

**Организация и проведение работы.** Данные по клиническому осмотру и патологоанатомическому вскрытию рыбы необходимы при составлении акта эпизоотологического обследования. Клинический осмотр начинают с наблюдения за поведением рыб в водоеме. В зависимости от проявления заболевания и его особенностей рыбы могут плавать у поверхности воды или уходить в глубину, собираться на притоке или держаться у берегов, совершать несвойственные им движения. Так, например, при миксомозе форели рыба плавает по кругу. После длительного движения она ложится на дно, а затем снова начинает совершать круговые движения. При хилоденеллозе рыбы выскакивают из воды и плашмя падают обратно в воду. При бранхиомикозе, ихтиофтириозе, дактилогирозе и других заболеваниях рыба перестает брать корм, собирается у притока. Таким образом изменение поведения рыбы является важным симптомом, указывающим на необходимость проведения диагностических и других исследований.

Порядок проведения работы следующий.

1. Клинический осмотр рыбы. Его проводят выборочно непосредственно при ее вылове из водоема. При этом рекомендуют просматривать не менее 100 рыб каждого вида и возраста, имеющих в водоеме. При необходимости рыб переносят в аквариум и в нем наблюдают за их поведением, координацией движений, частотой дыхательных движений, реакцией на внешние раздражители (шум, удары, попытку поймать и др.). Определяют вид рыбы, ее среднюю массу, размер, возраст. Осмотр ведут в хорошо освещенном месте, вынимая из воды рыбу по одной. Осматривают кожные покровы и плавники, обращая внимание на количество слизи, пиг-

ментацию, наличие опухолей, цист, некротических участков, язв, рубцов, состояние чешуйчатого покрова.

Приподнимая жаберные крышки, осматривают жабры. Обращают внимание на форму и структуру жаберных лепестков, их окраску и степень ослизнения. Осматривают ротовую полость на наличие язв, новообразований, слизи, изменение окраски. При осмотре глаз обращают внимание на их форму, наличие кровоизлияний, цвет хрусталика и роговицы.

Рыб с выраженными клиническими признаками заболевания отсаживают в ведро, подсчитывают процент пораженных рыб. Отсаженную рыбу переносят в лабораторию, где проводят патологоанатомическое вскрытие и другие специальные лабораторные анализы для окончательной постановки диагноза. Порядок работы по проведению бактериологических, вирусологических и паразитологических исследований рыб приводится в соответствующих занятиях практикума.

2. Патологоанатомическое вскрытие рыбы. Его осуществляют в лаборатории, используя живую или только что ушнувшую рыбу. Живую рыбу обязательно обездвиживают. Обездвиживание можно проводить несколькими способами. Выбор способа зависит от размера рыбы. Особей длиной более 30 см обездвиживают ударом по голове. Небольших рыб обездвиживают при помощи препаровальной иглы, которую вводят сверху через черепную коробку, разрушая продолговатый отдел мозга (рис. 15), или ножницами делают затылочный разрез (рис. 16), в результате чего головной мозг отделяется от спинного. Для удобства рыбу фиксируют одним из способов, указанных в занятии 2, и приступают к вскрытию.

Брюшную полость рыбы вскрывают при помощи трех разрезов (рис. 17, а). Сначала скальпелем прокалывают стенку брюшной полости несколько выше и впереди анального отверстия. В прокол вставляют тупой конец ножниц и делают первый разрез, который проходит вдоль брюшка параллельно его средней линии и кончается за основанием грудных плавников. Вторым полукруглым разрезом отсекают стенку брюшной полости, обнажая внутренние органы. С помощью третьего разреза вдоль головы отделяют стенку брюшной полости и убирают ее в сторону. Разрезы делают осторожно, чтобы не повредить внутренние органы.

Патологоанатомический осмотр начинают с брюшной полости (рис. 17, б), обращая внимание на ее содержимое, наличие жидкости (ее количество, цвет и консистенцию) или газа, запаха, крупных полостных паразитов (рис. 17, в). Затем изучают внешний вид внутренних органов: наличие кровоизлияний, отеков, новообразований. После осмотра извлекают комплекс внутренних органов и осторожно отделяют их друг от друга. По внешним признакам: размеру, цвету, структуре, кровенаполнению и другим — определяют их состояние.

Выделение и осмотр внутренних органов рыбы проводят в следующем порядке: 1) желчный пузырь, 2) печень, 3) селезенка,

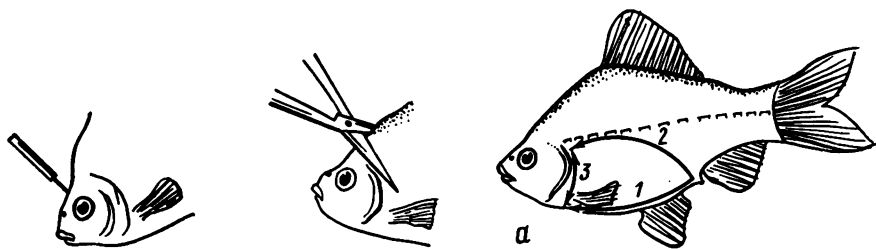


Рис. 15. Обездвиживание рыбы препаровальной иглой

Рис. 16. Обездвиживание рыбы ножницами (из Амляхера, 1972)

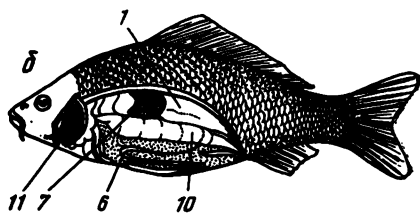
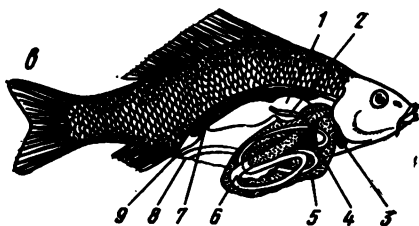


Рис. 17. Вскрытие брюшной полости рыбы (из разных авторов):

*a* — схема вскрытия; *б, в* — расположение внутренних органов; 1 — плавательный пузырь; 2 — воздушный ход; 3 — сердце; 4 — селезенка; 5 — печень; 6 — кишечник; 7 — почки; 8 — анальное отверстие; 9 — мочевой пузырь; 10 — половая железа; 11 — жабры



4) желудочно-кишечный тракт, 5) половые железы, 6) плавательный пузырь, 7) почки, 8) мочевой пузырь, 9) сердце, 10) головной мозг, 11) мускулатура. Органы раскладывают по чашкам Петри и смачивают дистиллированной водой.

**Желчный пузырь.** Определяют степень его наполнения и размер. Разрезают стенки пузыря и осматривают желчь, ее цвет, прозрачность и консистенцию.

**Печень.** Устанавливают ее форму, окраску, консистенцию, а также наличие кровоизлияний, светлых участков и цист.

**Селезенка.** Отмечают размеры, цвет, структуру, наличие кровоизлияний, рубцов, цист.

**Желудочно-кишечный тракт.** Осторожно расправляют его, освобождая от жировой ткани, и ножницами делают разрез вдоль кишечника. При наличии пищи ее осторожно убирают, обращая внимание на степень ее переваренности, цвет, запах, присутствие крупных гельминтов. Кишечник промывают в воде и по отделам просматривают слизистую оболочку. Отмечают ее цвет, общее состояние, т. е. наличие кровоизлияний, язв, отеков, истончений, рубцов и т. д.

**Половые железы.** Обращают внимание на размер, стадию зрелости, цвет, кровоизлияния и другие аномалии.

**Плавательный пузырь.** Определяют форму, величину, состояние оболочек, их толщину, прозрачность, наличие кровоизлияний, жидкости, гемосидерина и других признаков воспаления.

**Почки.** Просматривают все три отдела почек: головной, туловищный и хвостовой, обращая внимание на их форму, окраску, консистенцию, степень кровенаполнения.

**Мочевой пузырь.** Его обычно выделяют вместе с мочеточниками. Для этого скальпелем отделяют мочеточники от другой ткани, отсекают их от почек и, поднимая осторожно пинцетом, подходят к мочевому пузырю. Его освобождают от близлежащих тканей и пинцетом переносят в чашку Петри. Отмечают состояние оболочек мочеточников и мочевого пузыря, их утолщение, кровоизлияния, а также цвет и прозрачность мочи.

**Сердце.** Ножницами разрезают соединительнотканную перегородку сердечной полости и отсекают сердце. Описывают его размер, форму и степень наполнения полостей. Разрезают предсердие и желудочек и отмечают особенность крови, наличие сгустков.

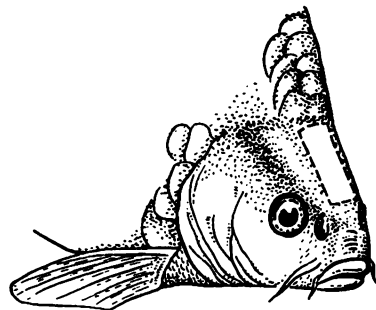


Рис. 18. Схема вскрытия черепной коробки

**Головной мозг.** Вскрывают черепную коробку с помощью 4 разрезов ножницами или скальпелем (рис. 18). Первый поперечный разрез проходит по заднему краю затылочной кости. Два продольных разреза идут с боковых сторон к соответствующей носовой ямке. Четвертым разрезом вырезанные кости убирают и осторожно удаляют ткань, покрывающую головной мозг. Сначала головной мозг осматривают, не вынимая из черепной коробки, а затем вынимают и, разрезая на доли, характеризуют состояние мозговых оболочек, вещества мозга, кровенаполнение сосудов.

**Мускулатура.** При осмотре скелетной мускулатуры обращают внимание на ее цвет, консистенцию, наличие кровоизлияний, отеков, опухолей, цист, а также на степень прикрепления к костям. Все отклонения, отмеченные при вскрытии, записывают в рабочую тетрадь, а затем отмечают в акте эпизоотологического обследования. Органы, имеющие патологические отклонения, дополнительно обследуют паразитологическими, бактериологическими, вирусологическими методами.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 9, 21]

1. Как проводят клинический осмотр рыбы?
2. Какое количество рыбы подвергают клиническому осмотру?
3. На какие признаки обращают внимание при клиническом осмотре?
4. Как обездвигнуть рыбу?

5. Назовите порядок патологоанатомического вскрытия.

6. На какие признаки обращают внимание при патологоанатомическом вскрытии?

## МЕТОДЫ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Успешная борьба с болезнями рыб зависит от своевременной и правильной постановки диагноза. В настоящее время в дифференциальной диагностике болезней наряду с паразитологическими, микробиологическими, вирусологическими исследованиями немаловажное значение приобретают исследования крови рыб.

Гематологические показатели позволяют оценить физиологическое состояние рыбы, выявить влияние того или иного заболевания на ее организм, определить тяжесть течения болезни, прогнозировать ее исход. Большие перспективы для их использования открывают индустриальные методы выращивания рыбы, при которых наряду с инвазионными и инфекционными заболеваниями возникает ряд незаразных болезней, диагностировать которые из-за отсутствия возбудителя значительно труднее.

Развитие медицинской и ветеринарной гематологии способствовало разработке новых универсальных методов гематологического анализа, таких, как приборные и фотоэлектроколориметрические методы, которые широко используют и при изучении крови рыб.

Для ихтиопатологических целей определяют следующие показатели крови: 1) содержание гемоглобина, 2) гематокритную величину, 3) число эритроцитов, 4) скорость оседания эритроцитов, 5) содержание гемоглобина в одном эритроците, 6) средний диаметр эритроцитов, 7) общее число лейкоцитов, 8) дифференциальный подсчет лейкоцитов, т. е. лейкоцитарную формулу и лейкоцитарный профиль. Первые шесть показателей характеризуют картину красной крови, т. е. эритроцитов, а остальные два — белой, т. е. лейкоцитов.

### Занятие 6. Изучение гематологических показателей у рыб и их диагностическое значение

**Содержание.** Определение показателей красной крови (гемоглобина, гематокрита, числа эритроцитов), изготовление и окраска мазка, оценка эритроцитарной картины крови рыб.

**Материальное обеспечение.** Микроскоп ММБ с набором объективов  $\times 8$ ,  $\times 40$ ,  $\times 90$ , кюветы для окраски мазков крови, камера Горяева, фотоэлектроколориметр или гемометр Сали, аппарат Папченкова, гематокритная центрифуга, обезжиренные предметные стекла. Стеклоянная посуда и необходимые реактивы описаны ниже при характеристике методик определения конкретных показателей.

**Организация и проведение работы.** Изменения в картине крови условно подразделяют на количественные и качественные. Количественные изменения проявляются как в увеличении, так и в уменьшении величины гематологических показателей по сравнению с нормой. Качественные изменения связаны с нарушением

соотношения форменных элементов (как эритроцитов, так и лейкоцитов), а также с образованием в них различных патологических изменений.

Показатели красной крови позволяют диагностировать в организме анемический процесс. Анемией, или малокровием, называют состояние организма, характеризующееся уменьшением количества гемоглобина, гематокрита, числа эритроцитов и другими неспецифическими изменениями.

При развитии патологического процесса у рыб И. Н. Остроумова выделила три стадии анемии. Для I стадии характерно небольшое уменьшение количества гемоглобина и числа эритроцитов. В крови отмечено до 46% незрелых форм эритроцитов. Для II стадии характерны резко уменьшенное количество гемоглобина и число эритроцитов (до 85%). В III стадии на фоне низких показателей гемоглобина, гематокрита и числа эритроцитов в крови отмечены лишь зрелые и разрушающиеся формы эритроцитов.

Резкое увеличение числа эритроцитов, или эритроцитоз, обычно сопровождается притоком в периферическую кровь молодых форм эритроцитов, поэтому этот процесс может протекать без увеличения количества гемоглобина.

Краткая характеристика конкретных показателей крови приведена ниже при описании методики его определения.

В настоящее время действует Международная система единиц (СИ). Некоторые примеры перехода гематологических показателей из одной системы единиц в другую даны в приложении 3.

Порядок проведения работы следующий.

1. Методы взятия крови у рыб. Кровь для исследования рыб можно брать различными способами: из сердца, жаберной вены, хвостовой артерии и др. Выбор способа зависит от размера рыбы и объема крови, необходимого для анализа.

Посуда и оборудование. Часовое стекло, инъекционная игла, копьевидный мандрен, пастеровская пипетка, глазная пипетка, ножницы, скальпель, марлевые салфетки, вата, кювета для вскрытия, живая рыба.

Реактив. 96°-ный спирт.

Взятие крови из сердца с помощью шприца или пастеровской пипетки. Место укола при этом способе взятия крови у форели находится в середине отрезка, соединяющего основания правого и левого грудных плавников, а у карпа — несколько выше этой точки (рис. 19). Рыбу фиксируют, завернув в марлевую салфетку. Место укола освобождают от слизи сначала сухим, а затем смоченным в спирте ватным тампоном. Иглу для инъекций или пастеровскую пипетку вводят в место укола под углом 45° относительно фронтальной плоскости рыбы. При попадании в сердце кровь начинает обильно поступать в пастеровскую пипетку или иглу. Кровь из пастеровской пипетки выдувают в часовое стекло и используют для проведения необходимых опытов.

Из хвостовой артерии кровь берут с помощью шприца или

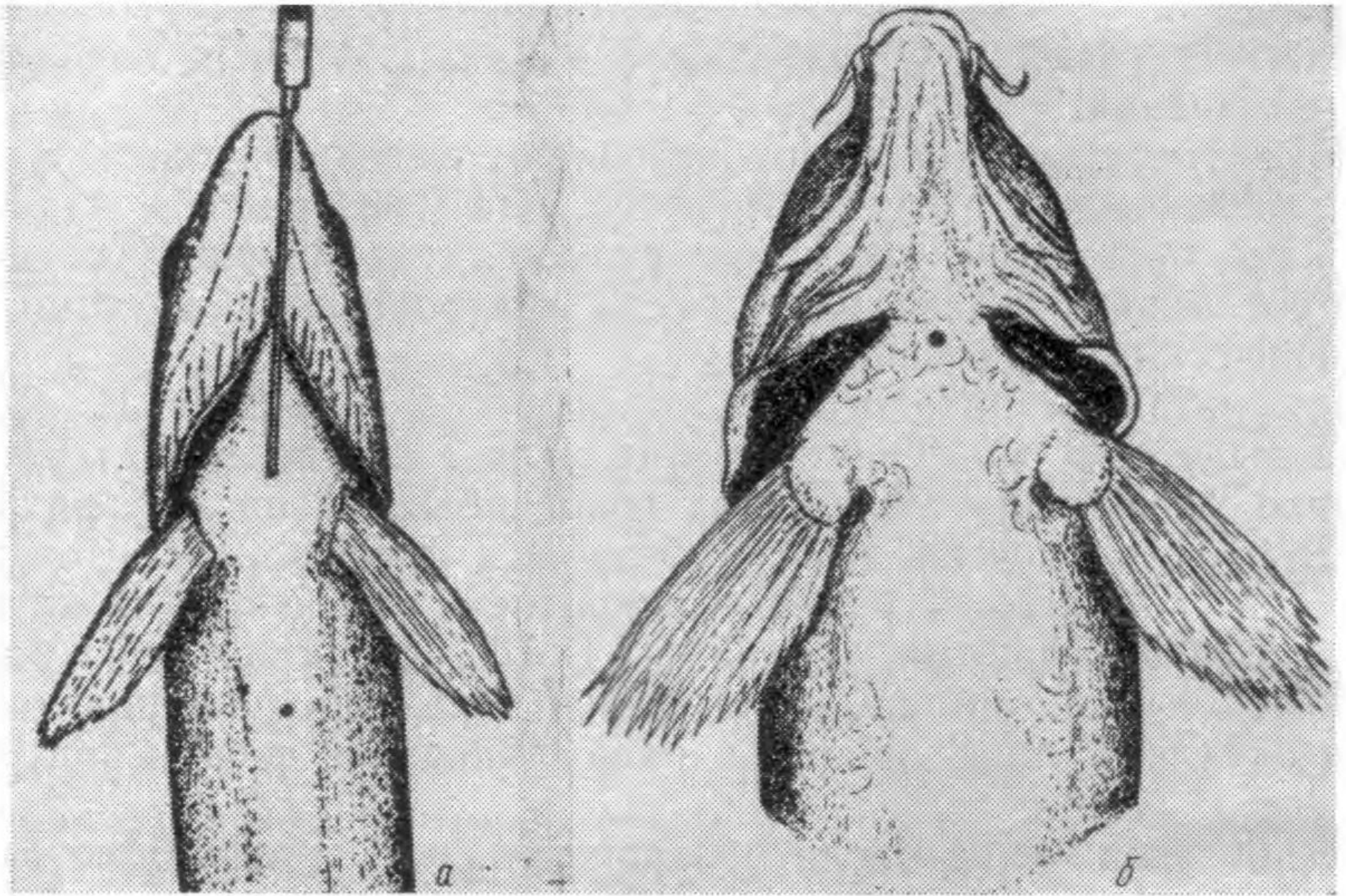


Рис. 19. Место взятия крови из сердца:  
а — форель; б — карп

пастеровской пипетки. У сеголетков карповых место укола находится в точке, образовавшейся при условном пересечении средней линии и линии, идущей от анального отверстия перпендикулярно средней линии; у карповых рыб старших возрастных групп место укола находится в точке пересечения средней линии и линии, идущей от задней границы анального плавника перпендикулярно средней линии (рис. 20). У лососевых укол делают в области заднего края анального плавника перпендикулярно позвоночнику.

Рыбу вынимают из воды и заворачивают в марлевую салфетку, освободив хвостовой стебель. Место прокола скальпелем освобождают от чешуи, а затем сначала сухим, а потом смоченным в спирте ватным тампоном тщательно вытирают от слизи. Иглой для инъекций вперед от позвоночника делают прокол под углом  $45^\circ$  до упора. Через иглу в часовое стекло собирают поступающую кровь. Для взятия крови этим способом можно использовать пастеровскую пипетку. В этом случае вначале в месте взятия делают укол копьевидным мандреном (рис. 21), затем в образовавшееся от укола мандрена отверстие вставляют, медленно вращая, пастеровскую пипетку и собирают кровь для анализа.

Взятие крови путем отсечения хвостового стебля. Рыбу вынимают из воды и обездвиживают. Срезают спинной и анальные плавники, заворачивают в марлевую салфетку, освободив хвостовой стебель. Скальпелем снимают чешую с хвостового стебля. Сначала сухим, а затем смоченным в спирте ватным тампоном снимают с поверхности тела слизь. Ножницами отсекают хвостовой стебель по медиальной линии сзади анального плавника

(см. рис. 20, 2). Кровь собирают в культе хвоста, держа рыбу вверх головой.

2. Приготовление и окраска мазков крови. Существует несколько способов окраски мазков крови. Выбор их зависит от поставленных задач. Для дифференциального подсчета форменных элементов и точной их идентификации в ихтиопатологии используют комбинированную окраску мазков крови по Паппенгейму.

Посуда и оборудование. Заранее приготовленные обезжиренные, сухие, матированные предметные стекла (приложение 4), шлифованное стекло для изготовления мазков крови, киевский аппарат для массовой окраски мазков крови, простой карандаш.

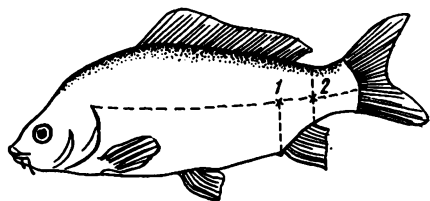


Рис. 20. Место взятия крови из хвостовой артерии у сеголетков (1), рыб старших возрастных групп (2) (из Метелева, Козлова, 1965, с изменениями)

Реактивы. Раствор Май-Грюнвальда, рабочий раствор азурзозина по Романовскому (приложение 5), дистиллированная вода с рН 6,81. Воду нейтрализуют фосфатными буферами (приложение 6).

Ход определения. В левую руку между большим и указательным пальцем берут обезжиренное предметное стекло (рис. 22). Пастеровской пипеткой из него рядом с матированным концом наносят маленькую каплю крови. Большим и указательными пальцами правой руки берут шлифованное стекло за боковые ребра, ставят на предметное стекло под углом  $45^\circ$  и подвигают тыльной стороной к капле, которая от соприкосновения растекается. Скользящим движением продвигают шлифованное стекло вперед. Кровь должна равномерно распределяться по предметному стеклу в виде мазка (рис. 23). На матированном участке стекла записывают сведения о рыбе, ее возрасте, указывают место и дату изготовления мазка, фамилию исследователя. Мазки ставят в штатив аппарата для окраски мазков и высушивают на воздухе (рис. 24). Сухие мазки погружают в чашку Петри аппарата с раствором Май-Грюнвальда. По истечении 5 мин мазки вынимают и промывают в дистиллированной воде с рН 6,81 в течение 1—2 мин. Мазки докрашивают в рабочем растворе Романовского в течение 25—30 мин (качество окраски клеток необходимо контролировать под малым увеличением микроскопа). Окрашенные мазки промывают водопроводной водой и высушивают на воздухе.

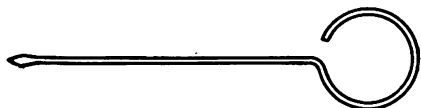


Рис. 21. Копьевидный мандрен

3. Оценка эритроцитарной картины крови рыб. Клетки эритроидного (красного) ряда у различных видов рыб более сходны между собой, чем лейкоциты. Родоначальными клетками красного

ряда являются эритробласты (табл. I, цв. вклейка). Это клетки округлой формы с резко базофильной (ярко-синей) гомогенной цитоплазмой. Крупное красно-фиолетовое ядро расположено в центре и содержит четко контурированные зерна хроматина клетки. В ядре имеются ядрышки, вокруг ядра — перенуклеарное пространство. Следующей стадией созревания являются базофильные нормобласты. Это клетки округлой формы. Цитоплазма

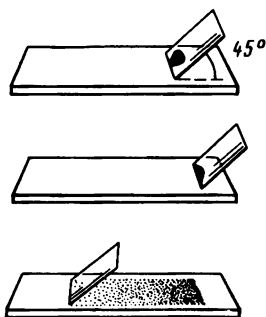


Рис. 22. Приготовление мазка крови

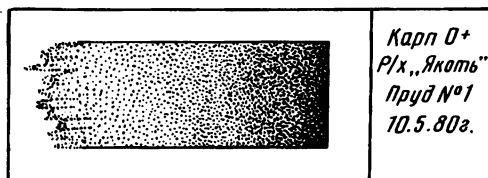


Рис. 23. Правильно приготовленный мазок крови

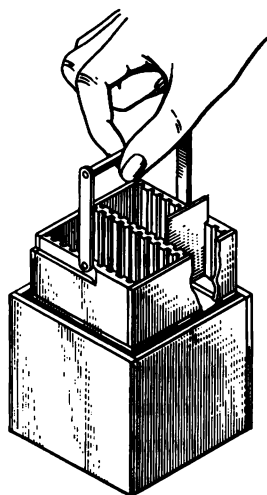


Рис. 24. Аппарат для массовой окраски мазков крови (из Глаголевой, 1977)

окрашена в синий цвет, но слабее, чем у эритробластов. Резко очерченные, грубо пятнистые ядра красно-фиолетового цвета расположены в центре. Полихроматофильные нормобласты овальной формы. В связи с тем что в цитоплазме этих клеток появляется гемоглобин, она окрашивается в грязно-розовый цвет. Хроматин ядра группируется, и его контуры приобретают отчетливую колесовидную форму и структуру. Оксифильные нормобласты — клетки овальной формы с гомогенной оранжевой цитоплазмой. Округлое красно-фиолетовое ядро с характерным резко контурированным рисунком хроматина и ахроматина расположено в центре клетки. Эритроциты отличаются от своей предыдущей стадии лишь характерной эллипсоидной формой. По соотношению молодых и зрелых форм эритроцитов оценивают активность кроветворения (эритропоэза).

Посуда и оборудование. Микроскоп МББ, окрашенные по Паппенгейму мазки крови.

**Ход определения.** Устанавливают микроскоп, подбирают освещение. Окрашенные мазки крови просматривают под микроскопом МББ, сначала под малым, а затем под иммерсионным объективом. Необходимо просмотреть не менее 1000 эритроцитов. Для этого мазок просматривают в 4 различных участках по 250 клеток эритроидного ряда в каждом (рис. 25). Найденные клетки следует рассмотреть, зарисовать и идентифицировать, т. е. определить стадию созревания эритроцита, используя «Атлас клеток крови» или «Схему кроветворения костистых рыб» (табл. I цв. вклейка). Дифференциально считают и выводят процент различных стадий созревания эритроцитов:

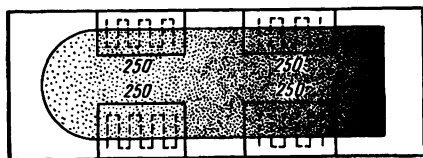


Рис. 25. Четырехпольный метод подсчета клеток крови на мазке (из Кудрявцева и др., 1969)

$$X = (A \cdot 100) / 1000 = A \cdot 0,1 \%,$$

где  $A$  — число незрелых эритроцитов, встретившихся при подсчете 1000 эритроцитов;  $X$  — искомый процент незрелых эритроцитов.

4. Определение гематокритной величины. Гематокритная величина, или гематокрит, т. е. отношение объема эритроцитов к общему объему крови, выражают в литрах на литр (л/л). 1 л/л равен 100%. Величина гематокрита у карпа в норме равна 0,36—0,40 л/л.

**Посуда и оборудование.** Микрокапилляры и центрифуга; при массовом отборе проб удобнее использовать специальную гематокритную центрифугу МГЦ-8.

**Реактивы.** Растворы антикоагулянтов (веществ, препятствующих свертыванию крови), раствор гепарина 1000 ЕД/мл или раствор Геллера и Пауля, содержащий в 100 мл воды 1,2 г щавелевокислого аммония и 0,8 г щавелевокислого калия.

**Ход определения.** Микрокапилляры предварительно обрабатывают раствором антикоагулянта. Для этого их несколько раз споласкивают в растворе гепарина и высушивают при комнатной температуре или в капилляр насыщают на  $1/10$  часть раствора Геллера и Пауля и высушивают в сушильном шкафу при 60°C. В подготовленные капилляры набирают кровь. Конец капилляра закупоривают с помощью замазки или специальных резиновых колпачков и центрифугируют до получения постоянного объема эритроцитов. Время вращения зависит от скорости вращения центрифуги.

**Учет результатов.** Отсчет объема эритроцитов и плазмы можно производить при помощи миллиметровой линейки. Отношение столба эритроцитов к высоте всего столба крови является гематокритной величиной.

5. Определение содержания гемоглобина. Гемоглобин — это дыхательный пигмент, содержащийся в эритроцитах. Его количество имеет важное диагностическое значение. Наиболее распро-

страненным и простым является метод определения гемоглобина по Сали. Однако он дает ряд объективных (постепенное усиление окраски) и субъективных (визуальное сравнение цвета) ошибок. В связи с этим разработан ряд более точных методов определения гемоглобина с использованием фотоэлектроколориметров (ФЭК) (рис. 26). Количество гемоглобина, содержащегося в крови, выражают в г/л или кг/л ( $1 \text{ кг/л} = 10^3 \text{ г/л}$ , или  $10^2 \text{ г\%}$ ). Количество гемоглобина у здоровых двухлетков карпа в летний период колеблется от 90 до 120 г/л.

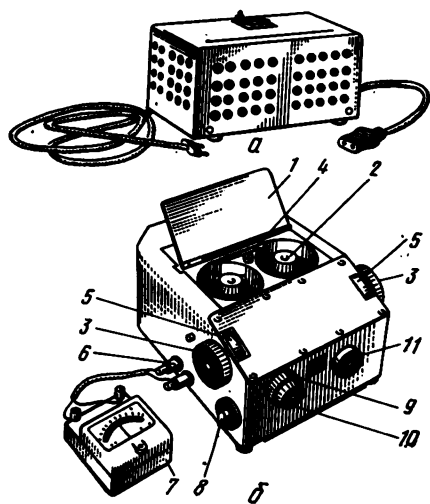


Рис. 26. Фотоэлектроколориметр (ФЭК-М):

*a* — стабилизатор; *б* — фотоэлектроколориметр; 1 — откидная крышка; 2 — держатели кювет; 3 — правый и левый барабаны; 4 — ручка шторок, прикрывающих световые пучки; 5 — измерительная шкала; 6 — гнезда для подключения гальванометра; 7 — гальванометр; 8 — переключатель чувствительности гальванометра; 9, 10 — ручки управления оптическими клиньями; 11 — ручки переключения светофильтров (из Шарпенко, Конышева, 1969)

Метод определения гемоглобина по Сали. Посуда и оборудование. Гемометр Сали (рис. 27), капиллярная пипетка от гемометра Сали, глазные пипетки, стеклянная палочка, часовое стекло.

Реактивы. 0,1 н. раствор  $\text{HCl}$ , дистиллированная вода.

Ход определения. В градуированную пробирку гемометра Сали до метки «2» глазной пипеткой наливают децинормальный раствор соляной кислоты. В капиллярную пипетку от гемометра Сали набирают кровь до метки 20 мкл и выдувают ее в раствор соляной кислоты. Полученную смесь перемешивают стеклянной палочкой и оставляют на 10 мин. По истечении времени в пробирку по каплям доливают дистиллированную воду и, перемешивая стеклянной палочкой, подбирают цвет рабочего раствора до совпадения с цветом жидкости в стандартных пробирках.

Учет результатов. Количество гемоглобина крови отсчитывают по нижнему мениску рабочего раствора на градуированной пробирке (показатели в г% выражают в г/л).

Определение гемоглобина цианметгемоглобиновым фотометрическим методом. Посуда и оборудование. Фотоэлектроколориметр (ФЭК) или спектрофотометр, зеленый светофильтр, рабочие кюветы толщиной 1 см, химические пробирки с пробками, капиллярная пипетка от гемометра Сали на 20 мкл, градуированная пипетка вместимостью на 5 мл.

Реактивы. Трансформирующий раствор Драбкина, содержащий в 1 л: 1) бикарбонат натрия — 1 г, 2) красную кровяную

соль — 0,2 г, 3) цианистый калий или натрий — 0,05 г, 4) дистиллированную воду — остальной объем.

Ход определения. Мерной пипеткой в пробирку (осторожно!) наливают 5 мл трансформирующего раствора. Пипеткой от гемометра Сали добавляют 20 мкл крови. Затем ополаскивают ее путем попеременного насасывания и выдувания жидкости. Содержимое пробирки хорошо перемешивают и оставляют в холодильнике не менее чем на 20 мин. Включают ФЭК. По истечении этого времени рабочий и трансформирующий растворы наливают в рабочие кюветы и, используя зеленый светофильтр, проводят измерения.

Учет результатов. Расчет концентрации гемоглобина (в г/л) на основе данного определения производят по формуле

$$X = D_{540} \cdot 367,1 \text{ г/л},$$

где  $D_{540}$  — показания ФЭК; 367,1 — коэффициент пересчета, учитывающий разведение крови, миллимолярный вес гемоглобина и другие показатели.

6. Определение числа эритроцитов пробирочным методом. Число эритроцитов (в млн. в 1 мкл) — важный показатель для характеристики патологического процесса. Особенно велика его роль в диагностике анемий. Например, у здоровых двухлетков карпа число эритроцитов равно 1,6—2,0 млн. в 1 мкл.

Посуда и оборудование. Химические пробирки с пробками, градуированные пипетки на 5 мл, пастеровская пипетка, капиллярная пипетка от гемометра Сали на 20 мкл, камера Горяева, микроскоп МББ.

Реактивы. 0,85% -ный раствор хлористого натрия.

Ход определения. Градуированной пипеткой в химическую пробирку наливают 4 мл раствора хлористого натрия. В капиллярную пипетку от гемометра Сали набирают кровь до метки 20 мкл и выдувают в пробирку, осторожно промывая капилляр по нескольку раз. Покровное стекло притирают к камере Горяева до появления ньютоновских колец. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и пастеровской пипеткой заполняют камеру Горяева. Через 1—2 мин начинают подсчет числа эритроцитов под микроскопом обычным способом в 5 больших или в 80 малых квадратах, расположенных по диагонали (рис. 28).

Учет результатов. Количество эритроцитов в 1 мкл определяют по формуле

$$X = (A \cdot 4000 \cdot 200) / 80,$$

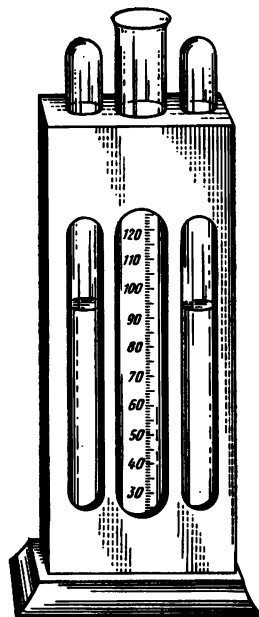


Рис. 27. Гемометр Сали (из Голодец, 1955)

где  $X$  — количество эритроцитов в 1 мкл крови;  $A$  — количество эритроцитов, определенное в 80 малых квадратах; 4000 — множитель, приводящий результат к объему 1 мкл; 200 — рабочее разведение; 80 — число просчитанных квадратов.

Для упрощения подсчетов количества эритроцитов в 1 мкл достаточно умножить число эритроцитов, определенное в 80 квадратах ( $A$ ), на 10000.

7. Определение скорости оседания эритроцитов (СОЭ). В зависимости от физических и химических свойств крови, которые меняются при воспалительных процессах, эритроциты оседают в

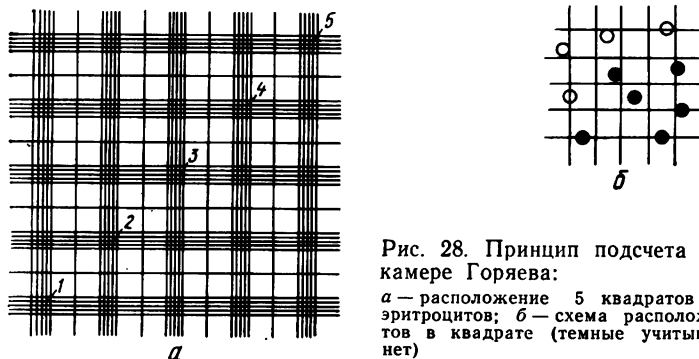


Рис. 28. Принцип подсчета эритроцитов в камере Горяева:

$a$  — расположение 5 квадратов для подсчета эритроцитов;  $b$  — схема расположения эритроцитов в квадрате (темные учитывают, светлые — нет)

микрокапиллярах с различной скоростью. Скорость оседания эритроцитов (в мм/ч) определяют в аппарате Панченкова (рис. 29). Например, скорость оседания эритроцитов у здоровых двухлетков карпа равна 2—4 мм/ч.

Посуда и оборудование. Часовое стекло, аппарат Панченкова, состоящий из штатива и специальных капиллярных пипеток. На пипетках нанесена миллиметровая шкала длиной 10 см. Верхнее деление шкалы отмечено «0» и буквой «К» (кровь). Против деления 50 имеется буква «Р» (реактив).

Реактив. Профильтрованный 5%-ный раствор трехзамещенного лимоннокислого натрия.

Ход определения. Промывают капиллярную пипетку раствором лимоннокислого натрия. Набирают раствор лимоннокислого натрия до метки «Р» и спускают в часовое стекло. Этим же капилляром набирают 2 раза кровь до метки «К» и спускают в часовое стекло. Смесь хорошо перемешивают и набирают в капилляр до метки «К». Протерев кончик капилляра ватой, его ставят в штатив аппарата Панченкова на 1 ч.

Учет результатов. Скорость оседания эритроцитов определяют по делениям на капиллярной пипетке. Учитывают величину столбика плазмы, освободившуюся от эритроцитов.

#### Контрольные вопросы [5, 14, 15, 41]

1. Для каких целей определяют гематологические показатели у рыб?
2. Какие показатели характеризуют картину красной крови?

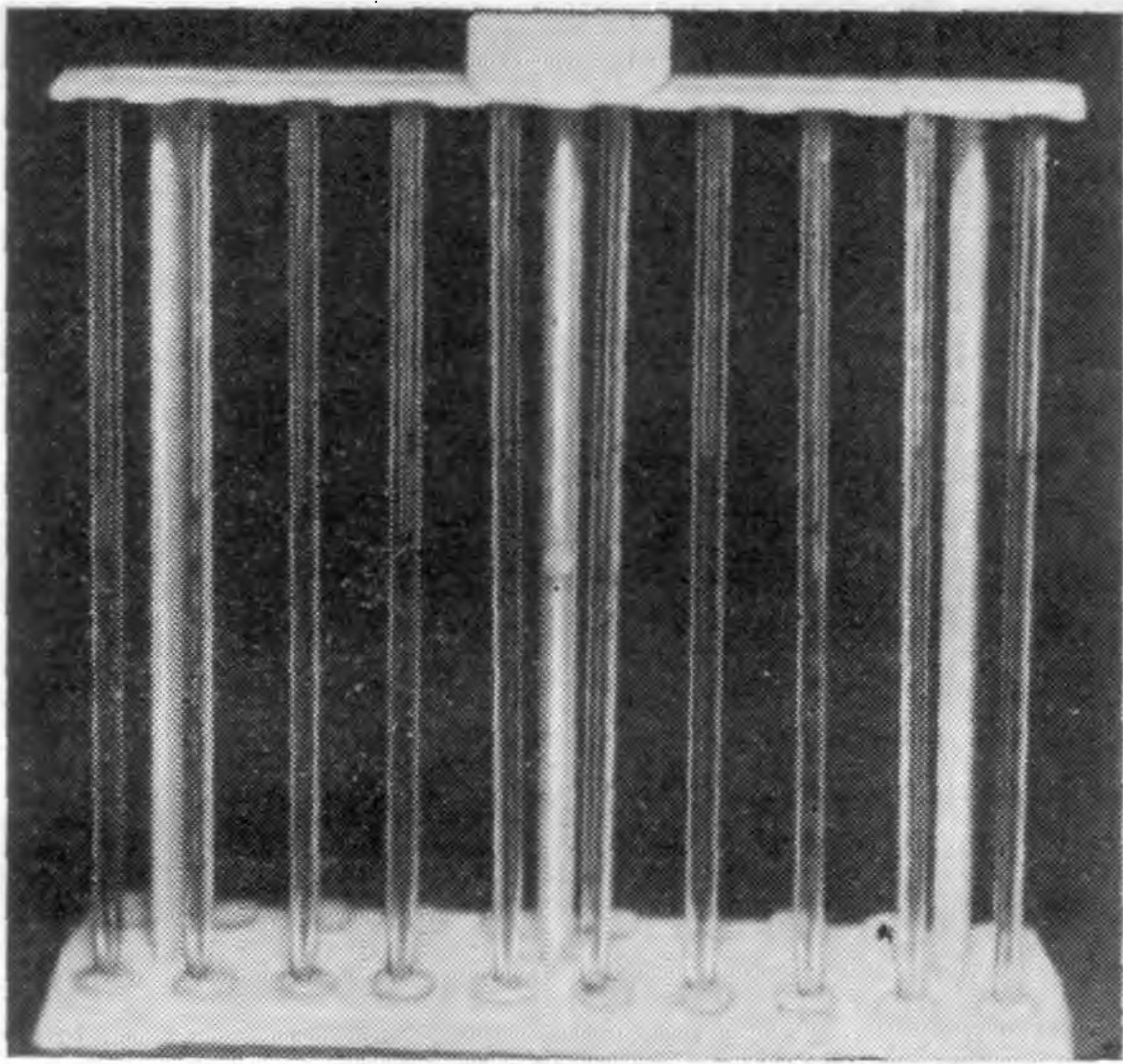


Рис. 29. Аппарат Панченкова

3. Какие показатели характеризуют картину белой крови?
4. Каковы качественные и количественные изменения в картине крови?
5. Что такое анемия? Как она проявляется?
6. Что такое эритроцитоз?
7. Назовите стадии последовательного созревания эритроцитов и их морфологические особенности.
8. Перечислите основные методы взятия крови у рыб.
9. Какой способ окраски мазков крови используют в ихтиопатологии?
10. Что такое гематокритная величина?
11. С какими методами определения гемоглобина Вы знакомы?
12. В каком аппарате определяют скорость оседания эритроцитов?

### **З а н я т и е 7. Изучение морфологии лейкоцитов и их диагностическое значение**

**Содержание.** Знакомство с морфологией лейкоцитов у рыб, их идентификация, определение общего числа лейкоцитов и их дифференциальный подсчет (выведение лейкоцитарной формулы и построение лейкоцитарного профиля).

**Материальное обеспечение.** Микроскоп МББ с объективами  $\times 8$ ,  $\times 40$ ,  $\times 90$ , иммерсионное масло, одиннадцатиклавишный счетчик, трафарет графиков для построения лейкоцитарного профиля, демонстрационная таблица «Схема кроветворения костистых рыб» (см. табл. I, цв. вклейка \*).

**Организация и проведение работы.** Лейкоциты рыб, выполняющие в организме в основном защитную функцию, привлекали к себе внимание многих исследователей. Очень много для классификации лейкоцитов сделал проф. Н. В. Пучков с учениками. Наиболее детальная генетическая классификация с учетом цитогенеза лейкоцитов предложена Н. Т. Ивановой. В основу этой классифи-

\* См. И в а н о в а Н. Т. Атлас клеток крови рыб. М., 1983.

кации положены тинкториальные свойства лейкоцитов, т. е. их способность различно окрашиваться основными и кислыми красителями. При окрашивании мазков крови по Паппенгейму четко проявляется дифференциация лейкоцитов на гранулоциты (клетки с зернистостью в цитоплазме) и агранулоциты (без зернистости в цитоплазме). В зависимости от структуры и свойств гранул зернистые лейкоциты под действием красителей окрашиваются различно. С основным красителем взаимодействуют базофильные гранулы базофилов, а с кислым — оксифильные гранулы эозинофилов. У трех групп гранулоцитов — нейтрофилов, псевдоэозинофилов и псевдобазофилов — наблюдаются амфотерные свойства, т. е. они взаимодействуют как с основными, так и с кислыми красителями. На нейтрофилы оба красителя действуют одинаково, и их действие нейтрализуется, т. е. грануляция не прокрашивается. У псевдоэозинофилов и псевдобазофилов гранулы окрашиваются обоими красителями, но с преобладанием у первых кислого, а у вторых основного красителя.

У агранулоцитов (моноцитов и лимфоцитов) зернистость в цитоплазме отсутствует. Количество лейкоцитов имеет важное диагностическое значение. При резком увеличении числа лейкоцитов наблюдается лейкоцитоз, резком уменьшении — лейкопения.

Порядок проведения работы следующий.

**I. 1. Знакомство с морфологией лейкоцитов.** Устанавливают микроскоп, подбирают освещение. Работу проводят с сухими мазками крови, окрашенными по Паппенгейму на предыдущем занятии. Сначала мазок просматривают под объективом  $\times 8$ ,  $\times 40$ , затем —  $\times 90$  с использованием иммерсионного масла. Найденные лейкоциты рассматривают, зарисовывают и идентифицируют, используя демонстрационную таблицу или «Атлас клеток крови».

Более подробно морфологические особенности лейкоцитов разберем на примере крови карпа (табл. II, цв. вклейка). В крови карпа различают 7 групп лейкоцитов на различных стадиях цитогенеза: 5 групп гранулоцитов, родоначальником которых является миелобласт (нейтрофилы, эозинофилы, псевдоэозинофилы, базофилы, псевдобазофилы), и 2 группы агранулоцитов (моноциты и лимфоциты). Кроме того, в крови встречаются бластные формы, т. е. родоначальные клетки (гемоцитобласт, миелобласт, промиелоцит). Нейтрофилы, как и другие гранулоциты, в своем цитогенезе проходят 4 стадии: миелоцит, метамиелоцит, палочкоядерную и сегментоядерную формы, которые также должны учитываться. Таким образом, в крови карпа можно дифференцировать 13 форм лейкоцитов.

**Гемоцитобласты.** Нежное красно-фиолетовое ядро занимает почти всю клетку. В ядре просматриваются ядрышки. На долю нежно-голубой цитоплазмы приходится незначительная часть. Скопление этих клеток отмечали в очагах гемопоэза. Слабобазофильная цитоплазма миелобластов окружает нежно-сетчатое ядро более широким слоем, чем у предыдущей стадии. Клетка крупная.

В ядре имеются ядрышки. В периферической крови эти клетки очень редки.

**Промиелоциты.** Клетки овальной формы значительно больших размеров, чем предыдущие стадии. Эксцентрично расположенное нежное красно-фиолетовое ядро содержит ядрышки. У более поздних стадий в цитоплазме видна специфическая зернистость.

**Нейтрофильные гранулоциты.** В цитоплазме содержат мелкую, почти бесцветную специфическую зернистость. В цитогенезе проходят 4 стадии, которые различают по структуре и форме ядра. У миелоцитов оно относительно круглое, рыхлое, красно-фиолетового цвета, у метамиелоцитов более плотное, эксцентрично расположенное, овальное или слегка вытянутое. Палочкоядерные формы имеют красно-фиолетовое, продолговатое, часто почкообразное ядро. У сегментоядерных форм оно, как правило, рассечено на две доли.

**Эозинофильные гранулоциты (эозинофилы).** Округлые клетки с плотным, овальным или круглым ядром. Цитоплазма заполнена плотно лежащими гранулами с абсолютной ацидофилией. У псевдоэозинофилов в цитоплазме находятся мелкие игольчатые гранулы малинового цвета. Ядро округлое. В цитоплазме базофилов в небольшом количестве содержатся крупные одинакового размера гранулы красно-фиолетового цвета. Ядро округлой или овальной формы, красно-фиолетового цвета. Псевдобазофилы по форме ядра и клетки близки к эозинофилам, однако резко отличаются от них по зернистости. Вся цитоплазма псевдобазофилов заполнена разнородной красно-фиолетовой зернистостью.

**Незернистые лейкоциты (агранулоциты).** Преобладают лимфоциты, имеющие различную форму — округлую, овальную или вытянутую. Темно-синяя цитоплазма узким кольцом окружает плотное красно-фиолетовое ядро. Цитоплазма может быть едва заметной, тогда клетки кажутся как бы «голаядерными». Моноциты имеют эксцентрично расположенное круглое красно-фиолетовое ядро округлой, вытянутой или лопастной формы с характерным рисунком. Гомогенная цитоплазма серовато-голубоватого цвета.

При различных патологических состояниях организма рыб, в том числе и при заболеваниях, в крови можно встретить морфологически измененные клеточные элементы (как эритроциты, так и лейкоциты) (табл. III, цв. вклейка).

1. Гиперсегментация ядра. Ядро разделяется на несколько соединенных между собой сегментов.

2. Хроматинолиз. Возникает при распаде хроматина, который теряет свою нормальную структуру, растворяется. Ядро окрашивается в светлый цвет, контуры его сохраняются.

3. Кариолиз. Растворение лишь части ядра с сохранением его нормальной структуры. В местах растворения ядро теряет способность окрашиваться. Контуры его нечеткие, размытые.

4. Пикноз. Уплотнение хроматина ядра. Ядро становится темным, бесструктурным. Процесс пикнотизации распространяется либо на все ядро, либо на отдельные его участки.

5. Кариорексис. Распад ядра на отдельные части обычно сочетается с пикнозом. При этом образуются не связанные между собой округлые бесструктурные темно-вишневые образования.

6. Цитолиз, или лизис. Распад клетки. Цитоплазма может отсутствовать. Ядро теряет свою обычную структуру, контуры его расплывчатые.

7. Вакуолизация. Встречается как в ядре, так и в цитоплазме. Возникает в связи с расстройством внутриклеточного обмена. Наличие ее в ядре указывает на тяжесть патологического процесса. Вакуолизация может сочетаться с другими структурными изменениями клеток.

8. Изменение зернистости у гранулоцитов. Возникает при различных заболеваниях. При этом могут меняться форма, размеры и цвет гранул.

**II. Определение общего числа лейкоцитов косвенным методом.** В четырех различных участках мазка подсчитывают число лейкоцитов, приходящихся на 250 эритроцитов. Полученные цифры суммируют и получают число лейкоцитов, встретившихся при подсчете 1000 эритроцитов в мазке крови.

Число лейкоцитов в 1 мкл крови определяют по формуле

$$X = (AB)/1000,$$

где  $X$  — общее количество лейкоцитов в 1 мкл крови;  $A$  — число эритроцитов в 1 мкл крови, определенное в камере Горяева (на предыдущем занятии);  $B$  — число лейкоцитов при подсчете 1000 эритроцитов в мазке крови.

**Пример.** На 1 тыс. эритроцитов в мазке крови приходится 40 лейкоцитов. Определить общее количество лейкоцитов в 1 мкл, зная, что у обследованной рыбы количество эритроцитов составило 1,5 млн. в 1 мкл.

Имеющиеся данные подставляем в формулу

$$X = (1\ 500\ 000 \cdot 40)/1000 = 60\ 000 \text{ лейкоцитов в } 1 \text{ мкл крови.}$$

**III. Дифференциальный подсчет лейкоцитов.** Лейкоцитарная формула и лейкоцитарный профиль. Мазок крови просматривают под объективом  $\times 90$ . Найденные лейкоциты регистрируют на 11-клавишном счетчике (рис. 30). Эта простейшая счетная машинка суммирует все дифференциально отмеченные лейкоциты и дает сигнал (в виде звонка) о подсчете 100 или 200 клеток. Для ихтиопатологических целей подсчитывают 200 лейкоцитов и лишь при большой лейкопении допускается просчитывать 100 клеток. Выводят лейкоцитарную формулу крови, которая отражает отношение различных групп лейкоцитов в процентах. Составляют пропорцию: 200 клеток — 100%,  $A$  клеток —  $X\%$ .

$$X = (A \cdot 100)/200,$$

где  $X$  — процент определяемой группы клеток в лейкоцитарной формуле;  $A$  — количество этих клеток, найденное при просчете 200 клеток (по показанию счетчика).

**Пример.** Вывести процент эозинофилов в лейкоцитарной формуле осетра, если при подсчете 200 клеток на счетчике указано 12 шт.

Эозинофилы в лейкоцитарной формуле составляют

$$(12 \cdot 100)/200 = 6\%.$$

Лейкоцитарная формула указывает на относительное соотношение лейкоцитов. При заболеваниях она не дает полного представления об истинной картине белой крови, поэтому, определив процентное соотношение отдельных видов клеток, вычисляют их

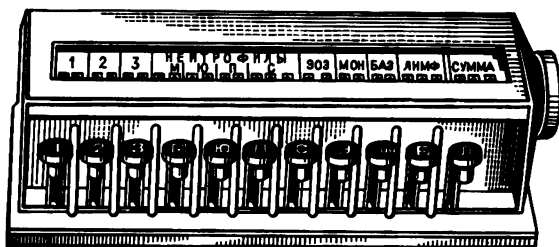


Рис. 30. 11-клавишный счетчик для подсчета форменных элементов крови (из Крылова, 1974)

абсолютное значение, т. е. число лейкоцитов каждого вида в 1 мкл крови. Для этого используют формулу пересчета

$$X = (AB)/100,$$

где  $X$  — абсолютное значение определяемой группы лейкоцитов, шт./мкл;  $A$  — ее процентное значение в лейкоцитарной формуле, %;  $B$  — общее число лейкоцитов в 1 мкл, тыс. шт./мкл; 100 — общий процент всех лейкоцитов в лейкоцитарной формуле, %.

**Пример.** Общее число лейкоцитов в 1 мкл крови равно 60 тыс., из них 60% составляют лимфоциты. Определить абсолютное число лимфоцитов в крови.

Абсолютное число лимфоцитов в 1 мкл крови равно

$$(60 \cdot 60000)/100 = 36 \text{ тыс./мкл.}$$

Более наглядно учитывать качественные и количественные сдвиги клеток белой крови при лейкоцитозах и лейкопениях позволяет лейкоцитарный профиль, или ломаная линия, которую строят по значениям абсолютного количества отдельных групп лейкоцитов в 1 мкл крови. Эти данные наносят на трафарет графика, где заштрихованными прямоугольниками обозначены пределы колебаний абсолютного значения различных групп лейкоцитов в норме (рис. 31).

Колебания абсолютного числа различных групп лейкоцитов в течение летнего сезона у сеголетков и двухлетков здорового карпа приведены в табл. 1. По этим данным и строят прямоугольники на трафарете.

Лейкоцитарный профиль строят, исходя из лейкоцитарной формулы. По формуле пересчета, приведенной выше, вычисляют абсолютное значение всех групп лейкоцитов. Эти данные переносят на

Колебание абсолютного числа лейкоцитов карпа в летний период, необходимое для построения графика

Возраст	Общее число нейтрофилов	Миелоциты нейтрофильные	Метамиелоциты нейтрофильные	Палочкоядерные нейтрофилы
---------	-------------------------	-------------------------	-----------------------------	---------------------------

Сеголетки	85 — 860	65 — 172	43 — 636	43 — 241
Двухлетки	3625 — 10800	900 — 2880	995 — 3540	1280 — 4080

Продолжение

Возраст	Сегментно-ядерные нейтрофилы	Базофилы и псевдобазофилы	Эозинофилы и псевдоэозинофилы	Моноциты	Лимфоциты
---------	------------------------------	---------------------------	-------------------------------	----------	-----------

Сеголетки	40 — 241	107 — 602	0 — 2150	426 — 2872	10536 — 14520
Двухлетки	375 — 1020	600 — 1920	1100 — 3520	680 — 2160	17780 — 61360

подготовленный заранее трафарет или график с прямоугольниками (см. рис. 31). Полученные точки соединяют между собой прямыми линиями. Полученная ломаная линия является лейкоцитарным профилем обследованной рыбы. На рис. 32 дан лейкоцитарный профиль отловленных в середине июля здорового двухлетнего карпа и больного бронхиомикозом. Видно, что лейкоцитоз при бронхиомикозе вызван увеличением числа моноцитов и лимфоцитов и поэтому должен характеризоваться как моно- и лимфоцитоз.

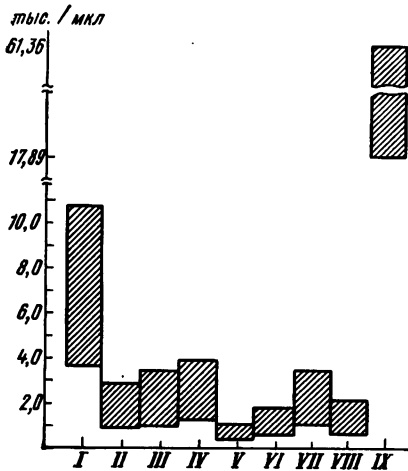


Рис. 31. Трафарет графика для построения лейкоцитарного профиля двухлетков карпа:

I — общее число нейтрофилов; II — миелоциты нейтрофильные; III — метамиелоциты нейтрофильные; IV — палочкоядерные нейтрофилы; V — сегментоядерные нейтрофилы; VI — базофилы и псевдобазофилы; VII — эозинофилы и псевдоэозинофилы; VIII — моноциты; IX — лимфоциты

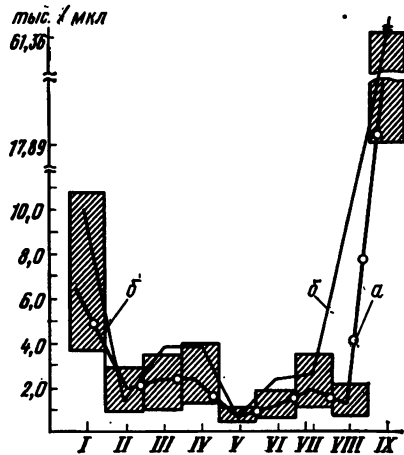


Рис. 32. Лейкоцитарный профиль карпа в норме и при бронхиомикозе:

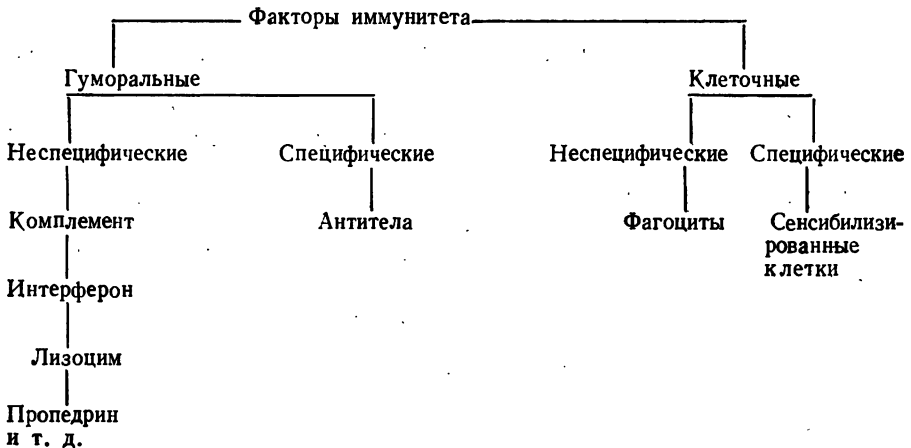
а — норма; б — бронхиомикоз; I — общее число нейтрофилов; II — миелоциты нейтрофильные; III — метамиелоциты нейтрофильные; IV — палочкоядерные нейтрофилы; V — сегментоядерные нейтрофилы; VI — базофилы и псевдобазофилы; VII — эозинофилы и псевдоэозинофилы; VIII — моноциты; IX — лимфоциты

## Контрольные вопросы [4, 14, 15, 19]

1. Кто разработал современную классификацию лейкоцитов?
2. Что легло в основу классификации лейкоцитов?
3. На какие две группы делятся лейкоциты? Каковы их особенности?
4. Сколько групп гранулоцитов определяют в крови костистых рыб? Перечислите их.
5. Какой признак является определяющим при идентификации лейкоцитов? Приведите пример.
6. По какой формуле подсчитывается общее число лейкоцитов?
7. Для каких целей используют 11-клавишный счетчик?
8. Что такое лейкоцитарная формула?
9. Что такое лейкоцитарный профиль?
10. Как построить лейкоцитарный профиль?

## МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ИММУНИТЕТА

Нормальное функционирование любого организма невозможно без защитных реакций, направленных против разнообразных патогенных агентов. Одним из защитных свойств организма рыб является иммунитет, который направлен против чужеродных веществ и организмов, а также против собственных физиологически неполноценных элементов. Иммунологическая защита осуществляется путем воздействия на патогенные и условно-патогенные агенты (микроорганизмы, токсические вещества, отмирающие и разрушенные собственные клетки и т. д.) факторов иммунитета. Факторами иммунитета являются либо специальные вещества (гуморальные факторы), либо особые клетки. Каждая группа факторов состоит из неспецифических и специфических образований, которые представлены на схеме.



Неспецифические гуморальные реакции весьма разнообразны и имеют различную природу. Большое значение в неспецифическом иммунитете имеют ферменты, которые входят в состав системы комплемента и к которым относится лизоцим. Неспецифическая клеточная реакция обусловлена фагоцитозом, который заключается в поглощении специальными клетками — фагоцитами —

возбудителей или других образований с последующим воздействием на них внутриклеточных ферментов.

Иммунологическая специфичность является своеобразным физиологическим явлением. В ответ на воздействие некоторых веществ в организме рыб образуются особые вещества — антитела и антителоподобные структуры (рецепторы). Антитела циркулируют в органах и тканях, а рецепторы находятся на поверхности клеток, названных сенсibilизированными клетками. Основной особенностью антител и рецепторов является наличие в их молекуле участков (активных центров), точно соответствующих определенным участкам (детерминантам) в молекуле воздействующего агента. Вещества, вызывающие специфическую иммунологическую реакцию организма в виде образования антител и сенсibilизированных клеток, называют антигенами.

Указанные факторы иммунитета в организме рыб действуют не изолированно, а содружественно. Так, фагоцитоз значительно усиливается в присутствии приобретенных антител (опсонин), которые соединяются с микроорганизмами и способствуют их поглощению и перевариванию фагоцитами. Показано также, что лизис патогенных бактерий происходит при воздействии антител и комплемента.

Иммунологические методы находят все большее применение в различных областях ихтиопатологии. Наибольшее значение они приобрели для диагностики и профилактики болезней культивируемых видов рыб.

В основе диагностики болезней лежат специфические реакции иммунитета, позволяющие определить антигены и антитела к определенным возбудителям и установить природу возбудителя болезни. Большое значение имеет изучение антигенного состава возбудителей, выделенных из организма рыб. Знание антигенных особенностей культур возбудителей позволяет более точно их идентифицировать и помогает проводить эпизоотологический анализ.

Иммунологические методы профилактики основаны на способности организма рыб приобретать повышенную устойчивость к заболеванию после введения вакцин из соответствующего возбудителя. Этот метод применяется для профилактики ряда инфекционных болезней лососевых и карпа: вибриоза, фурункулеза, вирусных заболеваний.

Особенно важное практическое значение для диагностики имеют специфические антитела. Методы определения основных видов антител приведены ниже. Кроме того, дана методика определения фагоцитарной активности клеток, играющей существенную роль в противoinфекционном иммунитете рыб.

## **З а н я т и е 8. Серологические методы исследований**

**Содержание.** Ознакомление с принципами определения антител и антигенов; изучение способов получения, обработки и разведения сывороток.

**Материальное обеспечение.** Живая рыба, пробирки (разные), стеклянные

палочки, пипетки на 1 и 2 мл, микропипетки на 0,1 и 0,2 мл, пипетки пастеровские, настольная центрифуга, центрифужные стаканы, весы для уравнивания центрифужных стаканов, ювета для фиксации рыбы, водяная баня, забуференный изотонический раствор хлористого натрия с рН 7,17 (ЗИР).

**Организация и проведение работы.** Серологическими методами (от латинского слова *serum* — сыворотка) называют иммунологические методы, с помощью которых в сыворотке и другом материале обнаруживают специфический антиген и антитела. В основе

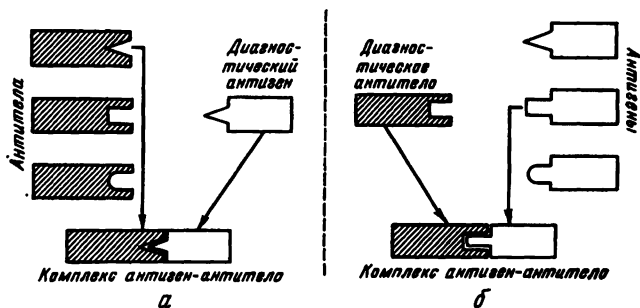


Рис. 33. Схема определения антител (а) и антигенов (б)

серологических реакций лежит избирательная способность специфического антигена и соответствующих антител реагировать друг с другом независимо от присутствия других антигенов и антител. В результате взаимодействия специфического антигена и антитела образуется комплекс антиген — антитело, или иммунный комплекс. Для обнаружения антител необходимо иметь соответствующий антиген, который называется диагностикумом, или диагностическим антигеном (рис. 33, а). Если в исследуемом материале имеются специфические антитела, то они соединяются с диагностическим антигеном. Образование иммунного комплекса сопровождается появлением осадка, слипанием бактериальных клеток диагностикума и другими явлениями.

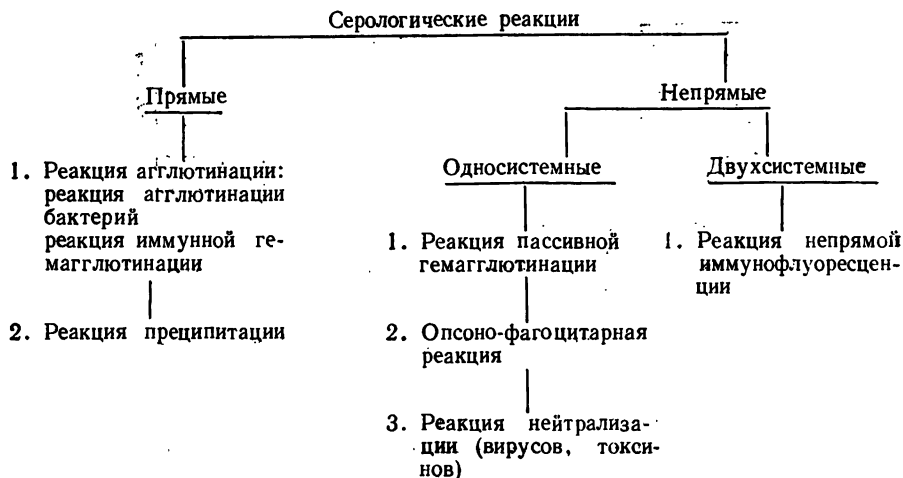
Чтобы обнаружить антиген, нужно иметь соответствующие антитела, которые получают путем иммунизации животных данным антигеном. У иммунизированных животных в период наибольшего содержания антител берут кровь и получают из нее сыворотку, которую называют гипериммунной диагностической сывороткой. Если в исследуемом материале имеется специфический антиген, то он соединяется с антителами и образуется иммунный комплекс (см. рис. 33, б).

Порядок проведения работы следующий.

Преподаватель знакомит учащихся с классификацией серологических реакций и демонстрирует способы обработки сыворотки. Учащиеся самостоятельно получают сыворотки и отрабатывают способы их разведения.

В основе классификации серологических реакций лежит характер взаимодействия антигена с антителами. Различают прямые и непрямые серологические реакции. К прямым реакциям относят реакции, при которых образование комплекса из антигена и антител сопровождается какими-либо видимыми изменениями (выпадением осадка, слипанием бактерий).

**Классификация серологических реакций**  
(сокращенная схема В. М. Никитина, 1974)



При непрямых односистемных реакциях вначале, на первом этапе, образуется иммунный комплекс, а на втором этапе реакции образовавшийся комплекс выявляется каким-либо способом. Реакция пассивной гемагглютинации основана на реагировании антител с антигеном, находящимся на поверхности эритроцита, что сопровождается склеиванием (агглютинацией) эритроцитов. При опсоно-фагоцитарной реакции вначале бактерии обрабатывают сыворотками, содержащими антитела к их поверхностным антигенам, а затем определяют характер фагоцитирования бактерий клетками органов и тканей рыб. К этой группе реакций относят методы выявления антител, подавляющих жизнеспособность вирусов, патогенное действие токсических веществ. В ряде случаев воздействие антител приводит к изменению отдельных свойств возбудителя, например подавлению подвижности икhtiофтириусов.

К непрямым двухсистемным реакциям относят более сложные реакции, например метод непрямой иммунофлуоресценции, который применяется при диагностике болезней рыб (рис. 34). Для обнаружения антител вначале на мазок с материалом, содержащим возбудитель, наносят испытуемую сыворотку. Если сыворотка содержит специфические антитела, то они соединяются с антигенами возбудителя и образуется первый иммунный комплекс. Затем добавляют другую сыворотку, содержащую антитела, к бел-

кам сыворотки рыб. Предварительно эти антитела соединяют со специальными красителями — флуорохромами, светящимися при облучении ультрафиолетовыми лучами. Поскольку антитела рыб представляют собой белки, то противобелковые антитела соединяются с ними и образуется второй иммунный комплекс, который обладает способностью светиться в ультрафиолетовых лучах при просмотре мазка в люминесцентном микроскопе.

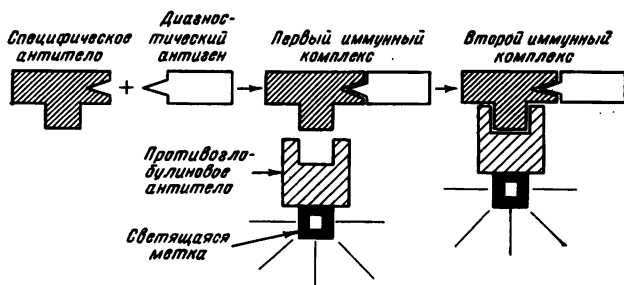


Рис. 34. Принцип реакции непрямой иммунофлуоресценции

Постановка серологических реакций для обнаружения антител включает следующие основные этапы:

I. Получение испытуемых сывороток.

II. Обработка сывороток в зависимости от вида серологической реакции и необходимости хранения или транспортировки исследуемого материала.

III. Приготовление разведений сывороток, приготовление и внесение диагностического антигена, смешивание сывороток с антигеном и инкубация смеси.

IV. Учет результатов реакции и оценка полученных данных.

I. Получение сывороток. Для получения сыворотки у рыб берут кровь в соответствии с методиками, приведенными в занятии 6. После внесения крови в пробирки их закрывают ватно-марлевыми пробками или ватными тампонами и оставляют для свертывания на 2 ч при комнатной температуре. Затем с помощью стеклянной палочки или запаянного капилляра осторожно отделяют сгусток крови от стенок пробирки, которые снова закрывают и помещают при 6°C на 18—20 ч. На следующий день пробы центрифугируют 5 мин при 3000—5000 об/мин и сыворотку отсасывают пастеровской пипеткой в чистую пробирку. Если в сыворотку попадают клетки крови, то центрифугирование повторяют. При необходимости быстрого получения сыворотки кровь после свертывания сразу центрифугируют. Для серологических исследований можно использовать также плазму крови.

II. Обработка сывороток. Полученную сыворотку подвергают различным воздействиям в зависимости от характера серологической реакции. Перед проведением реакций пробирки с сыворот-

ками прогревают в водяной бане в течение 30 мин при 55°C. Следует учитывать, что после размораживания хранившейся сыворотки она делится на фракции и нередко выпадает осадок. Поэтому размороженные сыворотки необходимо перемешать и отцентрифугировать.

При определении некоторых видов антител требуются более сложные методы обработки испытуемых материалов. Так, перед проведением реакции пассивной гемагглютинации сыворотки преимущественно обрабатывают эритроцитами для извлечения из них естественных противозитроцитарных антител, которые могут исказить результат реакции (занятие 11).

Наиболее распространенный способ хранения сывороток в лабораторных условиях — охлаждение материала до 6, 4°C. Если материал должен храниться свыше 3—4 дней, его лучше заморозить. Весьма хорошим, но технически более сложным способом является сушка сывороток в специальных аппаратах, поэтому такой обработке подвергают особо ценный материал, например диагностические сыворотки.

Перевозить сыворотки следует в широкогорлых термосах или сумках-холодильниках. Вначале на дно внутренней камеры термоса кладут слой ваты или марли, сверху насыпают слой льда и на него ставят стакан из синтетического материала, в котором находятся небольшие закрытые резиновыми пробками пробирки (синтетические или Уленгута) с сыворотками. Пространство между стаканом и стенкой термоса заполняют льдом и термос закрывают. Через 8—10 ч необходимо слить воду и заполнить термос новой порцией льда. Для предотвращения бактериального загрязнения к сыворотке добавляют примерно до 2%-ной концентрации борную кислоту (порошка кислоты на кончике скальпеля на 1 мл сыворотки) или до 0,05%-ной концентрации карболовую кислоту (1 капля 5%-ного раствора на 1 мл сыворотки). Весьма надежно сохраняет свойства сывороток транспортировка в жидком азоте. С этой целью используют специальную аппаратуру, применяемую для перевозки спермы животных на станциях искусственного осеменения.

III. Приготовление разведений сывороток. При проведении количественных серологических реакций необходимо приготовить в ряде лунок или пробирок убывающие количества испытуемого материала, т. е. ряд его последовательных (серийных) разведений. Для разведения антигенов и антител готовят изотонический (0,85%-ный) раствор хлористого натрия, добавляют к нему фосфатный буфер для установления определенной величины рН и получают забуференный изотонический раствор (ЗИР) (см. приложение 7).

Существует два основных способа серийного разведения: метод переноса и метод мерного внесения разводимого материала. При первом способе материал разводят в макропанелях или пробирках. Для этого в ряд лунок вносят определенное количество растворителя в соответствии с необходимой исходной концентра-

Соотношение количества титруемого материала и растворителя в первой лунке (пробирке) при некоторых начальных разведениях сыворотки

Ингредиент, мл	Степень разведения сыворотки в первой лунке (пробирке)				
	1 : 2	1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 50
Сыворотка	0,5	0,2	0,1	0,05	0,02
ЗИР	0,5	0,8	0,9	0,95	0,98

цией материала, общим объемом смеси ингредиентов и кратностью разведения. Затем в первую лунку вносят определенное количество сыворотки, содержимое лунки перемешивают и определенное количество смеси переносят во вторую лунку. Содержимое второй лунки после этого перемешивают и часть смеси вносят в третью лунку и т. д.

Соотношение количества титруемого материала и растворителя в первой лунке или пробирке при наиболее часто применяемых начальных разведениях дано в табл. 2.

При двукратном разведении сыворотки с начальным разведением 1:2 смешивают в первой лунке 0,5 мл сыворотки с 0,5 мл ЗИР, а затем 0,5 мл смеси переносят во вторую лунку (рис. 35). Содержимое второй лунки перемешивают и 0,5 мл переносят в третью лунку и т. д. Получают ряд разведений материала в объеме 0,5 мл. Так как в первой лунке сыворотка была разведена 1:2, то ряд разведений будет следующим: 1:2, 1:4, 1:8 и т. д.

Широко распространена постановка реакций в микропанелях с объемом лунки 0,2—0,3 мл. Материал при этом разводят непосредственно в панелях с помощью специальных приспособлений, имеющих в приборах для серологических исследований. При отсутствии этих приспособлений сыворотку следует предварительно развести в макропанелях. Поскольку материал титруют, как правило, одновременно в нескольких реакциях, то его следует разводить в количестве, достаточном для постановки всех реакций. Затем разведенную сыворотку вносят, начиная с последней лунки макропанели, содержащей наибольшее разведение материала, в соответствующие лунки панелей, в которых проводят реакцию.

Весьма удобен метод мерного внесе-

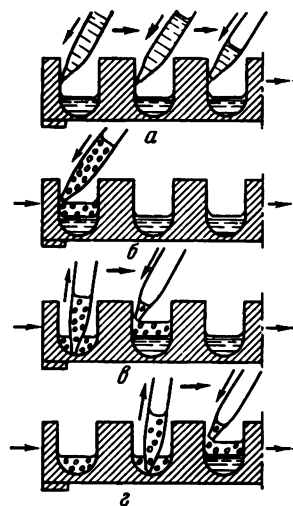


Рис. 35. Схема серийного разведения сывороток:

а — внесение растворителя в лунку; б — внесение сыворотки в первую лунку и смешивание в ней ингредиентов; в — перенос части содержимого первой лунки во вторую и смешивание в ней ингредиентов; г — перенос части содержимого второй лунки в третью и смешивание в ней ингредиентов

ния материала, особенно при коротких рядах титрования, содержащих не более 4 разведений (табл. 3). Достоинством этого метода является возможность внесения материала в микропанели без предварительного его разведения.

Таблица 3

Разведение сывороток методом мерного внесения материала (в объеме 0,5 мл)

Ингредиент и показатель	Номера лунок				
	1	2	3	4	5 (контроль)
Испытуемая сыворотка, мл	0,2	0,1	0,05	0,02	—
ЗИР, мл	0,3	0,4	0,45	0,48	0,5
Общий объем разведенной сыворотки, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	—
Конечное разведение сыворотки	1:2,5	1:5	1:10	1:25	—

Следующими этапами проведения реакции являются внесение антигена, смешивание ингредиентов в лунках и инкубирование панелей определенное время в необходимых температурных условиях. Описание этих этапов при конкретных реакциях дается в соответствующих занятиях.

IV. Учет результатов реакции и оценка полученных данных. После инкубации проводят учет реакции и оценивают полученные результаты в соответствии с методиками, используемыми при постановке конкретных реакций.

При трактовке результатов реакций необходимо учитывать ряд общих положений. Прежде всего следует исходить из данных эпизоотологического обследования хозяйств, клинической картины заболевания и данных по обнаружению возбудителя. Эти сведения, лежащие в основе диагностики, являются определяющими при принятии решения о выборе антигенов для поиска антител.

При оценке положительного результата серологического исследования необходимо помнить, что в сыворотке рыб могут быть обнаружены в небольшом количестве естественные (фоновые) антитела к бактериальным и другим антигенам. Поэтому для повышения достоверности исследования желательно проводить определение антител в течение заболевания несколько раз: в начальный период и затем через 2—3 нед и позже. При развитии заболевания количество приобретенных антител должно увеличиться не менее чем в 4 раза. Однако повышение содержания антител к возбудителю может наступить при изменении условий обитания рыб, улучшении кормления и т. д. Для исключения влияния экологических факторов проводят определение каких-либо естественных антител (например, к эритроцитам животных) или неспецифических гуморальных факторов иммунитета (например, лизоцима). При повыше-

нии уровня антител к предполагаемому возбудителю за счет общей стимуляции иммунитета наблюдают увеличение и других гуморальных факторов.

Отсутствие нарастания антител свидетельствует об отсутствии специфического иммунологического ответа организма рыб на антигены возбудителя. Получение отрицательного ответа может быть в двух случаях: либо отсутствовало действие возбудителя на организм рыбы, либо организм рыбы не способен ответить образованием антител на действие антигенов возбудителя (выращивание при температурах ниже оптимальных, голодание и т. д.). В каждом конкретном случае ихтиопатолог должен вдумчиво и критически оценивать полученные результаты, исходя из приведенных выше основных соображений.

#### Контрольные вопросы [15, 27, 34]

1. Дайте определение серологического исследования.
2. Назовите основные группы серологических реакций.
3. Каковы основные этапы проведения реакций?
4. Какими способами получают сыворотку крови?
5. Как хранить и транспортировать сыворотки?
6. Назовите способы разведения сывороток.

### Занятие 9. Реакция агглютинации бактерий

**Содержание.** Овладение методиками постановки развернутой осадочной реакции агглютинации бактерий и пластинчатой реакции.

**Материальное обеспечение.** Иммунная сыворотка к бактерии *Aeromonas punctata*, диагностикум из *A. punctata*, к которой приготовлена иммунная сыворотка, макропанели, микропанели (с лунками со сферическим дном), микропипетки на 0,1 и 0,2 мл или дозаторы, термостат на 37°C, шприцы на 2—5 мл, микрокомпрессор или многоканальный смеситель с нагнетающим насосом, изотонический раствор хлористого натрия с pH 7,17 (ЗИР).

**Организация и проведение работы.** В крови рыб можно обнаружить различные естественные и приобретенные антитела, в том числе и антитела, которые вызывают слипание бактериальных клеток, содержащих соответствующий антиген (агглютиноген) (рис. 36). Соединение бактерий приводит к образованию комочков

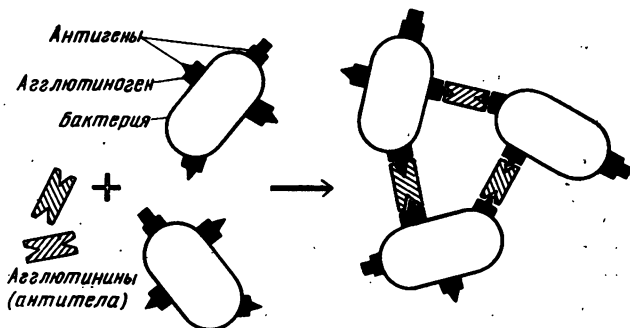


Рис. 36. Принцип реакции агглютинации бактерий.

(агглютинатов), оседающих на дно лунки или пробирки, и поэтому этот процесс был назван агглютинацией, а соответствующие анти-тела — агглютининами. Было показано, что при агглютинации бактерий можно наблюдать образование либо мелкозернистого осадка за счет соединения тел бактерий, либо крупных, легко разбиваемых хлопьев благодаря соединению жгутиков бактерий. Крупнохлопчатую агглютинацию называют обычно Н-агглютинацией, так как она обусловлена наличием у бактерий жгутикового Н-антигена. Мелкозернистую агглютинацию называют О-агглютинацией, так как она определяется наличием О-антигена, находящегося на поверхности тела бактерий.

Благодаря простоте постановки реакция агглютинации бактерий широко распространена в диагностике бактериальных болезней рыб.

Порядок проведения работы следующий.

Существуют различные модификации реакции агглютинации бактерий в зависимости от целей исследования, длительности проведения реакции, способа учета результатов и т. д. В лабораторной практике используют в основном два способа постановки реакции: развернутую (объемную) реакцию и пластинчатую (ускоренную, ориентировочную) реакцию.

Для проведения обоих видов реакций используют заранее приготовленные культуры микроорганизмов, из которых готовят диагностикумы.

1. Приготовление бактериальных диагностикумов. В настоящее время в ихтиопатологии не имеется диагностикумов, выпускаемых промышленным путем. Поэтому их готовят непосредственно в научно-исследовательских и производственных лабораториях. Главным условием правильного приготовления диагностикума для определения антител является подбор штаммов бактерий с точной характеристикой их свойств, в том числе антигенного состава. Во время вспышки заболевания следует использовать диагностикумы из выделенных ранее сходных возбудителей, а также готовить диагностикум из культур, выделяемых при данной вспышке. Для приготовления диагностикума культуру выращивают на мясопептонном агаре (см. занятие 14), предварительно убедившись, что она образует гладкие, блестящие, с ровными краями колонии S-формы (от англ. слова smooth — гладкий). Выросшую культуру смывают с агара ЗИР; смыв должен иметь вид однородной взвеси. Если к данному штамму бактерий имеется гипериммунная диагностическая сыворотка, как, например, типовые сыворотки к *A. punctata*, то диагностикум должен агглютинироваться такой диагностической сывороткой до титра сыворотки. В качестве диагностикума могут быть использованы как живые, так и убитые микроорганизмы. Наиболее удобны диагностикумы из убитых бактерий. Их готовят путем добавления к трижды отмытому осадку бактерий различных веществ, например 0,5% фенола или 0,3% формалина, разведенных на ЗИР. Затем взвесь

бактерий в герметически закрытом флаконе выдерживают в течение 1 сут при комнатной температуре, высевают на питательные среды для проверки полноты потери жизнеспособности и хранят при 6°C.

Существуют и специальные методы обработки бактерий для приготовления диагностикумов определенного антигенного состава. Например, для разрушения Н-антигена применяют прогрев культуры или обработку ее спиртом.

Перед постановкой реакции взвесь бактерий следует трижды отмыть ЗИР (рН 7,17) путем центрифугирования и развести до концентрации 40—50 МЕ (МЕ — международная единица мутности, соответствующая 85 млн./мл микробов кишечной группы). Наиболее распространен в лабораториях визуальный способ оценки концентрации взвеси бактерий, который основан на том, что количество бактериальных клеток во взвеси прямо пропорционально ее мутности. Стандарт мутности, выпускаемый Государственным НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича, состоит из трех пробирок с разным количеством частиц стекла величиной 0,3—0,5 мкм. Степень мутности взвесей частиц в пробирках соответствует 5; 10 и 20 МЕ. При приготовлении диагностикума мутностью 40 МЕ вначале к отмытому осадку бактерий добавляют небольшое количество ЗИР и гомогенизируют осадок в растворителе (взвесь бактерий должна иметь вид молока). Затем в пустую пробирку, имеющуюся в наборе, вносят 0,2 мл исходной взвеси бактерий и порциями мерно добавляют ЗИР. После каждого внесения ЗИР содержимое пробирки тщательно перемешивают и сравнивают со стандартом на 20 МЕ. После этого просматривают рядом расположенные пробирки в лучах рассеянного (отраженного) света, прижав к задней стороне пробирок специальный шрифт. Если степень мутности взвесей в пробирках совпадает, то шрифт выглядит одинаково четко.

Предположим, что в пробирку с исходной взвесью бактерий потребовалось внести 0,8 мл ЗИР, чтобы мутность взвеси стала одинаковой со стандартом 20 МЕ. Общее количество взвеси стало 0,2 мл исходной + 0,8 мл ЗИР = 1 мл, поэтому кратность разведения исходной взвеси равна 1 мл общего объема: 0,2 мл исходной взвеси = 5. Следовательно, мутность исходной взвеси составляет 20 МЕ · 5 = 100 МЕ. Поскольку поставлена задача приготовить взвесь мутностью 40 МЕ, необходимо вычислить, во сколько раз надо развести исходную взвесь с мутностью 100 МЕ, чтобы получить требуемую концентрацию: 100 МЕ : 40 МЕ = 2,5. Отсюда следует, что исходную взвесь необходимо развести в 2,5 раза. Если необходимо приготовить 10 мл диагностикума, то доля исходной взвеси в данном объеме диагностикума составит: 10 мл : 2,5 = 4 мл.

Таким образом, для получения 10 мл взвеси бактерий мутностью 40 МЕ необходимо к 4 мл исходной взвеси бактерий добавить 6 мл ЗИР.

Для улучшения учета реакции агглютинации диагностикум бактерии *A. punctata* окрашивают. Для этого к 1 мл диагностикума добавляют 1 каплю карболового фуксина Циля (см. приложение 10), смесь встряхивают и оставляют на 1—2 ч при комнатной температуре. Затем взвесь окрашенных бактерий центрифугируют при 5—6 тыс. об/мин, надосадок отсасывают, осадок бактерий го-

могенизируют в новой порции ЗИР и взвесь вновь центрифугируют. Так отмывают бактерии до тех пор, пока надосадочная жидкость не перестанет содержать следы краски. Бактерии можно окрасить также с помощью 1%-ного спиртового раствора бриллиантового зеленого, добавляя к 0,9 мл диагностикума 0,1 мл краски. Методика дальнейшей обработки бактерий такая же, как при окраске фуксином Циля: Окрашенные бактерии разводят ЗИР до необходимой концентрации.

II. Иммунная сыворотка. Для выявления антигенов бактерий необходимы активные сыворотки, содержащие антитела— агглютинины— к данному возбудителю. В качестве продуцентов иммунных сывороток используют кроликов и рыб. В настоящее время отсутствуют общепринятые схемы иммунизации возбудителями болезней рыб для получения сывороток с высоким уровнем антител: В лабораторных условиях вакцину из убитых фенолом или формалином бактерий (см. приготовление диагностикума) вводят двух- или трехлеткам карпа и лососевых. Непосредственно перед инъекцией готовят смесь вакцины мутностью 40—60 МЕ со стимулятором, например неполным адьювантом Фрейнда (смесь 30 г обезжиренного ланолина+90 г вазелинового масла, стерилизация автоклавированием). Для этого вначале пробирку с адьювантом помещают в водяную баню, после полного разжижения адьюванта его остужают до 45°C и определенное количество наливают в подогретую ступку. Затем к адьюванту приливают равное количество вакцины и смесь тщательно гомогенизируют, набирая и выпуская смесь из шприца с иглой. Правильно приготовленная смесь имеет вид молока и не расслаивается на две фракции. Сразу после гомогенизации смесь вводят внутривентрально по 0,5 мл или 1 мл двух- или трехлеткам. Через 10—15 дней проводят пробное взятие крови и определяют титр антител. Затем через 5—7 дней проводят повторное определение уровня антител и, если титр существенно не изменился и достаточно высок, животных обескровливают и получают сыворотку, которую хранят небольшими порциями в замороженном виде или высушивают (лиофилизация). Если титр низок, то через 5—7 дней берут пробу крови. Повысить уровень антител можно с помощью повторного внутримышечного введения антигена. Иммунизированных рыб необходимо содержать при благоприятном гидрохимическом и температурном режимах и полноценном питании.

Иммунизацию кроликов можно проводить по схемам, подробно описанным в руководствах по микробиологии и иммунологии. Одним из наиболее простых способов является подкожное введение смеси вакцины и адьюванта по 0,5—1,0 мл в 3—4 местах на боковой стороне тела. Взятие проб сыворотки проводят по схеме, указанной выше для рыб.

Для проведения реакций необходимо подготовить посуду, пипетки и другие вспомогательные приспособления. Использованные панели обрабатывают струей воды, чтобы очистить стенки лунок, потом, не удаляя воду из лунок, протирают лунку мыльным ват-

ным тампоном, промывают лунки в струе водопроводной воды и несколько раз ополаскивают дистиллированной водой. Затем встряхиванием удаляют оставшуюся воду из лунок и сушат панели при комнатной температуре лунками вверх, накрыв сверху фильтровальной бумагой. Посуду и пипетки обрабатывают так же, как при бактериологических исследованиях (занятие 13). Шприц изнутри протирают мыльным ершиком, надевают иглу, промывают по несколько раз теплой водопроводной (выпуская воду через иглу), а затем дистиллированной водой. Затем иглу снимают, шприц и иглы высушивают.

III. Развернутая (объемная) осадочная реакция агглютинации бактерий. Развернутая реакция агглютинации ставится в нескольких модификациях как в пробирках (занятие 19), так и в панелях. Одной из наиболее простых модификаций является осадочная реакция агглютинации бактерий (ОРАБ). Ее постановка в панелях методом серийных разведений складывается из следующих этапов:

приготовление разведений испытуемой сыворотки и внесение их в лунки микропанели;

внесение бактериального диагностикума в разведенную сыворотку и контроль антигена;

смешивание ингредиентов в лунках и инкубация панелей;

учет результатов реакции.








Преподаватель демонстрирует основные этапы приготовления диагностикума из бактерий *A. punctata*. Учащиеся получают из осадка бактерий диагностикумы мутностью 40 МЕ и используют готовые иммунные сыворотки (прогретые, отцентрифугированные), содержащие антитела к данной бактерии.

Разведение сывороток проводят по методике, описанной в предыдущем занятии. Затем разведенные сыворотки вносят в лунки микропанели. Схема постановки реакции дана в табл. 4. Вначале размеченной на 0,06 мл микропипеткой вносят 0,06 мл ЗИР в лунку № 7. Затем 0,06 мл материала из последней лунки макропанели, в которой сыворотка разведена 1:1280, переносят в лунку № 6 микропанели. Пипетку полностью освобождают от жидкости, протирают кончик, набирают материал из лунки с разведением 1:640 и вносят его в лунку № 5 микропанели. После этого вносят материал из лунки с разведением 1:320 в лунку № 4 и т. д. Затем во все лунки микропипеткой добавляют по 0,02 мл диагностикума мутностью 40 МЕ. Взвесь бактерий удобно вносить капельно из шприца. Предварительно подбирают иглу такого диаметра, чтобы свободно падающая капля имела объем около 0,02 мл. Содержимое лунок после внесения диагностикума тщательно перемешивают, закрывают панели крышкой для уменьшения испарения жидкости из лунок и помещают панели на 4 ч в термостат при 37°C.

Для смешивания ингредиентов реакции в лунке применяют несколько способов. Если готовят реакцию не более чем на 10—20 рядов, можно использовать воздушный смеситель, соединив тонко оттянутую пастеровскую пипетку с микрокомпрессором. При мас-

Таблица 4

## Схема постановки осадочной реакции агглютинации бактерий (ОРАБ)

Этап работы	Номера лунок микропанели						
	1	2	3	4	5	6	7
Разведение исследуемой сыворотки в макропанели (степень разведения)	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	Контроль антигена
Внесение разведенной сыворотки в лунки микропанели, мл	↓	↓	↓	↓	↓	↓	—
Внесение ЗИР в лунку № 7, мл	—	—	—	—	—	—	0,06
Добавление диагностикума мутностью 40 МЕ, мл	По 0,02 мл в каждую лунку						
Перемешивание содержимого лунок, инкубация в течение 4 ч при 37° С, вновь перемешивание и затем экспозиция при комнатной температуре в течение 18—20 ч	Все лунки						
Характер осадка бактерий на дне лунок							
Учет результатов реакции по 4-крестовой системе	++++	++++	+++	++	+	±	—
	(++)	(++)					

совых исследованиях используют многоканальный смеситель, предложенный А. А. Вихманом и А. И. Фокиным (рис. 37). После выдерживания в термостате содержимое лунок вновь перемешивают и панели оставляют в течение 18—20 ч при комнатной температуре, оберегая их от встряхивания.

Учет полученных результатов проводят после окончания срока инкубации, оценивая степень агглютинации бактерий в испытанных разведениях сыворотки и в контроле. В табл. 4 показана зависимость характера осадка бактерий от степени агглютинации, выраженной в крестах (знак +). Рассмотрев характер осадка во всех лунках и убедившись в отрицательном результате контроля бактерий, находят титр сыворотки. Титром материала называют то наи-

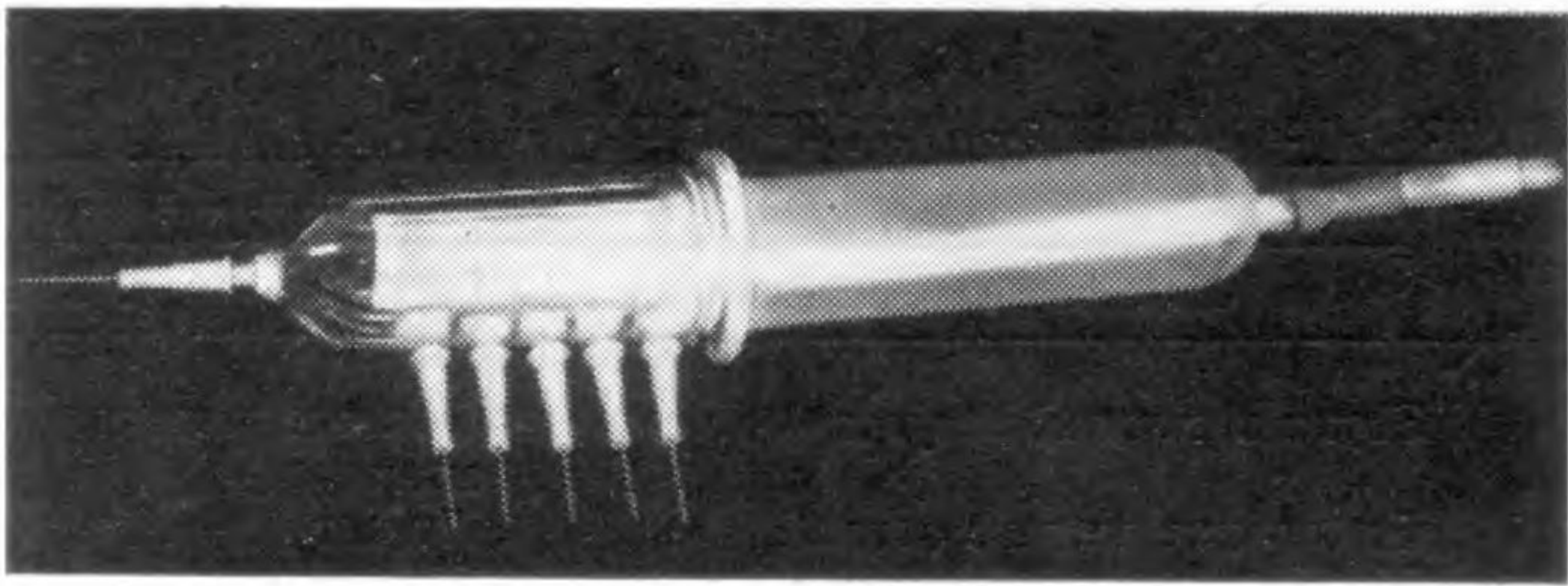


Рис. 37. Многоканальный смеситель

большее его разведение, которое дает реакцию не менее чем на 2 креста. По данным табл. 4, титр сыворотки равен 1 : 320. Для удобства обычно пользуются величиной «обратного титра», которая для разведения 1 : 320 равна 320. Форма протокола для учета ОРАБ дана в приложении 8.

IV. Пластинчатая реакция агглютинации бактерий. Для быстрого выявления антигенов бактерий и противобактериальных антител применяют пластинчатую реакцию агглютинации бактерий (ПРАБ). Она проводится на поверхности горизонтальной пластинки из стекла или пластика. Перед постановкой реакции следует убедиться в том, что сыворотка совершенно прозрачна и не содержит хлопьев, а культура бактерий не дает агглютинации при гомогенизации в капле ЗИР.

При работе с живыми культурами удобно пользоваться чашками Петри. Дно чашки делят восковым карандашом на квадраты. На один квадрат наносят крупную каплю сыворотки, на другой — такую же по объему каплю ЗИР. Затем бактериологической петлей вносят в первую каплю 1 петлю суспензии бактерий концентрацией примерно 50 МЕ и содержимое капли тщательно перемешивают. Петлю прожигают, дают остыть и таким же способом вносят бактерии во вторую каплю. Чашку слегка покачивают в течение 2—3 мин. Через 5 мин проводят учет реакции. Если бактерии не окрашены, то реакцию учитывают на темном фоне, если окрашены — на белом. При агглютинации бактерий уже через 30—60 с начинают образовываться хлопья, а жидкость просветляется. В контроле до конца учета реакции жидкость должна оставаться равномерно мутной, что свидетельствует об отсутствии спонтанной агглютинации бактериальной культуры. Оценку реакции проводят по 4-крестовой системе по признакам, изложенным в табл. 5.

Для определения антител испытывают либо неразведенные сыворотки (качественная проба), либо несколько разведений сыворотки с целью ориентировочного суждения о титре антител. При типировании возбудителей заболеваний высокоактивные неочищенные (неадсорбированные) диагностические сыворотки применяют в разведении 1 : 5—1 : 10, а адсорбированные (т. е. освобожденные от других антител) сыворотки — в неразведенном виде.

## Учет пластинчатой реакции агглютинации бактерий

Оценка реакции (в крестах)	Визуальная характеристика агглютинации в капле	
	Образование агглютинатов	Мутность
—	Зерна и хлопья отсутствуют	Выраженная (такая же, как в контроле)
+	Единичные мелкие зерна	То же
++	Небольшое количество мелких зерен	Отчетливая, но несколько меньшая по сравнению с контролем
+++	Большое количество мелких хлопьев, единичные крупные хлопья	Незначительная
++++	Много крупных и мелких хлопьев	Отсутствует (полное просветление жидкости)

## Контрольные вопросы [27, 34]

1. В чем заключается сущность агглютинации бактерий?
2. Как называют антитела, вызывающие агглютинацию, и соответствующие антигены?
3. Опишите способы приготовления бактериальных диагностикумов.
4. Как приготовить взвесь бактерий необходимой концентрации?
5. Каковы основные этапы и схема постановки ОРАБ?
6. Каким образом проводят учет ОРАБ?
7. Как ставят и учитывают пластинчатую реакцию агглютинации бактерий?

## Занятие 10. Реакция преципитации

**Содержание.** Овладение методикой постановки реакции диффузной преципитации в геле.

**Материальное обеспечение.** Растворимые антигены бактерии *A. punctata*, иммунная сыворотка к антигенам *A. punctata*, 1,5%-ный агар на изотоническом растворе хлористого натрия, 0,158 М фосфатный буфер (рН 7,17), изотонический раствор хлористого натрия, рН 7,17 (ЗИР), чашки Петри, фарфоровые ступки с пестиками, приспособления для вырезания лунок в агаре, пипетки на 1,2 и 10 мл, шприцы на 1—2 мл, горизонтальный столик, водяная баня, макропанели, вакуумный насос.

**Организация и проведение работы.** Реакция преципитации все больше применяется в иммунологии рыб. Современные способы проведения этой реакции связаны с использованием гелевой среды, в которой происходят взаимодействие растворимого антигена (преципитиногена) и соответствующих антител (преципитинов), образование нерастворимого комплекса антиген—антитело (преципитата) и выпадение его в осадок.

Существует несколько методов постановки реакции преципитации в геле. Широко распространен метод встречной диффузии по Оухтерлони — реакция диффузной преципитации (РДП), при которой антиген и антитела, помещенные в лунки в агаровом геле, радиально диффундируют в агаре и в месте встречи образуют беловатый, непрозрачный преципитат. Так как скорость диффузии антигенов обратно пропорциональна размерам их молекул, то разные антигены диффундируют в агаре с различной скоростью и

оказываются в момент встречи с соответствующими антителами в разных участках слоя геля. Поэтому образуются несколько линий преципитации, что позволяет судить об антигенном составе возбудителей и спектре антител в иммунных сыворотках. Образовавшийся специфический преципитат одного вида проницаем для антигенов и антител другого вида.

Порядок проведения работы следующий.

Реакция диффузной преципитации (РДП) применяется для изучения антигенного состава возбудителей болезней рыб, а также для обнаружения антигенов и антител в органах и тканях рыб. Постановка РДП для изучения антигенов бактерии *A. punctata* и антител к ним включает следующие этапы:

I. Получение растворимых антигенов из *A. punctata* I и II серотипов и приготовление типовых кроличьих иммунных сывороток.

II. Приготовление агарового геля, вырезание лунок и внесение в них антигенов и антител.

III. Инкубация агара с реагентами и учет полученных результатов.

Преподаватель демонстрирует получение растворимых антигенов из *A. punctata* и приготовление 1,5—2%-ного агара. Учащиеся используют необходимые материалы (расплавленный агар, выдерживаемый в водяной бане при температуре 50—55°C, раствор антигена и неразведенные прогретые иммунные сыворотки) и приступают к выполнению второго этапа реакции, начиная с приготовления слоя агара в чашках Петри.

I. Получение растворимых антигенов и иммунных сывороток. Растворимые антигены полисахаридной природы могут быть получены из *A. punctata* путем термической обработки бактерий. Для этого выращенную на плотной питательной среде культуру смывают ЗИР с поверхности агара, фильтруют через ватный фильтр для удаления частиц агара и трижды отмывают ЗИР осадок бактерий. Затем осадок разводят до концентрации 50—100 млрд./мл (взвесь должна иметь вид молока) и пробирки с бактериями помещают на 2 ч в кипящую водяную баню, периодически перемешивая содержимое пробирок. После этого пробирки охлаждают до комнатной температуры и взвесь бактерий центрифугируют для осаждения микробных тел. Полученный прозрачный надосадок, содержащий антиген, мерно отсасывают и охлаждают до температуры 6°C. Для концентрирования антигена к надосаду постепенно добавляют охлажденный до 6°C 96°-ный этиловый спирт из расчета 6 частей спирта на 1 часть надосадка, перемешивая смесь стеклянной палочкой. После добавления спирта емкость закрывают и помещают не менее чем на 4—6 ч при 6°C. Затем выпавший осадок антигена отделяют центрифугированием, надосадок сливают и к осадку добавляют вновь этиловый спирт, осадок взмучивают стеклянной палочкой и полученную взвесь центрифугируют. Надосадок удаляют, к осадку под тягой добавляют серный эфир и гомогенизируют взвесь стеклянной палочкой. После

оседания частиц взвеси пипеткой с грушей осторожно отсасывают эфир и оставляют емкость с осадком под тягой до полного высыхания антигена. Высохший осадок соскабливают скальпелем в небольшую емкость, размельчают скальпелем до порошкообразного состояния и хранят при комнатной температуре.

В качестве иммунных сывороток используют сыворотки кроликов или рыб, иммунизированных убитыми культурами *A. punctata* I или II серотипа (см. занятие 9).

II. Приготовление агарового геля с лунками и внесение в них антигенов и антител. Для постановки реакции используют либо исходный продукт агар-агара, либо выпускаемые промышленностью очищенные препараты агара. При приготовлении геля из исходного агар-агара вначале очищают материал от нежелательных примесей. Сухой агар нарезают на максимально мелкие кусочки, замачивают в дистиллированной воде из расчета 20 г агара на 1 л воды и оставляют агар для набухания до следующего дня. Затем агар расплавляют на кипящей водяной бане или с помощью автоклавирования и добавляют, перемешивая агар, 10%-ный раствор  $\text{CaCl}_2$  из расчета 50 мл соли на 1 л раствора.

Выпавший осадок удаляют путем фильтрования горячего агара через стеклянную вату или через бумажный фильтр на воронке Бюхнера. Прозрачный агар разливают по кюветам слоем 1—2 см и после застывания нарезают на кусочки по 4—8 см<sup>3</sup>. Кусочки агара помещают в банку, затягивают марлей горловину банки и пропускают шланг, соединенный с водопроводной сетью, до дна банки. Агар промывают в течение 2—3 сут водой, а затем в 3—4 порциях дистиллированной воды в течение 2 сут. Кусочки агара переносят в колбу, заливают небольшим количеством дистиллированной воды (так, чтобы все кусочки были погружены в воду), расплавляют агар на водяной бане и смешивают с подогретым 8,5%-ным раствором  $\text{NaCl}$  из расчета 100 мл раствора соли на 900 мл агара. После перемешивания готовый агар разливают порциями по 50—100 мл, емкости закрывают и хранят агар при 6°C. Для стерилизации агара применяют либо автоклавирование, либо добавление дезинфицирующих средств: мертиолат до концентрации 1 : 10 000 или смесь пенициллина (1000 ед. мл) со стрептомицином (500 ед. мл).

При использовании готовых сухих препаратов агара готовят 1,5%-ный агар, добавляя к 1,5 г агарового порошка до 100 мл 0,85%-ный раствор  $\text{NaCl}$ . После набухания агара в течение 2 ч взвесь автоклавируют или расплавляют на водяной бане. Стерилизацию проводят так же, как указано выше.

Для приготовления тонкого слоя геля, в котором будет проводиться реакция, агар растапливают и затем остужают до 50—55°C. Теплой пипеткой на 10 мл вносят 27 мл агара в предварительно подогретую фарфоровую ступку и добавляют к нему 3 мл 0,15 М фосфатного буфера рН 7,17 (см. приложение 8). Содержимое ступки дважды перемешивают пестиком и вносят по 15 мл агара в две

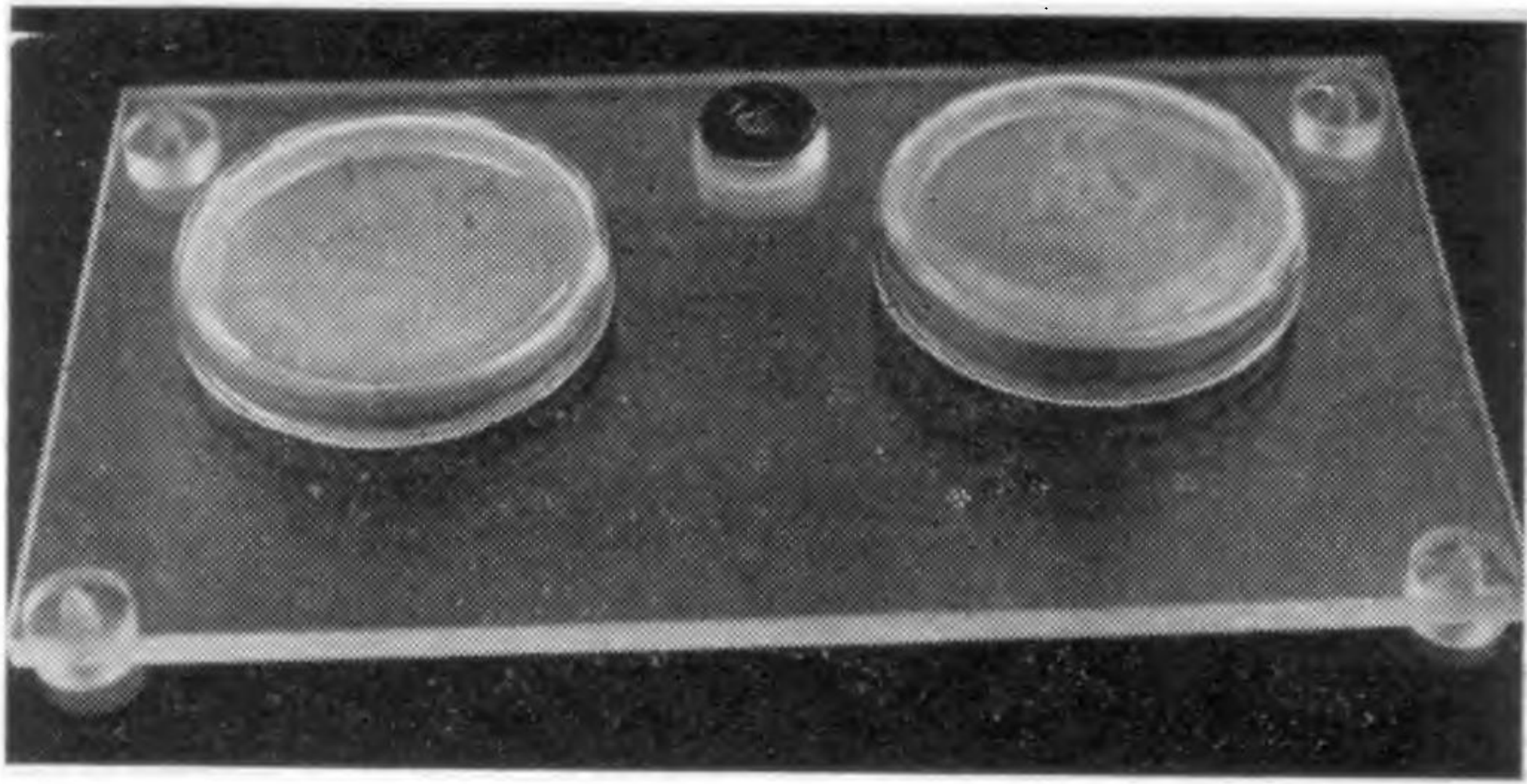


Рис. 38. Горизонтальный столик

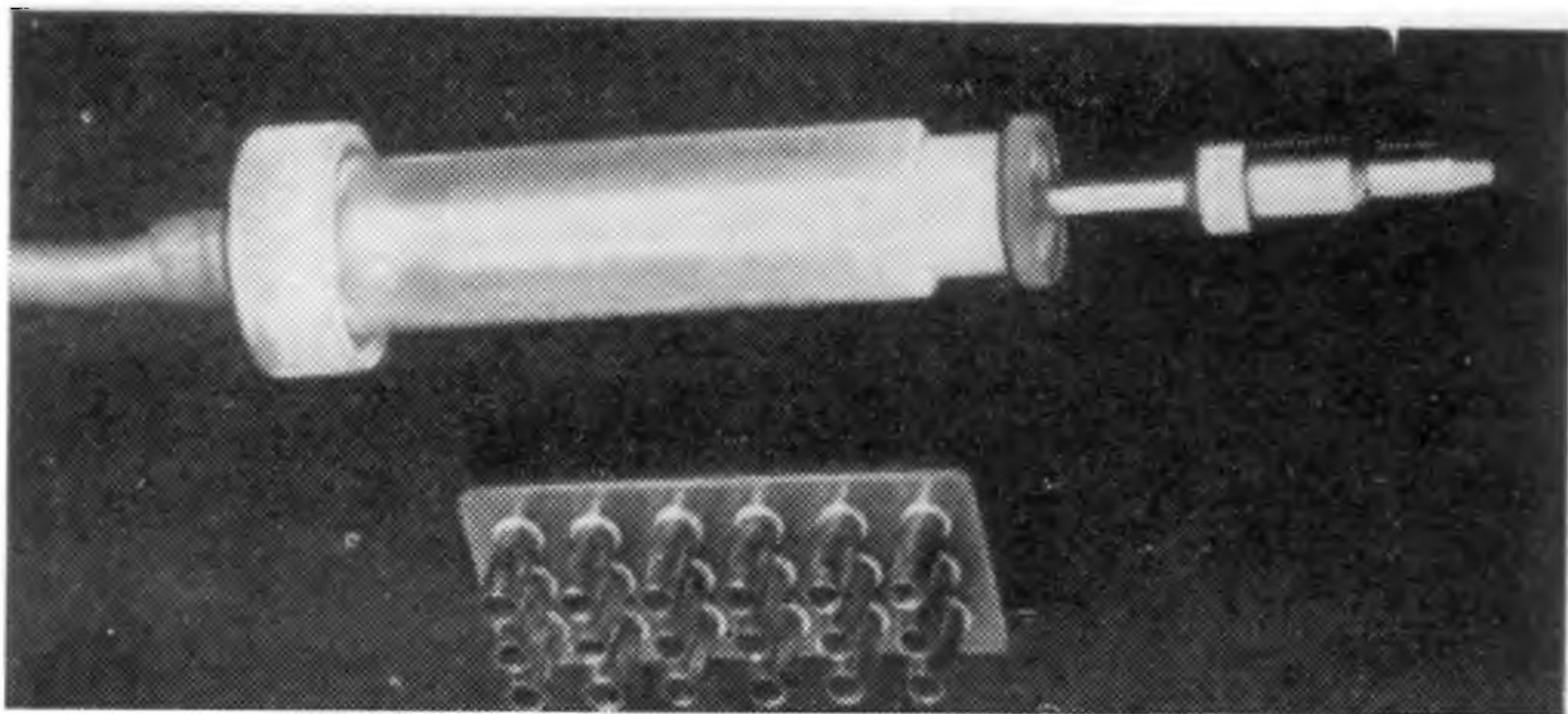


Рис. 39. Приспособления для вырезания лунок в агаре

стерильные чашки Петри диаметром 9—10 см, установленные горизонтально на специальном столике (рис. 38). Толщина слоя агара в чашках составляет примерно 3 мм.

После застывания агара вырезают лунки, в которые будут вносить антигены и иммунные сыворотки. Для этого используют приспособления, входящие в комплект устройства для проведения реакций в геле УПГ-1, или аналогичное приспособление, изготовленное на местах (рис. 39). Можно вырезать индивидуальные лунки, подкладывая под чашку с агаром трафарет, на котором обозначены места расположения лунок. Имеются также штампы для вырезания серии лунок. Агар из лунок удаляют стерильной пастеровской пипеткой, соединенной с вакуумным насосом. Характер расположения лунок варьирует и определяется задачами исследования. Для определения активности антигенов и антител обычно используют лунки, расположенные кольцевидно вокруг центральной лунки. Расстояние между краями стенок центральной и периферических лунок должно составлять 3 мм.

Поскольку образование преципитата определяется количественным соотношением участвующих в реакции антигенов и антител, проводят развернутое титрование, при котором взаимодействуют

разные количества ингредиентов. С этой целью в агаре вырезают несколько комплектов лунок. В центральные лунки каждого комплекта вносят определенную дозу антигена, а в периферические — разведения сыворотки. По нашим данным, для *A. punctata* I серотипа (штамм К6 31) целесообразно испытывать три дозы антигена, составляющие 2,1 и 0,5 мг/мл. Раствор антигена готовят путем тщательного растирания стеклянной палочкой сухого антигена в

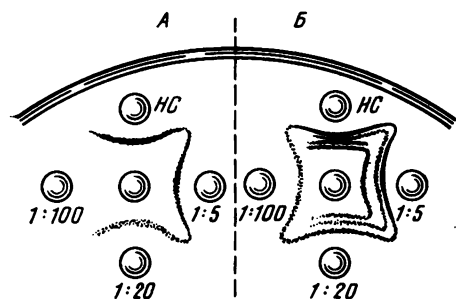


Рис. 40. Взаимодействие антигенов бактерии *Aeromonas punctata* I и II серотипа с иммунными сыворотками в реакции диффузной преципитации:

реакция с антигенами бактерии А — I серотипа; Б — II серотипа; в центральных лунках антигены: вариант А — штамма К631 в дозе 2 мг/мл, вариант Б — штамма КЛ7 в дозе 1 мг/мл; в периферических лунках соответствующая типовая сыворотка: неразведенная — НС; разведения сыворотки: 1 : 5; 1 : 20; 1 : 100

поверхностью агара. При этом лунка «просветляется» и сливается с фоном агарового геля. Избыток материала растекается по агару и может исказить результат реакции.

III. Инкубация агара с реагентами и учет полученных результатов. Чашки Петри с внесенными в лунки антигенами и иммунными сыворотками выдерживают в течение не менее 2 сут во влажной камере, используя для этого эксикатор с небольшим количеством воды. После инкубации слой геля просматривают в лучах отраженного света с помощью лупы или МБС. Отмечают наличие и характер полос преципитации между лунками с антигеном и антителами. При взаимодействии иммунной сыворотки I типа с антигеном штамма К631 наблюдали образование одной полосы преципитации, а при взаимодействии сыворотки II типа с антигеном штамма КЛ7 — несколько полос (рис. 40).

По нашим данным, максимальная выраженность преципитации отмечалась при использовании антигена штамма К631 в концентрации 2 мг/мл и антигена штамма КЛ7 в концентрации 1 мг/мл, которые следует считать оптимальными по отношению к типовым иммунным сывороткам. В дальнейшем проводят более точное тит-

определенном количестве ЗИР (рН 7,17). Антиген II типа (штамм КЛ7) вносят в лунки в дозах 1; 0,5 и 0,25 мг/мл. Иммунные сыворотки разводят ЗИР (рН 7,17) и вносят в периферические лунки в следующих концентрациях: неразведенная сыворотка 1 : 5, 1 : 20 и 1 : 100 и т. д.

Большое значение для правильной постановки реакции имеет качество внесения в лунки ингредиентов. Обычно для этого используют только оттянутые пастеровские пипетки. Удобно вносить материал с помощью шприцев на 1—2 мл, на которые надевают тупо заточенную иглу. Материал должен быть внесен в лунку в таком количестве, чтобы уровень жидкости в лунке сравнялся с

рование сывороток с целью определения их титра. В центральную лунку вносят антигены в указанной концентрации, а в шесть периферических лунок — последовательные разведения сывороток. Определяют то наибольшее разведение сыворотки, при котором наблюдается четкая полоса преципитации между лунками с антигеном и сывороткой. Это разведение и является титром сыворотки. Для регистрации результатов реакции зарисовывают или фотографируют линии преципитации. Усиления контрастности преципитата на фоне прозрачного агара достигают путем окрашивания преципитата различными способами, изложенными в руководствах по иммунологическим методам исследования.

Реакция преципитации в геле позволяет изучить степень сходства между различными антигенами и выявить состав антител в иммунной сыворотке. Данный вариант РДП получил название реакции идентичности. В зависимости от степени родства антигенов возможны три исхода реакции: полная неидентичность, частичная идентичность и полная идентичность антигенов. Характер расположения полос преципитации при сравнении антигенов представлен на рис. 41.

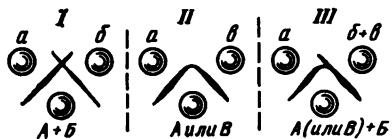


Рис. 41. Степень родства антигенов в реакции идентичности:  
 А, Б, В — антигены; а, б, в — антигены; I — полная неидентичность а и б; II — полная идентичность а и в; III — частичная идентичность а и б+в

### Контрольные вопросы [27, 34]

1. Что такое иммунный преципитат и как он образуется?
2. Каким образом готовят тонкий слой агара, в котором проводят РДП?
3. Как располагают лунки в агаре при постановке РДП и какие ингредиенты вносят в них?
4. Как определить титр иммунной сыворотки в РДП?
5. Как проводят реакцию идентичности и что она может выявить?

### З а н я т и е 11. Реакция иммунной гемагглютинации

**Содержание.** Овладение методиками постановки прямой и пассивной реакции гемагглютинации.

**Материальное обеспечение.** Растворимый антиген бактерии *A. punctata*, иммунная сыворотка к *A. punctata*, нормальные эритроциты кролика, sensibilizированные антигеном эритроциты кролика, изотонический раствор хлористого натрия (рН 7,17) (ЗИР), холодильник, макро- и микропанели, микропипетки на 0,1 и 0,2 мл или дозаторы, пипетки на 2 и 5 мл, микрокомпрессор или многоканальный смеситель с нагнетающим насосом.

**Организация и проведение работы.** Реакция иммунной гемагглютинации является высокочувствительным и специфичным методом определения антител и антигенов. Гемагглютинация — это склеивание эритроцитов, приводящее к образованию комочков, видимых невооруженным глазом. Склеившиеся эритроциты, оседая на дно лунки или пробирки, образуют более широкую зону осадка: по сравнению с нормальными эритроцитами. Природа агентов, вызывающих гемагглютинацию, различна. К ним относятся вирусы,

бактерии, некоторые вещества и т. д. Иммуная гемагглютинация возникает при взаимодействии антигена и антител, причем один из реагентов находится в растворе, другой — на поверхности эритроцита. Реакция прямой гемагглютинации (РГА) основана на способности антител (гемагглютининов) взаимодействовать с антигенами, находящимися на поверхности эритроцитов (рис. 42, А). Связываясь с антигенами на двух соседних эритроцитах, антитела образуют мостики между эритроцитами и вызывают их слипание. При реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) процесс соединения эритроцитов протекает в несколько этапов (рис. 42, Б). На

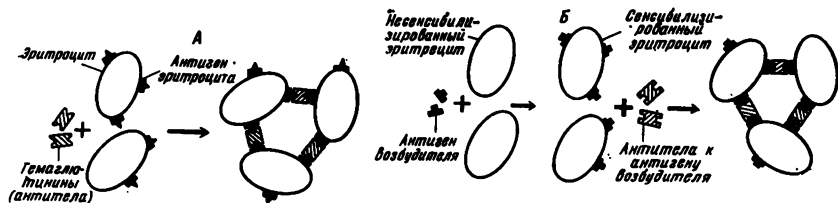


Рис. 42. Принципы прямой (А) и пассивной (Б) реакции иммунной гемагглютинации

первом этапе растворимый антиген взаимодействует с эритроцитами и сорбируется на их поверхности. Такие эритроциты называют сенсибилизированными. На втором этапе реакции к сенсибилизированным эритроцитам добавляют специфические (по отношению к сорбированному антигену) антитела, которые соединяются с антигеном, образуют мостики между эритроцитами и вызывают их слипание.

Как и другие специфические серологические реакции, гемагглютинация может быть использована для определения антител и антигенов. При реакции прямой гемагглютинации для определения антител используют эритроциты человека и некоторых животных. Если необходимо выявить антигены эритроцитов рыб, то пользуются иммунными сыворотками, содержащими антитела к определенным эритроцитарным антигенам. Для выявления в реакции пассивной гемагглютинации антител эритроциты сенсибилизируют антигенами известного возбудителя, а потом добавляют испытуемую сыворотку. При определении антигенного состава возбудителей эритроциты сенсибилизируют антигеном выделенного возбудителя и добавляют к ним диагностическую иммунную сыворотку, содержащую антитела к определенному возбудителю.

Порядок проведения работы следующий.

Преподаватель демонстрирует получение и подготовку эритроцитов. Учащиеся используют готовую взвесь эритроцитов и иммунные сыворотки и приступают к постановке реакций.

1. Реакция прямой гемагглютинации (РГА). Проведение этой реакции включает этапы: подготовка эритроцитов; разведение и внесение испытуемых сывороток в лунки панелей, до-

бавление эритроцитов и инкубирование смесей; учет реакции и оценка полученных данных.

**Подготовка эритроцитов.** Получение эритроцитов из крови кролика проводят несколькими способами.

Несколько миллилитров крови берут из ушной вены, проколов стенку сосуда концом пастеровской пипетки или инъекционной иглой. Большее количество крови получают при полном обескровливании животного. Далее кровь обрабатывают для отделения эритроцитов от других компонентов крови. При получении небольшого количества эритроцитов удобно пользоваться методом разведения, который заключается в том, что свежевзятую кровь вносят в десятикратный объем ЗИР, перемешивают и трижды центрифугируют в течение 3 мин при 5000 об/мин, каждый раз отсасывая надосадок, добавляя новую порцию раствора и перемешивая эритроцитарный осадок.

Другой способ получения эритроцитов заключается в обработке свернувшейся крови. Для этого чистыми ножницами сгусток крови в сыворотке разрезают на кусочки примерно по 5 мм<sup>3</sup>, массу перемешивают и выливают на 2—3-слойный марлевый фильтр, вложенный в воронку. После того как взвесь эритроцитов свободно профильтруется в приемник, края фильтра соединяют и фильтр слегка отжимают о стенку воронки. Профильтрованную взвесь эритроцитов отмывают центрифугированием так же, как указано выше. В качестве источника эритроцитов можно использовать также осадок форменных элементов, остающихся после отсасывания плазмы крови.

При длительном хранении эритроцитов следует предотвратить их разрушение (гемолиз). Если эритроциты необходимо сохранить в течение короткого времени, то их консервируют в растворе Олсвера (см. приложение 9).

Для сохранения эритроцитов в течение нескольких месяцев и дольше их обрабатывают формалином. Вначале готовят 8%-ный раствор формалина, смешивая 8 частей формалина (37—40% формальдегида) с 92 частями ЗИР. Затем готовят 8%-ную взвесь эритроцитов. Для этого вначале определяют, какой объем взвеси эритроцитов будет взят для обработки. Затем высчитывают необходимое количество осадка эритроцитов и растворителя с помощью следующих формул:

$$x = (av)/100; \quad y = v - x,$$

где  $x$  — количество осадка эритроцитов, мл;  $a$  — требуемая концентрация взвеси эритроцитов, %;  $v$  — необходимый объем взвеси эритроцитов, мл; 100 — общий объем взвеси эритроцитов, %;  $y$  — количество растворителя, мл.

**Пример.** Необходимо приготовить 30 мл 8%-ной взвеси эритроцитов. Значит,  $a=8$  и  $v=30$ . Тогда

$$x = (8 \cdot 30)/100 = 2,4 \text{ мл}, \quad y = 30 - 2,4 = 27,6 \text{ мл}.$$

Вначале, встряхивая центрифужный стакан с осадком отмытых эритроцитов, доводят осадок до состояния подвижной массы. Затем пипеткой на 5 мл набирают 2,4 мл осадка эритроцитов, обтирают наружную поверхность кончика

пипетки ватным тампоном и вносят эритроциты в 27,6 мл ЗИР. Пипетку несколько раз промывают во взвеси эритроцитов.

Полученную 8%-ную взвесь эритроцитов смешивают с равным объемом 8%-ного формалина, сосуд герметически закрывают и помещают в термостат при 37°C на 18—20 ч, периодически встряхивая эритроциты. По окончании инкубации полученную 4%-ную взвесь формализированных эритроцитов можно хранить при 6°C в течение года.

В день постановки реакции предварительно подсчитывают требующееся общее количество взвеси эритроцитов, умножив общее число лунок на объем взвеси эритроцитов, вносимый в одну лунку. Полученный результат округляют, немного увеличив. Взвесь эритроцитов в формалине перемешивают до полного взмучивания осадка и вносят в центрифужные стаканы. Если в реакции используют 4%-ную взвесь эритроцитов, то уровень жидкости отмечают на стенке стакана карандашом по стеклу. Затем взвесь эритроцитов центрифугируют до полного оседания эритроцитов, осторожно отсасывают надосадок так, чтобы не удалить эритроциты, добавляют новую порцию растворителя и размешивают взвесь эритроцитов до полного взмучивания осадка. Потом эритроциты снова центрифугируют и повторяют все описанные операции. Указанным способом эритроциты отмывают еще два раза. При последнем центрифугировании после отсасывания надосадка к осадку добавляют ЗИР до отметки на стенке стакана. Полученная 4%-ная взвесь эритроцитов после перемешивания годна для проведения реакции.

Если в реакции используют эритроциты не 4%-ной, а иной концентрации, то вначале определяют требующееся общее количество взвеси. Необходимое количество осадка эритроцитов и растворителя определяют по формулам, приведенным выше.







Следует учитывать, что отмтые эритроциты через 2—3 сут хранения при 6°C дают спонтанную агглютинацию и становятся непригодными для проведения реакций.

Разведение и внесение испытуемых сывороток в лунки панелей, добавление эритроцитов и инкубирование смесей. Выполнение этого этапа совпадает с соответствующим этапом постановки развернутой реакции агглютинации бактерий (см. занятие 9). Ход проведения РГА представлен в табл. 6. В лунки микропанели вносят разведения сыворотки, а в последнюю лунку (контроль эритроцитов) — ЗИР. Затем во все лунки добавляют по 0,02 мл 4%-ной взвеси эритроцитов, которые следует тщательно смешать с содержимым лунок. Для смешивания применяют способы, описанные выше при постановке реакции агглютинации бактерий (см. занятие 9). Затем панели инкубируют при комнатной температуре не менее 4 ч. Во время инкубации панели следует оберегать от встряхивания.

При отсутствии микропанелей реакцию можно ставить в макропанелях. Вначале в ряду лунок разводят материал в объеме 0,5 мл и затем добавляют во все лунки по 0,5 мл 1%-ной взвеси эритроцитов. Панель осторожно встряхивают до равномерного смешивания эритроцитов с содержимым лунок и выдерживают при комнатной температуре не менее 6—8 ч.

Таблица 6

## Схема постановки реакции прямой гемагглютинации

Содержание этапов работы	№ лунок микропанели					
	1	2	3	4	5	6
Разведение испытуемой сыворотки в макропанели (степень разведения)	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	Контроль эритроцитов
	↓	↓	↓	↓	↓	
Внесение разведенной сыворотки в лунку микропанели (объем в мл)	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	—
Внесение в лунку № 6 ЗИР (мл)	—	—	—	—	—	0,06
Добавление 4%-ной взвеси эритроцитов	По 0,02 мл в каждую лунку					
Перемешивание содержимого лунок, инкубация не менее 4 ч при комнатной температуре	Все лунок					
Характер осадка эритроцитов на дне лунки						
Учет результатов по 4-крестовой шкале	++++ (++) (++)	+++ —	++ —	+ —	± —	— —

Учет реакции и оценка полученных данных. По окончании инкубации оценивают степень агглютинации эритроцитов так же, как при осадочной реакции агглютинации бактерий, в лунках по 4-крестовой системе. Взаимосвязь характера осадка эритроцитов и выраженности гемагглютинации дана в табл. 6. Чем сильнее агглютинация эритроцитов, тем больше по площади и тоньше (светлее) осадок эритроцитов. В приведенном выше примере наиболее выраженную гемагглютинацию наблюдали при разведении сыворотки 1:2 и оценили четырьмя крестами (++++), а отрицательную реакцию отмечали в разведении 1:32 и в контроле эритроцитов.

Для оценки активности сыворотки необходимо установить ее титр, т. е. то наибольшее разведение, которое дает реакцию на два креста (++) . В приведенном примере титр сыворотки равен 1:8. Гемагглютинирующую способность сыворотки можно выразить также в виде обратного титра, т. е. цифрой 8.

II. Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА). Проведение реакции пассивной гемагглютинации для определения антител к антигенам бактерии *A. punctata* включает этапы: подготовка иммунных сывороток, приготовление антигенов и сенсibilизация эри-

троцитов; подготовка, разведение и внесение испытуемой сыворотки в лунки панелей, добавление сенсibilизированных и несенсибилизированных (нормальных) эритроцитов и инкубирование смесей; учет реакции и оценка полученных результатов.

Приготовление антигенов проводят по методике, описанной при постановке реакции диффузной преципитации (см. занятие 10), приготовление иммунной сыворотки— по методике, указанной при описании реакции агглютинации бактерий (см. занятие 9). Однако сыворотки при титровании в РПГА требуют дополнительной обработки для удаления естественных антител к тем эритроцитам, которые используют для сенсibilизации. С этой целью к сыворотке добавляют равный объем отмытой формализированной 4%-ной взвеси эритроцитов кролика, смесь периодически встряхивают для равномерного распределения эритроцитов и оставляют в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем пробирки центрифугируют и отсасывают надосадоk, который представляет собой адсорбированную (лишенную естественных противоэритроцитарных антител) сыворотку в разведении 1:2.

Для проведения реакции необходимо определить дозу антигена, которой следует сенсibilизировать эритроциты. С этой целью готовят исходный раствор антигена концентрацией 2—3 мг/мл. Затем в ряд центрифужных стаканов по 5 мл вносят убывающие количества антигена (табл. 7), добавляют ЗИР до 0,5 мл, отмечают на стенке стакана уровень жидкости и вносят во все стаканы по 0,5 мл 4%-ной взвеси отмытых формализированных эритроцитов. Стаканы герметически закрывают пробками, перемешивают содержимое и помещают на 2 ч при температуре 37°C, периодически встряхивая взвесь эритроцитов. В первом стакане эритроциты сенсibilизируют исходной дозой антигена, во втором — 1/2 дозы, в третьем — 1/4 и в четвертом — примерно 1/8 дозы. После выдерживания в термостате взвесь эритроцитов во всех стаканах трижды отмывают ЗИР и после последнего центрифугирования к осадку добавляют растворитель до уровня отметки на стенке стакана.

Для испытания активности приготовленных сенсibilизированных эритроцитов готовят несколько рядов разведений иммунной сыворотки, содержащей антитела к антигену, взятому для сенсibilизации эритроцитов. Разводят сыворотку так же, как при РГА. Затем к каждому ряду разведений сыворотки добавляют по 0,02 мл

Таблица 7

**Сенсibilизация эритроцитов разными дозами антигена**

Последовательно добавляемые ингредиенты	Номера центрифужных стаканов				
	1	2	3	4	5
Количество исходного антигена, мл	0,5	0,25	0,12	0,06	—
Количество ЗИР, мл	—	0,25	0,38	0,44	0,5
Количество 4%-ной взвеси эритроцитов, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

эритроцитов, сенсibilизированных определенной дозой антигена, содержимое лунок перемешивают и панели помещают в холодильник при 6°C. Через 4—6 или 18—20 ч учитывают результат реакции. В табл. 8 приведен пример титрования сыворотки к *A. punctata* I типа с эритроцитами, сенсibilизированными антигеном Кб 31.

Из данных табл. 8 видно, что оптимальной сенсibilизирующей дозой является концентрация антигена 1 мг/мл, так как она позволяет выявить антитела в сыворотке в наибольшем титре 1:1600. По нашим данным, для антигена *A. punctata* II типа штамма Кл7 сенсibilизирующая доза антигена составляет 0,05 мг/мл.

Таблица 8

**Определение оптимальной сенсibilизирующей дозы антигена**

Концентрация антигена, взятого для сенсibilизации эритроцитов, мг/мл	Разведения иммунной сыворотки						Контроль эритроцитов
	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1600	1 : 3200	
2	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	+	—	—
1	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++	—	—
0,5	++ ++	++ ++	++	++	—	—	—
0,25	++ ++	+++	+	—	—	—	—
Несенсibilизированные эритроциты	—	—	—	—	—	—	—

Разведение и внесение испытуемых сывороток в лунки панелей проводят так же, как при РГА, но разведения сыворотки вносят в два параллельных ряда лунок, в один из которых добавляют сенсibilизированные эритроциты, а в другой — несенсibilизированные. Соответственно ставят два контроля эритроцитов. Сразу после смешивания ингредиентов в лунках панели выдерживают в холодильнике при 6°C в течение 4—6 или 18—20 ч. Затем проводят учет реакции. Гемагглютинирующую активность сывороток определяют так же, как при проведении РГА. Форма протокола для учета РГА и РПГА дана в приложении 8. Наличие специфических непрямых гемагглютининов считается достоверным, когда титр сыворотки с сенсibilизированными эритроцитами превышает не менее чем в 4 раза титр материала с несенсibilизированными эритроцитами.

**Контрольные вопросы [34]**

1. Какой принцип лежит в основе проведения реакции гемагглютинации?
2. Каковы особенности постановки РПГА?
3. Каковы основные этапы постановки РГА и РПГА?
4. Описать способы приготовления взвеси эритроцитов определенной концентрации.

5. Как обработать эритроциты для длительного хранения?
6. Каким образом проводят сенсибилизацию эритроцитов?
7. Как проводят учет реакции гемагглютинации?

## З а н я т и е 12. Фагоцитарная реакция

**Содержание.** Овладение методами определения фагоцитарной активности клеток, фагоцитарного индекса и степени завершенности фагоцитоза.

**Материальное обеспечение.** Иммунизированные бактериями *A. punctata* двухлетки карпа, культура бактерий *A. punctata*, раствор антикоагулянта, краситель Романовского — Гимза, метиловый спирт, чашки Петри с мясопептонным агаром, стерильные пробирки с пробками, пастеровские пипетки или шприцы на 1—2 мл с иглами, предметные и шлифованные стекла для приготовления мазков крови, кювета для фиксации и окраски мазков крови, спиртовка или газовая горелка, термостат на 25°C, инструменты и столник для вскрытия рыб.

**Организация и проведение работы.** Фагоцитоз является важным защитным механизмом при инфекционных заболеваниях рыб. Фагоцитоз в организме рыб включает различные этапы взаимодействия клеток и фагоцитируемого агента: направленное движение клеток, трансформация клеток в активные формы, сорбция агента на поверхности фагоцита и его погружение в цитоплазму фагоцитирующей клетки. Поглощенные микроорганизмы претерпевают в клетке различные изменения в зависимости от активности фагоцитов, свойств микроорганизмов и условий их взаимодействия. При полном внутриклеточном переваривании возбудителя происходят глубокие, необратимые изменения; ведущие к потере жизнеспособности возбудителя. Это иммунологическое явление получило название завершенного фагоцитоза. Если клетка не способна убить возбудителя, то он может сохраняться и размножаться внутри клетки и фагоцитоз носит незавершенный характер. Изоляция микробных клеток в фагоцитах имеет некоторое защитное значение, так как ограждает другие структуры организма от действия возбудителя. Однако этот защитный механизм очень неустойчив, и при неблагоприятных условиях сохранившие жизнеспособность микроорганизмы могут вызвать обострение заболевания. При поглощении вирулентных бактерий клетками неиммунизированных рыб наблюдали разрушение фагоцитов и развитие патологического процесса. Было установлено, что иммунизация рыб приводит к значительному усилению фагоцитарной активности клеток. Поэтому демонстрацию фагоцитоза в лабораторных условиях лучше проводить на иммунизированных рыбах.

Порядок проведения работы следующий.

Существуют различные способы определения фагоцитарной способности свободных клеток органов и тканей рыб. Изучение фагоцитоза можно провести по методу, использованному в работах Г. Д. Гончарова и В. Р. Микрякова. Этот метод включает следующие этапы:

- введение иммунизированным рыбам культуры *A. punctata*;
- выдерживание рыб для развития фагоцитарной реакции и извлечение экссудата из брюшной полости;
- приготовление препаратов для микроскопического изучения кле-

ток экссудата с целью определения количества фагоцитов и характера фагоцитоза;

установление завершенности фагоцитоза.

Преподаватель демонстрирует внутрибрюшинное введение бактерий предварительно иммунизированному карпу и взятие пробы экссудата из брюшной полости. Учащиеся используют полученные пробы экссудата и приступают к определению количества фагоцитов и степени завершенности фагоцитоза.

Иммунизацию двухлетков карпа проводят путем внутрибрюшинного введения 500 млн.— 1 млрд. убитых бактерий какого-либо коллекционного штамма *A. punctata*. Через 30—40 сут после иммунизации рыбы инъецируют внутрибрюшинно 500 млн. живых бактерий того штамма, который был применен для иммунизации. Важным условием получения положительного результата является содержание рыб при температуре 20—23°C в условиях полноценного кормления. После введения живых бактерий в брюшной полости уже через 5—10 мин развивается выраженная фагоцитарная реакция, которая сохраняется в течение 1 сут. В первые 60 мин после начала опыта в фагоцитозе участвуют многие виды клеток, в частности макрофаги.

Для получения экссудата вскрывают в стерильных условиях брюшную полость рыб так же, как это принято при выделении возбудителей инфекционных заболеваний (см. занятие 16). Пинцетом отодвигают сверху органы брюшной полости и скопившийся на внутренней стороне брюшка экссудат отсасывают стерильной пастеровской пипеткой или шприцем. Для предотвращения свертывания экссудата в пробирку предварительно вносят антикоагулянт, а затем — экссудат. Описание антикоагулянта дано в занятии 6. Каплю экссудата из пробирки наносят на маркированное предметное стекло и готовят тонкий мазок подобно мазку крови. Из одной пробы готовят 3—4 мазка. После высыхания мазки в течение 5 мин фиксируют безводным метиловым спиртом и затем окрашивают по Романовскому — Гимза (см. занятие 14). Окрашенные мазки микроскопируют, просматривая не менее 100 клеток и отмечая количество фагоцитирующих клеток, число бактерий в каждом фагоците и морфологию поглощенных бактерий (см. табл. IV, цв. вклейка). Число фагоцитов, приходящееся на 100 клеток, характеризует фагоцитарную активность клеток. Затем определяют фагоцитарный индекс. Для этого просматривают 100 фагоцитировавших бактерий клеток и подсчитывают среднее количество бактерий, приходящееся на один фагоцит.

Степень завершенности фагоцитоза определяют следующим образом. Каплю экссудата наносят на хорошо подсушенный мясопептонный агар в чашке Петри. Затем шлифованное стекло проводят через пламя горелки и охлаждают прикосновением свободного торцевого края к внутренней поверхности крышки чашки Петри. Каплю экссудата распределяют шлифованным стеклом по поверхности питательной среды таким же образом, как готовят мазок крови, чашку закрывают и на наружной стороне дна отмечают ка-

рандашом по стеклу зону расположения мазка и номер пробы. Затем чашку помещают на 3—6 ч в термостат при 25°C. Температура инкубации может быть несколько изменена в зависимости от температурного оптимума роста данного штамма. После инкубации с поверхности агара готовят мазки-отпечатки. С этой целью маркированные стекла для мазков крови захватывают со стороны короткой боковой части пинцетом и быстро проводят над пламенем. Свободный торцевый край стекла слегка прижимают к поверхности агара, не нарушая целостности слоя агара, и плавно опускают стекло до полного соприкосновения с агаром. Стекло должно быть ориентировано таким образом, чтобы оно соприкоснулось с зоной нанесения мазка. Извлеченное из чашки Петри стекло переворачивают мазком вверх, подсушивают, фиксируют в течение 5 мин в метиловом спирте, окрашивают по Романовскому — Гимза и микроскопируют. При потере микроорганизмами жизнеспособности в условиях заверченного фагоцитоза в клетках наблюдают признаки нарушения жизнеспособности возбудителя: наличие фрагментов микробных тел, исчезновение ядерной субстанции бактерий. Незавершенный фагоцитоз бактерии *A. punctata* характеризуется образованием гигантских форм микроорганизмов. Для оценки степени завершенности фагоцитоза среди 100 фагоцитов подсчитывают количество клеток, в которых фагоцитоз носит завершенный характер. Эту величину называют показателем завершенности фагоцитоза.

#### Контрольные вопросы [15, 27]

1. Каким образом определяют фагоцитарную активность свободных клеток рыб?
2. Что такое фагоцитарный индекс?
3. Как определить завершенность фагоцитоза и каким показателем она выражается?

## Глава II. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ РЫБ

Инфекционные болезни рыб вызываются вирусами, бактериями, грибами и водорослями. Возбудители инфекционных болезней патогенны, паразитируют и размножаются в организме рыб. Особую опасность они представляют для рыб, культивируемых в прудовых, нерестово-выростных хозяйствах и на рыбозаводах. Наиболее опасны вирусные инфекции (вирусная геморрагическая септицемия лососевых, инфекционный некроз поджелудочной железы, весенняя виремия и др.). Часто заболевания вирусной этиологии осложняются присутствием бактерий, в значительной степени изменяющих клиническую картину и затрудняющих диагностику. Кроме вторичных инфекций бактерии при снижении резистентности рыб могут вызывать заболевания, поражающие различные органы и системы (фурункулез, бактериальная геморрагическая септицемия, миксобактериоз, коринебактериоз и др.). Патогенные грибы вызывают микозы, которые не обуславливают такой массовой гибели,

как болезни вирусной и бактериальной этиологии, но могут также наносить значительный экономический ущерб. К микозам относятся ихтиофоз, бранхиомикоз, сапролегниоз, микоз плавательного пузыря лососевых.

Для инфекционных болезней характерно наличие инкубационного периода — времени, протекающего с момента внедрения возбудителя в организм рыбы до появления клинических признаков болезни. Продолжительность инкубационного периода зависит от патогенности возбудителя, числа попавших в организм возбудителей и места их внедрения, а также от состояния организма рыбы и условий окружающей среды (температурного режима, содержания кислорода и органических веществ в воде).

### **МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ РЫБ**

Методы лабораторных исследований помогают диагностировать бактериальное заболевание, позволяют выявить этиологического агента, изучить его свойства, выбрать средство и метод профилактики и лечения.

Результат бактериологического исследования зависит от правильности забора патологического материала и своевременности его доставки в лабораторию.

При изучении бактериальных болезней рыб используют бактериоскопический, бактериологический и серологический методы исследования.

Бактериоскопический метод исследования позволяет обнаружить в патологическом материале бактерии и ориентировочно диагностировать заболевание (миксобактериоз, вибриоз, бактериальную почечную болезнь).

Бактериологический метод исследования имеет наиболее важное значение, так как позволяет получить чистую культуру возбудителя, изучить ее, определить вирулентность и чувствительность к антибиотикам, что особенно важно при выборе лечебных препаратов.

Серологический метод исследования применяют при проведении иммунологических исследований — дополнительном типировании возбудителя, выявлении специфических антител в сыворотке крови больных рыб.

Для успешной диагностики инфекционных заболеваний эти методы необходимо использовать комплексно.

### **Занятие 13. Бактериологическая лаборатория**

**Содержание.** Ознакомление с устройством и особенностями работы бактериологической лаборатории, лабораторной посудой, подготовкой ее к работе, питательными средами, применением их в лабораторной практике, способами стерилизации и дезинфекции.

**Материальное обеспечение.** Аппаратура и приборы, используемые в бактериологических лабораториях: чашки Петри, пробирки, колбы, градуированные и пастеровские пипетки, шпатели, предметные и покровные стекла, предметное стекло с луночкой, бактериологическая петля, игла, спиртовка, стерилизатор, набор сухих, жидких и плотных питательных сред, дезинфицирующие средства.

**Организация и проведение работы.** Помещение бактериологической лаборатории состоит из нескольких комнат: 1) комнаты для лабораторных исследований; 2) комнаты для приготовления и разливки питательных сред (с боксом); 3) автоклавной для стерилизации сред и посуды; 4) моечной для мойки и подготовки посуды. Для проведения биологических проб необходима аквариальная.

Боксы и панели стен в рабочих комнатах должны быть окрашены светлой масляной краской, лабораторная мебель должна иметь легко дезинфицируемое покрытие. В лабораторных комнатах ежедневно проводят уборку влажным способом, воздух подвергают воздействию бактерицидных ламп. Такая обработка значительно уменьшает вероятность попадания из воздуха микроорганизмов в питательные среды и исследуемый материал.

Лаборатория должна быть оборудована приборами для микроскопирования, нагревания и стерилизации, холодильниками, центрифугами, термостатами, дистилляторами, машиной для изготовления ватных пробок, прибором для подсчета колоний и др.<sup>1</sup>

В бактериологической лаборатории ихтиопатологи исследуют в основном сапрофитные микроорганизмы, неопасные или представляющие незначительную опасность для человека. Однако следует помнить о том, что в исследуемом материале могут присутствовать и патогенные микроорганизмы. Кроме того, сапрофиты (в частности, аэромонады и псевдомонады) при снижении резистентности организма человека могут вызвать у него заболевание. Работа в бактериологической лаборатории должна проводиться с соблюдением асептики для получения точных результатов исследования. Попадание посторонней микрофлоры из воздуха в питательные среды и исследуемый материал искажает результаты анализа и приводит к неправильным выводам.

Правила работы бактериологов в ихтиопатологической лаборатории такие же, как и в любой микробиологической лаборатории.

1. В лаборатории необходимо работать в халатах, в боксах кроме халата надевать косынки и шапочки.

2. При работе с живыми культурами, материалом от больных и зараженных рыб следует соблюдать все правила предосторожности, чтобы избежать загрязнения рук и внешней среды возбудителями болезней.

3. В лаборатории запрещается принимать пищу и курить.

4. Посуду, среды и инструменты после работы с заразным материалом следует подвергать стерилизации или обработке дезинфицирующими растворами.

5. По окончании работы необходимо ставить в термостат чашки, колбы и пробирки с посевами, приводить в порядок микроскопы и накрывать их полиэтиленовым колпаком, тщательно убирать

---

<sup>1</sup> С устройством и назначением этих приборов можно ознакомиться в руководствах по микробиологии для студентов медицинских учебных заведений и в главе I данного практикума.

рабочее место, протирать дезинфицирующим раствором столы, а также мыть руки.

6. Раз в месяц все помещение лаборатории необходимо мыть водой с применением дезинфицирующих средств, бокс подвергать такой обработке каждый раз перед работой в нем, после уборки следует включать бактерицидную лампу (в течение 0,5—1 ч).

На лабораторном столе должно быть только все необходимое: спиртовая или газовая горелка, микроскоп с осветителем, штатив или фарфоровый стакан для бактериологических петель и игл, банка с предметными стеклами в смеси Никифорова (96°-ный этиловый спирт и эфир 1:1), цилиндр с дезинфицирующим раствором, банка с ватными тампонами, штатив для пробирок, спички, карандаш по стеклу, иммерсионное масло (рис. 43).

В комнате для лабораторных исследований отдельно оборудуют место для окраски мазков, где постоянно имеют набор красителей, спирт для обесцвечивания, фильтровальную бумагу, спиртовку, пинцет, эмалированный или пластмассовый кювет, чашку и «мостик» для мазков, бутылъ с водой, песочные часы (рис. 44).

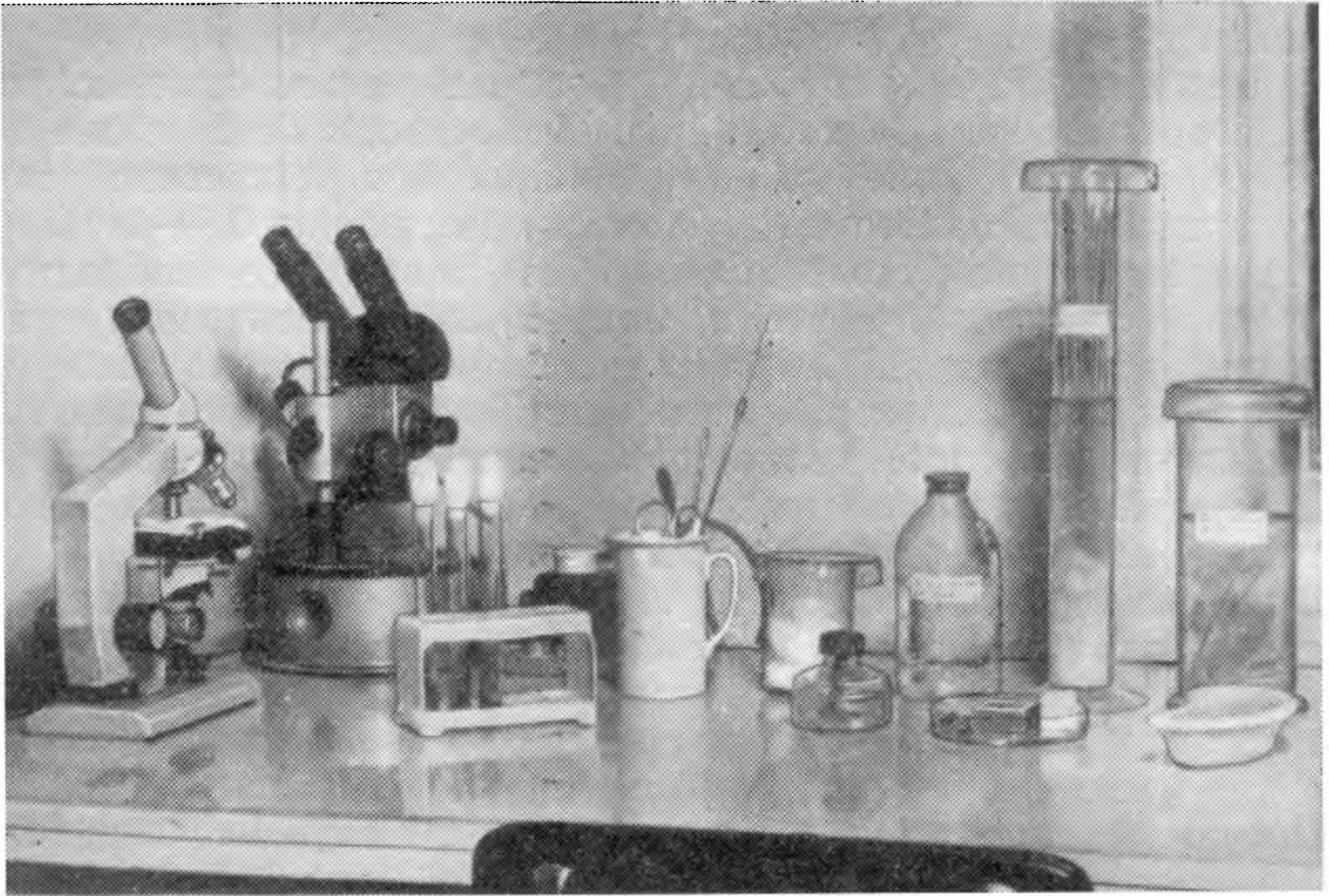
Посуда, используемая при микробиологических исследованиях, должна быть абсолютно чистой и стерильной (рис. 45).

Новую лабораторную посуду кипятят в мыльном растворе в течение 15 мин на слабом огне, затем ее вынимают, ополаскивают чистой водой, погружают в теплый 1%-ный раствор соляной кислоты, доводят до кипения и кипятят в течение 15 мин для нейтрализации избыточной щелочи стекла. После обработки в соляной кислоте посуду тщательно промывают водопроводной, затем несколько раз ополаскивают дистиллированной водой. Посуду, предназначенную для серологических исследований, мыть кислотами и щелочами не рекомендуется, так как даже следы этих веществ, оставшиеся на стекле, могут исказить результат реакции. Ее моют горячей водой, несколько раз ополаскивают дистиллированной водой и сушат на сетках в сушильном шкафу.

Посуду, бывшую в употреблении, моют после стерилизации. Посуду со следами питательных сред заливают на 1 сут 2—5%-ным раствором едкого натра или кали. Очень загрязненную жирную посуду заливают на 30—40 мин хромовой смесью, а затем тщательно промывают проточной водопроводной водой. Не очень загрязненную посуду моют в горячей воде ершом с мылом или содой, затем дважды ополаскивают дистиллированной водой.

Пипетки, градуированные цилиндры и пробирки должны быть абсолютно чистыми и обезжиренными, иначе объем слитой жидкости не будет соответствовать обозначенному на шкале.

Внутренние стенки пипетки протирают тонкой упругой проволокой с плотно намотанным на конец кусочком ваты, смоченным горячим раствором мыла или пищевой соды. Засорившийся канал пипетки прочищают тонкой проволочкой — мандреном — от инъекционных игл. Промытые пипетки кипятят в течение 20—30 мин на слабом огне в мыльном растворе, после чего ополаскивают сначала теплой проточной, затем дистиллированной водой. Сильно загрязненные и



**Рис. 43. Рабочее место для бактериологических исследований**



**Рис. 44. Место для окраски мазков**

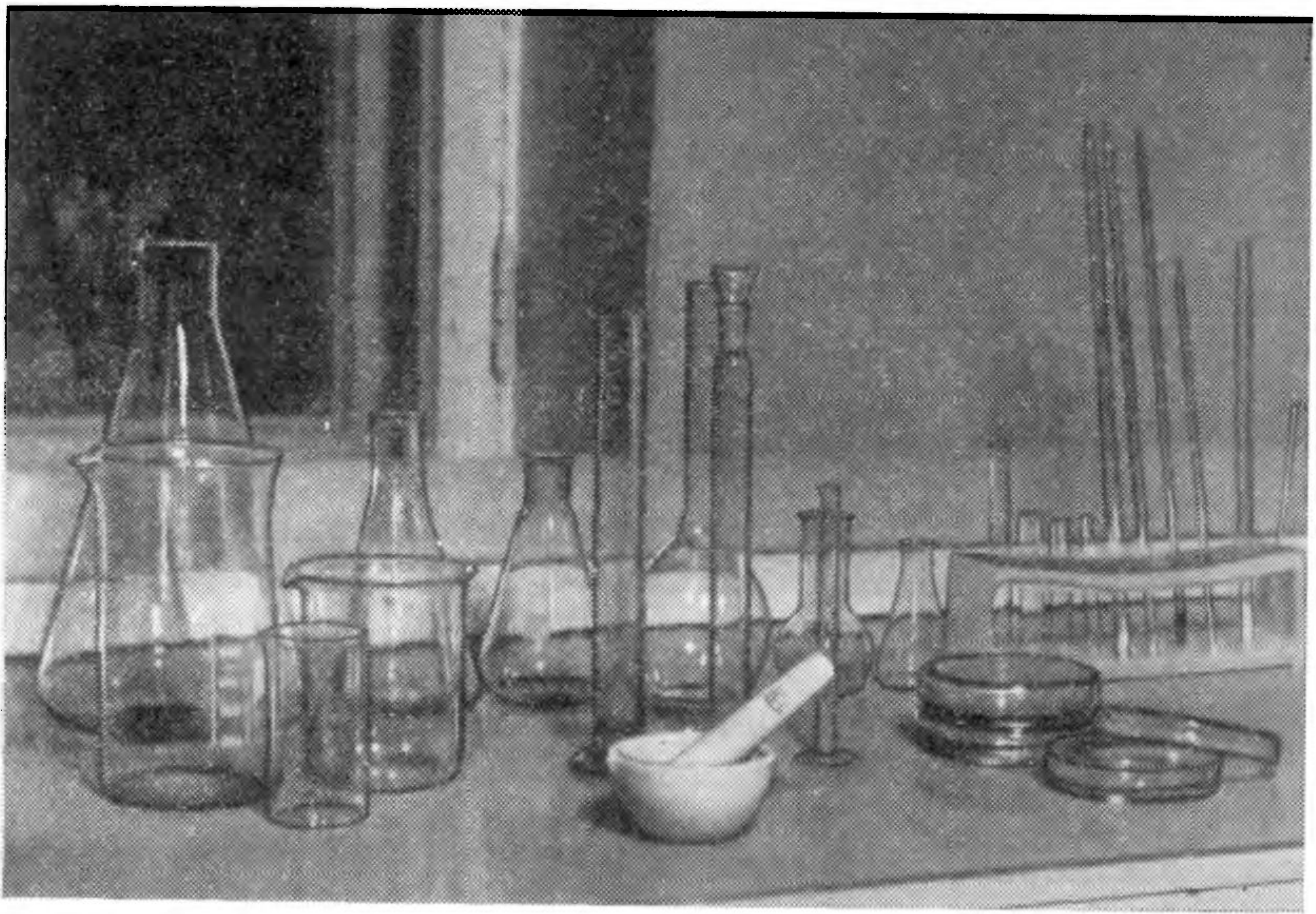


Рис. 45. Лабораторная посуда, используемая при бактериологических исследованиях

жирные пипетки помещают на 20—30 мин в хромовую смесь, затем в течение нескольких минут промывают в проточной и дважды в дистиллированной воде.

Предметные и покровные стекла должны иметь чистую, хорошо обезжиренную поверхность. Капля воды, нанесенная на поверхность хорошо обработанного стекла, равномерно растекается, а не собирается капельками.

Новые предметные и покровные стекла моют в теплой мыльной воде, хорошо ополаскивают в дистиллированной воде и заливают смесью Никифорова. Если после этого стекла сохраняют следы жира, их перед употреблением можно натереть кусочком сухого хозяйственного мыла и тщательно протереть чистой марлевой салфеткой.

Предметные и покровные стекла с мазками и иммерсионным маслом опускают на 2 ч в концентрированную серную кислоту или хромовую смесь, затем тщательно промывают проточной водопроводной и дистиллированной водой или в течение 30—40 мин кипятят на слабом огне в 5%-ном растворе соды или щелочи.

С чисто вымытой посуды при ополаскивании вода стекает, оставляя на поверхности ровную водяную пленку. На высушенной посуде не должно быть матового налета и пятен.

Вымытую посуду сушат при комнатной температуре или в сушильном шкафу, закрывают ватно-марлевыми пробками с бумажными колпачками. Градуированные и пастеровские пипетки с широкого конца закрывают ватой так, чтобы она была не очень тугой,

но и не проскакивала внутрь. Капилляр пастеровских пипеток оплавливают над спиртовкой, после чего пипетки укладывают в пенал или заворачивают в бумагу. Шпатели заворачивают каждый в отдельности, затем по 5—10 шт. вместе. Пробирки и чашки Петри заворачивают в бумагу или укладывают в соответствующие пеналы. В фарфоровую ступку вкладывают круглый лист бумаги таких размеров, чтобы после прижимания края листка выходили за край ступки. Пестик заворачивают отдельно и вкладывают в ступку поверх лежащего там листка, который в дальнейшем в процессе работы служит как бы крышкой, затем ступку вместе с пестиком заворачивают бумагой.

Заготовленную посуду хранят в хорошо закрывающихся, защищенных от пыли шкафах и перед употреблением стерилизуют.

Дезинфекция — уничтожение патогенных микроорганизмов на объектах внешней среды. Дезинфицируют загрязненную патологическим материалом или культурами патогенных микроорганизмов посуду, пипетки, инструменты, рабочее место.

Использованные предметные стекла дезинфицируют в 3—5%-ном растворе лизола или в 3—5%-ном растворе хлорамина или хромовой смеси, покровные стекла — в концентрированной серной кислоте.

Пипетки, шпатели и стеклянные палочки после использования опускают на 1 ч в банку с 3%-ным раствором хлорамина, постоянно находящуюся на рабочем месте.

Трупы рыб можно заливать 5%-ным раствором карболовой кислоты или 3—5%-ным раствором хлорамина, в котором они хранятся до уничтожения (сжигания или захоронения).

После окончания работы рабочее место убирают и протирают ватным тампоном, смоченным в 3%-ном растворе хлорамина.

Стерилизация — полное уничтожение всех живых микроорганизмов в стерилизуемом объекте. Стерилизацию осуществляют различными методами.

1. Прокаливание, или фламбирование. Наиболее простой метод, которым стерилизуют бактериологические петли, иглы, концы пипеток, которые берут в рот, шпатели, стеклянные палочки, концы пастеровских пипеток после обламывания кончика капилляра.

2. Кипячение. В дистиллированной воде или 1—2%-ном содовом растворе в течение 30—40 мин кипятят мелкий металлический инструментарий, иглы, шприцы в разобранном виде.

3. Стерилизация в сушильном шкафу. Стерилизуют лабораторную посуду, бумагу, вату, марлю при температуре 160°C в течение 1,5—2 ч от момента показания термометром этой температуры. После отключения сухожаровой шкаф до снижения температуры не открывают для предупреждения самовозгорания воспламеняющихся материалов.

4. Стерилизация паром под давлением. Ее осуществляют в автоклавах. Таким способом стерилизуют патологический материал, лабораторную посуду, питательные среды. Началом стерилизации считают момент, когда стрелка манометра показывает нужное

давление. При 120°C длительность стерилизации 15—20 мин, при 115°C — 20—30 мин, споросодержащий материал стерилизуют в течение 2 ч при 120°C. Определенному показанию манометра соответствует определенная температура пара внутри камеры.

Показания манометра, атм	t, °C		
0	100	1,0	120,6
0,2	105	1,5	127,8
0,4	110	2,0	132,9
0,5	111,7	2,5	139,2
0,7	115,0	3,0	144,0

Периодически работу автоклава контролируют с помощью порошкообразных химических веществ, имеющих определенную температуру плавления, °C: бензонафтол — 110, антипирин — 115, резорцин — 118, бензойная кислота — 121.

Одно из названных веществ смешивают с метиленовым синим, фуксином или сафранином, насыпают в маленькие пробирки, плотно закрывают корковыми пробками и помещают в вертикальном положении между стерилизуемым материалом. По достижении нужной температуры порошок расплавится и вся смесь окрасится добавленной краской. На 100 г порошка-индикатора добавляют 0,005 г фуксина или 0,05 г метиленового синего, или 0,01 г сафранина.

5. Стерилизация текучим паром. Ее осуществляют в аппарате Коха или автоклаве при незавинченной крышке и открытом выпускном кране при температуре 100° C в течение 30—60 мин в зависимости от загрязненности стерилизуемого объекта. Текучим паром стерилизуют среды, свойства которых изменяются при температуре выше 100°C. Стерилизацию текучим паром проводят повторно по 15—20 мин в течение 3 дней до полного уничтожения микроорганизмов, выдерживая в промежутках между стерилизациями при комнатной температуре. Такая обработка называется дробной стерилизацией.

Среды, содержащие нативный белок, подвергают дробной стерилизации — тиндализации: прогревают на водяной бане в течение 5—6 дней при температуре 56—58°C в течение 2 ч в первый день и в течение 1 ч в последующие дни.

Механическую стерилизацию с помощью бактериальных фильтров используют для стерилизации жидкостей, которые не могут подвергаться воздействию высокой температуры. Фильтры изготовляют из материалов с мелкими порами, задерживающими все микроорганизмы. Чаще всего в настоящее время используют асбестовые и мембранные из нитроцеллюлозы фильтры, монтируемые в приборы Зейтца (рис. 46). Этим способом чаще всего стерилизуют биологические препараты и вирусосодержащий материал.

Для выделения чистых культур микроорганизмов и изучения их свойств используют питательные среды, в состав которых входят органогены (азот, углерод, водород, кислород), неорганические соединения, содержащие фосфор, калий, серу, натрий, магний, же-

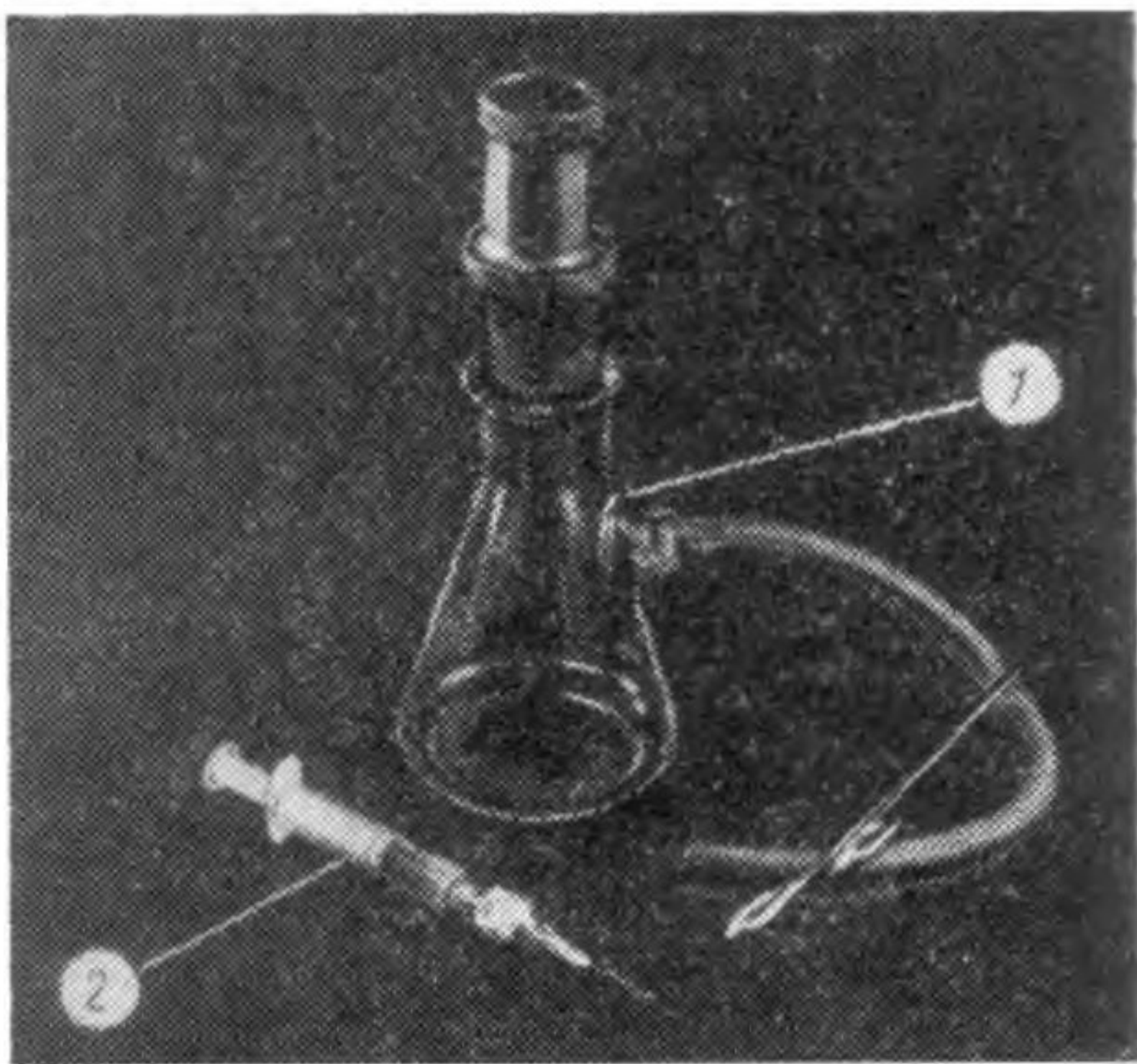


Рис. 46. Аппараты для стерильной фильтрации:

1 — держатель фильтров, смонтированный с колбой Бунзена для фильтрации под вакуумом; 2 — шприц с держателем фильтров для фильтрации небольших объемов материала

(РПБ и РПА) — используют для накопления бактериальной массы и в качестве основы для специальных сред.

К специальным средам относятся элективные и дифференциально-диагностические.

Элективные (избирательные) среды содержат вещества, обеспечивающие оптимальные условия для развития одного или нескольких видов бактерий — среды Эндо, Китта-Тароцци, Чапека, Шмитц-Шанделье и др.

Дифференциально-диагностические среды применяют для идентификации бактерий. С помощью углеводов и многоатомных спиртов, входящих в их состав, определяют ферментативную активность бактерий («пестрые ряды» Гисса) (табл. V, цв. вклейка). Протеолитическую активность выявляют на средах, содержащих белковые вещества [мясопептонный желатин (МПЖ), свернутая лошадиная сыворотка, лакмусовое молоко].

Редуцирующую способность бактерий определяют на средах, содержащих химические вещества, изменяющие окраску под окислительно-восстановительным действием бактерий — нейтральрот, метиленовый синий, кислый фуксин, бромтимолблау, розоловую кислоту.

По консистенции среды могут быть жидкими (МПБ, сахарный, солевой бульон), полужидкими (с добавлением 0,15—0,5% агар-агара) и плотными (содержащие 1,5—5% агар-агара). Состав и назначение дифференциально-диагностических сред чрезвычайно разнообразны, поэтому характеристика их будет дана при ознакомлении с отдельными группами бактерий, а рецептура и способ их приготовления приведены в приложениях 10—12.

лезо, микроэлементы (кобальт, йод, марганец, бор, цинк, молибден, медь).

Питательные среды, применяемые в бактериологии, должны содержать все вещества, необходимые для нормальной жизнедеятельности микроба, иметь рН, оптимальный для данного вида микроорганизмов, достаточную влажность для создания оптимальных условий питания микроорганизмов, быть стерильными и по возможности прозрачными.

Питательные среды делят на среды общего назначения и специальные.

Среды общего назначения — мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), рыбопептонный бульон и агар

## Порядок проведения работ следующий.

1. Посещение микробиологической лаборатории (СЭС или НИИ). Студенты знакомятся с особенностями работы в лаборатории, организацией рабочих мест, работой стерилизующей аппаратуры. Особое внимание необходимо обратить на то, что крышку автоклава открывают только после достижения стрелкой манометра 0, причем открывают ее на себя, чтобы не обжечься выходящим паром.

Сушильный шкаф открывают после снижения температуры, чтобы не вызвать самовозгорания стерилизуемых объектов при попадании воздуха внутрь раскаленного шкафа.

2. Демонстрации. а. Лабораторная посуда — чашки Петри, колбы, пробирки, пипетки, цилиндры. Обращают внимание на особенности подготовки посуды для работы в бактериологической лаборатории, правила хранения посуды.

б. Набор сухих и приготовленных питательных сред: МПА, МПБ, МПЖ, скошенный агар, среды с углеводами, спиртами, чашки с кровяным агаром для определения гемолитической активности бактерий, свернутая сыворотка.

В отделе приготовления питательных сред обращают внимание на процесс приготовления жидких, полужидких и плотных питательных сред. Приготовление сред связано с использованием большого количества лабораторной посуды, различных приспособлений. При приготовлении сред из сухого порошка и реактивов необходимо очень точное взвешивание всех компонентов.

3. Самостоятельная работа. а. Подготовка колб, пробирок, пастеровских и градуированных пипеток к стерилизации. Чисто вымытые, сухие колбы закрывают ватно-марлевыми пробками, сверху накрывают бумажным колпачком, обвязывают ниткой, края колпачка аккуратно обрезают.

Пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками, связывают шпагатом (по 10 шт.), верхнюю часть пачки закрывают бумагой, обвязывают ниткой, края бумаги аккуратно обрезают.

Пастеровские и градуированные пипетки с широкого конца плотно затыкают ватой. Пастеровские пипетки по 10—20 шт. заворачивают бумагой, не обломив капилляры. Нижний конец пакета обвязывают ниткой, градуированные пипетки заворачивают по одной, для чего нарезают полоски бумаги шириной 2—2,5 см, кладут их на стол, загибают левый конец углом и заворачивают носик пипетки, затем, вращая пипетку, наматывают на нее полоску бумаги. Нижний конец полоски закручивают. Пипетки одного объема связывают вместе.

б. Разливка МПА в чашки Петри. Расплавленный в колбе МПА охлаждают до 50—60°C. Над спиртовкой вынимают пробку. Тщательно фламбируют горлышко колбы и, приподнимая левой рукой крышку стерильной чашки, разливают МПА. Толщина слоя агара должна быть 0,5—0,7 см. До застывания агара чашки стоят на столе. Перед посевом излишний конденсат в течение 10—15 мин

подсушивают в термостате, при этом чашку переворачивают вверх дном; крышка остается на полке термостата, а нижняя часть чашки вверх дном под углом опирается на крышку.

Результаты работы фиксируют в рабочей тетради.

### Контрольные вопросы [27, 39]

1. Каковы основные особенности устройства бактериологической лаборатории?
2. Основные правила работы в бактериологической лаборатории.
3. Какое оборудование и аппаратуру используют в лаборатории?
4. Какие требования предъявляют к лабораторной посуде, используемой в микробиологических исследованиях?
5. На какие группы делят питательные среды?
6. Каким требованиям должны отвечать питательные среды?
7. Что такое дезинфекция? Как ее осуществляют?
8. Что такое стерилизация? Какие известны виды стерилизации?
9. Что такое дробная стерилизация?
10. Каковы основные правила работы с автоклавом, контроля за стерилизацией?

## Занятие 14. Методы бактериологических исследований

**Содержание.** Изучение морфологии и физиологии бактерий, методов их выделения и идентификации.

**Материальное обеспечение.** 1. Микроскоп МББ, МБС, иммерсионное масло, предметные и покровные стекла, предметное стекло с луночкой, вазелин, стекло со шлифованным краем, стерильные пипетки, бактериологическая петля, набор реактивов для окраски по Граму, фильтровальная бумага, кювета, чашка и «мостик» для предметных стекол, бутылка с водой, пинцет, спиртовка, спички и карандаш по стеклу. 2. Суточные бульонные культуры вибриона, кишечной палочки, стафилококка, суточная агаровая культура клебсиелл, 2%-ный раствор колларгола или черная тушь (морозостойкая), на полужидком агаре культуры стафилококка и кишечной палочки, лакмусовое молоко исходное, с 3-суточной культурой *Aeromonas punctata* и *Pseudomonas aeruginosa*, МПЖ исходная, 1-, 2- и 3-суточная культура *A. punctata* на МПЖ, «пестрые ряды» Гисса с посевами различных культур, чашки Петри с посевом воздуха на МПА (инкубация в течение 1 нед для получения колоний пигментных микрококков и сарцин), чашки Петри и МПА в пробирках для самостоятельной работы студентов, готовые микропрепараты, окрашенные метиленовым синим по Граму, Бурри, Леффлеру (жгутики), Ожешко (споры).

**Организация и проведение работы.** I. Морфология бактерий. Микроорганизмы можно изучать в живом и фиксированном, окрашенном состоянии с помощью микроскопа (бактериоскопически), а также при выделении чистых культур на питательных средах (бактериологически).

Бактериоскопически изучают морфологию бактериальной клетки — ее форму, размеры, структуру, различные включения.

Бактерии — одноклеточные организмы, размножающиеся простым делением.

По морфологическим признакам бактерий делят на 3 основные формы: сферическую (шаровидную) — кокки, цилиндрическую (палочковидные) — бактерии, бациллы (аэробы), клостридии (анаэробы) и извитую — вибрионы, спириллы, лептоспиры, спирохеты. Среди кокков в зависимости от характера деления различают мик-

ро-, дипло-, стрепто-, тетра-, стафилококки и сарцины (рис. 47, а—в).

Для бактерий характерна сложная структура, обеспечивающая многообразие их функциональной деятельности. Бактериальная клетка имеет клеточную стенку, цитоплазматическую мембрану,

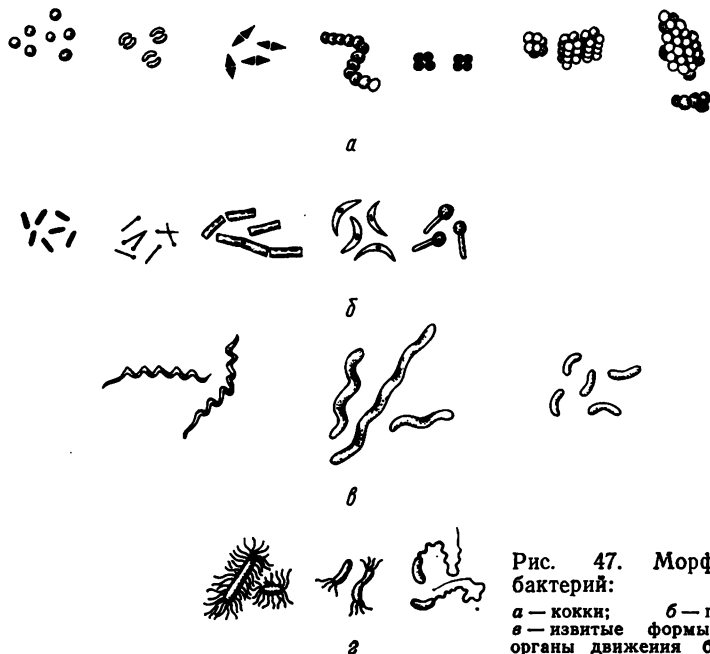


Рис. 47. Морфология бактерий:  
а — кокки; б — палочки;  
в — извитые формы; г — органы движения бактерий

нуклеоид, цитоплазму с различными включениями. Некоторые бактерии в организме или на искусственных питательных средах способны образовывать капсулу — слизистый слой, защищающий клетку от высыхания и других неблагоприятных воздействий внешней среды. Бациллы и клостридии образуют споры, располагающиеся терминально, субтерминально или центрально. У бактерий, способных активно двигаться, есть жгутики, количество и расположение которых являются важным диагностическим признаком. Жгутики могут располагаться полярно (монотрихи — один жгутик, лофотрихи — пучок жгутиков) или по всей поверхности клетки (перитрихи) (рис. 47, г). Однако не все бактерии, не имеющие жгутиков, являются неподвижными. Безжгутиковые миксобактерии, выделяя огромное количество слизи, обладают способностью к скользящему движению.

Подвижность живых бактерий можно изучать на полужидком агаре (неподвижные бактерии растут строго по уколу, подвижные — по всей среде, вызывая ее помутнение) или по методу «висячей» и «раздавленной» капли.

Метод «висячей» капли. Край чистого покровного стекла смазывают вазелином, в центр наносят каплю суточной бактериальной культуры (лучше бульонной) и накрывают предметным стеклом с луночкой так, чтобы капля находилась в центре лунки. Затем препарат быстро переворачивают покровным стеклом вверх так, чтобы капля провисла над лункой, не касаясь дна и краев. При малом увеличении находят край капли, устанавливают большое увеличение, микроскопируют при слегка опущенном конденсоре.

Метод «раздавленной» капли. На поверхность чистого предметного стекла наносят каплю суточной бульонной культуры и осторожно накрывают покровным стеклом, чтобы не было пузырьков воздуха и капля не выходила за края покровного стекла. Микроскопируют при большом увеличении и опущенном конденсоре.

Для изучения морфологии бактерий из них готовят фиксированные мазки и окрашивают. Окраска бактерий — сложный физико-химический процесс взаимодействия бактериальной клетки с различными красителями. Отношение микроорганизмов к красителям характеризует их тинкториальные свойства. Для окраски микроорганизмов используют основные красители: метиленовый синий, генцианвиолет, кристаллвиолет, везувин, хризоидин и др. При изучении структурных элементов клетки применяют нейтральные и кислые краски.

Различают простые и сложные методы окраски. При простых методах окраски используют один краситель, чаще всего метиленовый синий или основной фуксин, когда нужно убедиться в чистоте бактериальной культуры или изучить морфологию клетки. Сложные методы окраски, включающие несколько этапов с использованием различных красителей, позволяют изучить структуру бактериальной клетки.

1. Приготовление фиксированных препаратов. На чистое обезжиренное предметное стекло наносят каплю воды или физиологического раствора, в которую петлей вносят исследуемый материал и осторожно круговыми движениями равномерно тонким слоем распределяют по поверхности стекла, чтобы получился мазок диаметром 1—1,5 см. Бульонную культуру наносят и равномерно распределяют по стеклу с помощью пастеровской пипетки.

При исследовании крови, взятой из сердца или хвостовой вены, первую каплю стряхивают, а вторую наносят на поверхность предметного стекла ближе к правому краю. Затем стеклом со шлифованным краем под углом 45° прикасаются к капле крови, чтобы она растекалась по внутреннему краю стекла, и движением шлифованного стекла влево растирают каплю. Получается тонкий равномерный мазок крови (см. рис. 22).

Для получения мазков-отпечатков из паренхиматозных органов отрезанный кусочек органа, который держат пинцетом, проводят сквозь пламя спиртовки, чтобы запеклась «корочка». Затем стерильным скальпелем рассекают кусочек и свежесрезанной поверхностью несколько раз прикасаются к предметному стеклу. На одном стекле можно получить до 8 мазков-отпечатков.

Мазки подсушивают на воздухе, после чего фиксируют. Мазки крови, мазки-отпечатки из органов и тканей фиксируют в метиловом спирте в течение 20 мин, смеси Никифорова (этиловый спирт + эфир 1:1) — в течение 20 мин или спирт-формоле (5 мл 40%-ного формалина, 95 мл 96°-ного этилового спирта) — в течение 15 мин.

Мазки из бактериальных культур в течение 15 мин фиксируют или в жидкости Карнуа (60 мл 96°-ного этилового спирта, 30 мл хлороформа, 10 мл ледяной уксусной кислоты), или на огне. При фиксации на огне препарат мазком кверху медленными круговыми движениями в течение 5—6 с 3 раза проводят сквозь пламя спиртовки. После фиксации на огне для контроля нижней стороной препарата можно прикоснуться к тыльной стороне кисти: должно ощущаться легкое жжение. Если стекло очень горячее, то препарат передержан и бактерии будут деформированы, если холодный, — фиксация не произошла и препарат при окрашивании может смыться водой.

2. Окраска мазков. При простом методе фиксированный препарат окрашивают фуксином Пфейфера (в течение 2 мин) или метиленовым синим (в течение 3—5 мин), промывают водой, подсушивают и микроскопируют с иммерсией.

При сложных методах окраски на препарат последовательно наносят различные красители, что позволяет выявить структуру клетки и дифференцировать различные виды микроорганизмов.

Наиболее широкое применение находит метод окраски по Граму, с помощью которого все микроорганизмы делят на две большие группы — грамотрицательные и грамположительные.

Окраска по Граму. На фиксированный препарат кладут кусочек фильтровальной бумаги и на 1—2 мин наносят избыток раствора генцианвиолета или кристаллвиолета. Снимают фильтровальную бумагу, сливают краску и, не промывая, наливают раствор Люголя до полного почернения препарата. Сливают раствор Люголя, пинцетом берут препарат за край стекла и погружают в стаканчик со спиртом, затем поднимают и опускают стекло до прекращения появления струек краски. Мазок тщательно промывают водой. В течение 2—3 мин докрашивают мазок фуксином Пфейфера. Сливают краску, мазок тщательно промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсией.

Грамположительные микробы, содержащиеся в цитоплазме больше РНК и белков, при обработке генцианвиолетом и раствором Люголя образуют с белками цитоплазмы прочное содинение красителя и йода, не обесцвечивающееся спиртом. Поэтому грамположительные микробы окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, а грамотрицательные микробы, обесцвечивающиеся спиртом, докрашиваются фуксином в розово-красный цвет.

При окраске по Граму в модификации Синева генцианвиолетом пропитывают полоски фильтровальной бумаги, которые после высушивания могут в течение длительного времени храниться в банках из темного стекла.

Окраска кислотоустойчивых бактерий по Циль-Нильсену. На фиксированный в пламени мазок из микобактерий кладут кусочек фильтровальной бумаги, наливают с избытком фуксин Циля и нагревают над пламенем спиртовки до появления паров. Охлаждают препарат, снимают бумажку и промывают мазок водой. Обесцвечивают мазок 5%-ной серной кислотой до появления желтоватого оттенка, после чего тщательно промывают и ополаскивают 96°-ным спиртом. Промывают препарат водой и докрашивают его в течение 3—5 мин метиленовым синим Леффлера. Затем промывают его водой, подсушивают и микроскопируют с иммерсией.

Микобактерии получают рубиново-красными, остальные микроорганизмы — синими.

Окраска по Романовскому — Гимза. Этим способом лучше всего окрашивать мазки крови и мазки-отпечатки из паренхиматозных органов и тканей.

Перед окрашиванием к 10 мл дистиллированной воды (рН 7,0—7,2) прибавляют 10 капель готового красителя Романовского — Гимза. В чашку Петри кладут 2 кусочка стекла, на них помещают мазком вниз препарат и выливают краску. Через 1 ч краску сливают, препарат промывают водой и высушивают на воздухе.

В состав красителя Романовского — Гимза входят азур, эозин и метиленовый синий, поэтому цитоплазма форменных элементов тканей и крови окрашивается в голубовато-синий цвет, ядра клеток и микроорганизмы — в фиолетово-красный.

Окраска капсул бактерий по Боголепову. На предметное стекло справа наносят каплю 2%-ного раствора колларгола. Бактериологической петлей набирают немного культуры над конденсатом и помещают рядом с каплей раствора колларгола, суспендируют каплю культуры, постепенно вводят колларгол. Хорошо смешав обе капли, стеклом со шлифованным краем делают мазок так же, как и мазок крови. Подсушивают и микроскопируют с иммерсией. На желто-коричневом фоне ярко выделяются бесцветные капсулы (табл. VI, цв. вклейка).

Окраска капсул по способу Бурри-Гинса. Вместо 2%-ного раствора колларгола используют черную тушь (морозостойкую), разведенную в соотношении 1:10. Мазок делают так же, как при окраске капсул бактерий по Боголепову, фиксируют смесью Никифорова или метиловым спиртом, промывают водой, докрашивают в течение 3—5 мин карболовым фуксином Циля, разведенным водой в соотношении 1:3. Затем промывают препарат водой, подсушивают и микроскопируют с иммерсией.

Фон препарата темный, дымчатый, капсулы неокрашенные, находящиеся внутри бактерии ярко-малинового цвета (см. табл. VI, цв. вклейка).

Окраска жгутиков требует особой тщательности и аккуратности в проведении всех операций, так как жгутики очень легко отрываются от бактериальной клетки. Разработано несколько методов окраски жгутиков (Леффлера, Бениньетти, Шимвелла), однако

сущность всех их заключается в искусственном увеличении размеров жгутиков за счет нанесения на них протравы.

**Метод Леффлера.** Берут 18-часовую агаровую культуру исследуемого микроба, запаянной пастеровской пипеткой захватывают немного культуры над конденсатом (край пробирки и пипетку не обжигают), осторожно опускают пипетку в пробирку с 5—6 мл водопроводной воды той же температуры, при которой выращивают микроорганизм, и оставляют до тех пор, пока бактериальная масса не суспендируется в воде. Суспензия должна быть почти прозрачной.

На чистое обезжиренное стекло наносят каплю суспензии и прибавляют к ней каплю 2%-ного раствора осмиевой кислоты, осторожно смешивают и накрывают стеклом.

Чистое покровное стекло берут пинцетом и медленно проводят 3—4 раза через пламя спиртовки. После остывания стекла пастеровской пипеткой с очень тонко оттянутым концом набирают немного суспензии из часового стекла и на обожженную поверхность покровного стекла наносят 5 небольших капелек: 1 — в центре, 4 — по углам. После подсыхания капелек стекло, зажав пинцетом, 1 раз быстро проводят через пламя спиртовки.

Затем готовят протраву: 1 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина (1 г основного фуксина в пробирке заливают 10 мл 96%-ного этилового спирта и ставят на 1—2 ч в термостат), 10 мл 20%-ного водного раствора танина, 5,5 мл насыщенного на холоде водного раствора соли Мора (сернокислое закисное аммиачное железо). Протрава будет лучшего качества при созревании в течение 1 сут и более. Перед употреблением ее фильтруют через складчатый бумажный фильтр. При плохих результатах протраву подщелачивают 1 н. едким натром (10 мл протравы + 0,1—0,2 мл едкого натра).

Окраску жгутиков осуществляют в два этапа: 1) протравливание жгутиков для увеличения их размеров, 2) окраска протравленного препарата одной из основных красок.

На фиксированный препарат наливают в избытке профильтрованную протраву, но так, чтобы она не стекала со стекла. Через 10—15 мин препарат промывают дистиллированной водой до полного удаления протравы. Оставшуюся на краях покровного стекла кромку подсохшей краски осторожно снимают небольшим влажным ватным тампоном, после чего препарат еще раз промывают дистиллированной водой.

На часовое стекло помещают мазком вниз препарат и приливают профильтрованный карболовый фуксин Циля, наполовину разбавленный водой. Через 2—5 мин препарат промывают, высушивают и помещают на предметное стекло с канадским бальзамом.

Просматривают все 5 капелек, так как часто жгутики хорошо прокрашиваются в каком-либо одном участке препарата.

**Метод Бениньетти.** Подготовка препарата такая же, как и в предыдущем методе. Протраву и окраску проводят одновременно раствором, который готовят перед употреблением.

Готовят смесь из 5 мл раствора I (1 г сернокислого цинка, 10 г танина, 100 мл дистиллированной воды) и 3 мл насыщенного спиртового раствора генцианвиолета, наливают на препарат и нагревают до отхождения паров. После этого препарат тщательно промывают водой, высушивают и микроскопируют с иммерсией. Удачные препараты помещают в бальзам.

**Метод Шимвелла.** Приготовленный вышеуказанным способом мазок подсушивают на воздухе и фиксируют парами 40%-ного формалина в течение 3—5 мин, для чего препарат помещают в чашку Петри на 2 кусочка стекла или 2 спички над двумя каплями формалина.

Фиксированный препарат обрабатывают раствором I\*, затем его сливают, препарат промывают раствором II\*\*, им же заливают на 7—10 мин, сливают и промывают водой. После этого препарат ополаскивают 1%-ным водным раствором кристаллвиолета и этим же красителем осторожно окрашивают над пламенем спиртовки до появления слабого отхождения паров в течение 3—5 мин. Препарат промывают, высушивают и микроскопируют с иммерсией.

Клетки бактерий окрашиваются в ярко-фиолетовый цвет, жгутики имеют вид тонких сиреневых нитей.

**II. Физиология бактерий.** По типу питания патогенные для рыб бактерии относятся к гетеротрофам — микроорганизмам, использующим в качестве источника углерода только готовые для усвоения органические соединения. Гетеротрофы могут быть сапрофитами, живущими и развивающимися на мертвых органических субстратах, и паразитами, живущими и размножающимися в живых организмах. В зависимости от условий существования одни и те же микроорганизмы могут быть то сапрофитами, то паразитами, поэтому четкой границы между ними провести нельзя.

По характеру дыхания все микробы делятся на аэробы и анаэробы.

У аэробов процесс дыхания протекает по типу окислительной реакции, для чего необходим кислород.

Анаэробы необходимую для жизнедеятельности энергию получают при расщеплении органических и неорганических соединений, входящих в состав питательной среды.

Существуют облигатные (строгие) аэробы (возбудитель холеры) и анаэробы (возбудитель газовой гангрены), которые могут развиваться только в аэробных или анаэробных условиях, и факультативные анаэробы, которые в зависимости от условий обитания могут менять аэробный тип дыхания на анаэробный. К этой группе относится большинство возбудителей болезней рыб.

**III. Выделение и идентификация бактерий.** Выбор метода культивирования бактерий зависит от типа питания и дыхания. Для

---

\* Раствор I: 20 мл 10%-ного водного раствора танина, 7 мл 6%-ного водного раствора хлорида железа.

\*\* Раствор II: 4 мл раствора I, 0,5 мл 1%-ного водного раствора кристаллвиолета, 2 мл 40%-ного формалина (растворы перед употреблением следует профильтровать).

определения видовой принадлежности возбудителя недостаточно одного микроскопирования: необходимо выделить и провести идентификацию чистой культуры.

Микроорганизмы, выращенные из одной колонии на плотной или жидкой питательной среде, называют чистой культурой. Изолированное скопление бактерий одного вида на плотной питательной среде, образовавшееся при размножении нескольких клеток, называют колонией. Культуры микробов одного вида, выделенные из одного или разных источников, называют штаммами. Совокупность микроорганизмов, имеющих единые происхождение и генотип, сходных по морфологическим и функциональным признакам, называют видом. Внутри одного вида могут быть разновидности микроорганизмов, отличающиеся друг от друга по некоторым признакам: типы, подвиды или варианты.

Систематическое положение бактериальной культуры устанавливают, изучая ее таксономические свойства: морфологические, тинкториальные, культуральные, ферментативные, антигенные и др.

Морфологические и тинкториальные свойства бактерий изучают при микроскопии мазков, окрашенных различными методами.

Культуральные свойства характеризуют по росту бактерий на различных плотных и жидких питательных средах. Колонии микроорганизмов, вырастающие на плотных питательных средах, характеризуют по величине (крупные, средние, мелкие, росинчатые), форме (круглые, неправильной формы, многолопастные), прозрачности (прозрачные, полупрозрачные), цвету (матовые, с пигментом), влажности (сухие, влажные, слизистые), поверхности (плоские, вогнутые, выпуклые, плосковыпуклые, гладкие, морщинистые, исчерченные), структуре и консистенции (аморфная, зернистая, волокнистая, плотная, мягкая) и др.

На скошенном питательном агаре рост может быть влажным, ползучим, сухим, морщинистым, слизистым, пигментированным; на МПБ — диффузным, придонным, пристеночным, с образованием пленки (тонкой, морщинистой, с «тяжами», спадающей вниз), осадка (в виде комочка ваты, аморфного).

Ферментативные свойства (в основном сахаролитические и протеолитические) изучают на различных дифференциально-диагностических средах (среды Гисса, МПЖ, лакмусовое молоко и др.).

В лабораторной практике для производства посевов на питательные среды чаще всего используют бактериологическую петлю из платиновой или нихромовой проволоки длиной 6—8 см, один конец которой загнут в виде небольшой (1,5—2 мм) петли, другой зажат в специальном петледержателе. Бактериологической петлей можно делать посевы как на плотные, так и на жидкие среды в чашках Петри и пробирках. Кроме петли посев на плотные среды в чашках Петри можно осуществлять с помощью стеклянного и металлического шпателей, на жидкие среды — с помощью пастеровских или градуированных пипеток.

Для того чтобы пересеять бактериальную культуру из пробирки в пробирку со скошенным агаром, в левую руку берут обе пробир-

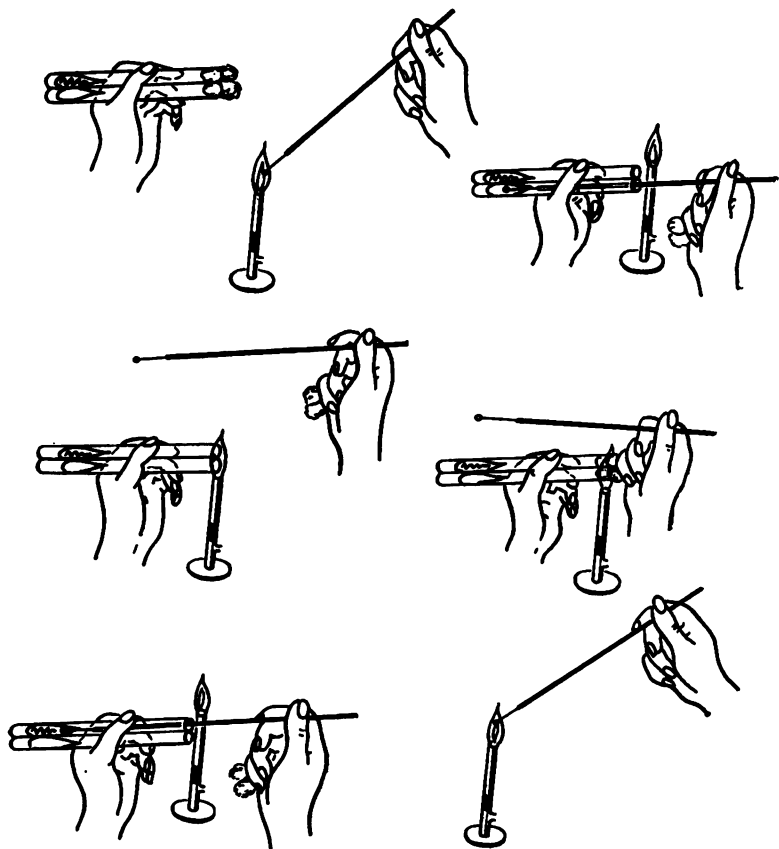


Рис. 48. Пересев культуры бактерий из пробирки в пробирку бактериологической петлей (из Лабинской, 1978)

ки так, чтобы скошенная поверхность агара была обращена вверх. Находящуюся в правой руке бактериологическую петлю тщательно прокаливают, проводя сквозь пламя и фиксирующую часть петледержателя, и у пламени спиртовки мизинцем правой руки открывают обе пробки, фламбируют края пробирок, набирают петлей часть бактериальной культуры и штрихом пересевают ее во вторую пробирку — от конденсата вверх. Вынув петлю из второй пробирки, повторно фламбируют края пробирок, проводят сквозь пламя пробки, закрывают пробирки и стерилизуют петлю прокаливанием (рис. 48). На пробирках с посевами указывают дату и номер или наименование культуры и ставят в штатив.

Вынув пипетку из пакета или пенала, быстро проводят ее сквозь пламя спиртовки, обжигают вату, так как ее торчащие волокна будут мешать плотному прилеганию пальца к отверстию и жидкость из пипетки может вылиться.

Пересев из одной пробирки в другую с жидкой средой осуществляют так же, как и с петлей, только в правой руке вместо петли держат пипетку большим и средним пальцами, а указательным пальцем тщательно зажимают отверстие при переносе пипетки из одной пробирки в другую (рис. 49). Исползованную пипетку опускают в цилиндр с дезинфицирующим раствором. Аналогично производят посев и пастеровской пипеткой, предварительно обломав и профлампировав капилляр.

Бактериологические исследования состоят из нескольких этапов: посев патологического материала на питательные среды; выделение чистой культуры; идентификация (определение) выделенной культуры.

Самым важным моментом при посеве патологического материала является получение изолированных колоний микроорганизмов, при посеве которых на элективные и дифференциально-диагностические среды можно обнаружить и изучить возбудителя заболевания.

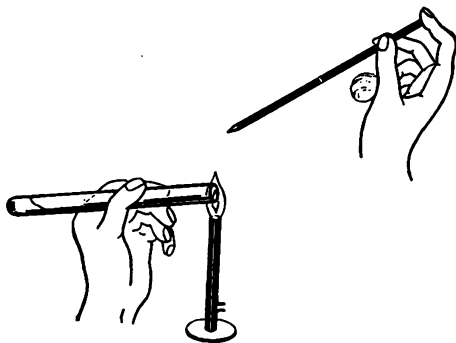


Рис. 49. Посев культуры бактерий с помощью пипетки

В некоторых случаях посев исходного материала производят петлей: густо заштриховывают небольшой участок агаровой среды, затем засевают оставшуюся часть среды параллельными штрихами или секторами — от края к центру. В зоне последних штрихов отмечают рост изолированных колоний.

По методу Дригальского в центре чашки петлей или пипеткой наносят исследуемый материал и равномерно растирают шпатель. Затем этим же шпателем растирают материал на 2-й и 3-й чашках. После посева чашку надписывают и ставят в термостат, вверх дном, чтобы образующийся конденсат не стекал на посевы и колонии не расплывались.

Через 24—48 ч чашки просматривают, изучают изолированные колонии, обращая внимание на их форму, величину, консистенцию и другие признаки. Из колоний преобладающего типа делают мазок, окрашивают его по Граму и микроскопируют для определения морфологии клеток и тинкториальных свойств. Оставшуюся часть колоний микроорганизмов, подлежащих дальнейшему изучению, пересевают, не задевая окружающих колоний, в отдельные пробирки со скошенным МПА или другой средой.

На следующий день отмечают характер роста выделенной культуры, проверяют ее чистоту при микроскопировании. При наличии в мазке однородных бактериальных клеток культуру считают чистой и приступают к ее идентификации.

## Порядок проведения работы следующий.

Демонстрации. 1. Готовые препараты с мазками по Граму кишечной палочки, стафилококка, вибриона, сенной палочки. Обращают внимание на морфологические и тинкториальные различия микроорганизмов.

2. Готовые препараты с окрашенными жгутиками и спорами.

3. Чашки с посевами воздуха на МПА, *Aeromonas salmonicida*. Обращают внимание на наличие пигмента: микрококки образуют пигмент, окрашивающий колонии, *A. salmonicida* — пигмент, диффундирующий в агар.

4. Рост различных микроорганизмов на дифференциально-диагностических средах. Обращают внимание на ферментативные особенности: наличие и отсутствие газообразования, кислотообразование, щелочение сред; протеолитическую активность, характер роста на полужидком агаре подвижных и неподвижных культур.

5. Техника посева на плотные и жидкие среды бактериологической петлей и пипетками.

Самостоятельная работа. 1. Приготовление «висячей» капли. На чистые обезжиренные покровные стекла наносят по одной капле суточных бульонных культур стафилококка и вибриона. Края стекла аккуратно (спичкой) смазывают вазелином, сверху накрывают стеклом с лункой так, чтобы капля была в центре лунки, слегка надавливают, чтобы покровное стекло приклеилось. Быстрым движением переворачивают препарат покровным стеклом вверх, чтобы капля провисла над лункой. Кладут препарат на предметный столик микроскопа МББ и при малом увеличении находят край капли, затем при большом увеличении опускают конденсор до получения затененного поля зрения и, глядя в окуляр, вращая макровинт и слегка поднимая и опуская конденсор, добиваются четкого появления светлых бактерий. Обращают внимание на характер движения подвижных и неподвижных микроорганизмов: неподвижные стафилококки хаотически «толкуются» на месте в результате броуновского движения молекул воды; подвижные вибрионы пересекают поле зрения в разных направлениях.

2. Приготовление мазка и окраска по Граму. На предметное стекло наносят небольшую каплю физиологического раствора. Затем прокаленной и охлажденной о внутреннюю стенку пробирки петлей берут небольшое количество суточной агаровой культуры стафилококка и наносят на поверхность стекла рядом с каплей физиологического раствора, прожигают петлю и также берут культуру кишечной палочки. Обе капли культуры тщательно смешивают с каплей физиологического раствора и аккуратными круговыми движениями тонким слоем растирают по стеклу, держат на воздухе до высыхания и фиксируют на огне. Окрашивают по Граму и микроскопируют с иммерсией: на мазок наносят каплю иммерсионного масла и помещают препарат на предметный столик микроскопа МББ. Проверив при малом увеличении освещенность поля зрения, в центр переводят объектив ОИ-90. Вращая макровинт, глядя сбо-

ку, опускают тубус микроскопа, пока объектив не прикоснется к капле масла, после чего, глядя в окуляр и вращая микровинт, добиваются четкого изображения препарата. На данном мазке одновременно окрашиваются грамтрицательная кишечная палочка и грамположительный стафилококк.

3. Окраска капсул по Боголепову. На предметное стекло наносят каплю 2%-ного колларгола и рядом с ней — каплю суточной агаровой культуры *Klebsiella*, тщательно смешивают капли, делают мазок и микроскопируют с иммерсией. На желто-коричневом фоне четко выделяются непрокрашенные капсулы.

4. Приготовление посева культуры кишечной палочки. Осуществляют посев культуры кишечной палочки из пробирки в пробирку со скошенным агаром с помощью петли, из пробирки в пробирку с МПБ — с помощью пипетки, в чашку Петри — с помощью петли.

Результаты опытов и демонстрации описывают и зарисовывают в рабочей тетради.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 27, 39, 55]

1. Методы изучения микроорганизмов.
2. Что такое бактерии?
3. Строение бактерий.
4. Каким образом осуществляется движение бактерий?
5. Каковы методы окраски бактерий?
6. Как изучить подвижность бактерий?
7. Как приготовить микроскопический препарат?
8. Характер питания патогенных для рыб бактерий.
9. Типы дыхания бактерий.
10. Дать характеристику вида, штамма, чистой культуры, колонии.
11. Методика посева на плотные и жидкие питательные среды.
12. Каковы этапы бактериологического исследования?
13. Методика получения изолированных колоний.

### Занятие 15. Изучение возбудителей бактериальных болезней рыб

**Содержание.** Ознакомление с основными группами патогенных для рыб бактерий, изучение их морфологических, тинкториальных, культуральных и ферментативных свойств.

**Материальное обеспечение.** 1. См. занятие 14. 2. Бульонные и агаровые культуры микроорганизмов, патогенных для рыб, «пестрые ряды» Гисса с МПЖ и лакмусовым молоком, готовые препараты аэромонад, вибрионов, миксобактерий, эдвардсиелл, окрашенных по Граму, цветные карандаши.

**Организация и проведение работы.** Бактерии могут не только играть роль вторичных, вторичных возбудителей, но и быть этиологическими агентами при ряде инфекционных болезней рыб.

В настоящее время в качестве патогенных для рыб агентов признаны представители семейств *Pseudomonadaceae* (род *Pseudomonas*), *Enterobacteriaceae* (роды *Edwardsiellae*, *Protea*), *Vibrionaceae* (роды *Aeromonas*, *Vibrio*), порядка *Muxobacterialis* (роды *Flexibacter*, *Cytophaga*), *Actinomycetalis* (роды *Mycobacterium*, *Nocardia*) и др.

Представителей этих родов различают по морфологическим, тинкториальным, культуральным и ферментативным свойствам. (табл. 9).

Характеристика патогенных для рыб бактерий

Таблица 9

Заблевание	Возбудитель	Окраска по Граму, форма, величина	Подвижность, жгутики	Оптимальная температура, °С	Тип дыхания	Пигментообразование	Рост на	
							МПА	МПА
1			4	5	6	7	8	9
Эдвардселлез	<i>Edwardsiella tarda</i>	Грам (-) палочки, $0,6 \times 2,0$ мкм	+ перитрих	25—30	Факультативный анаэроб	—	Равномерные помутнения незначительным белым осадком	Рост замедленный, через 24 ч колонии диаметром около 1 мм, полупрозрачные, выпуклые, влажные, блестящие, внутри серые
Гемофилез лососевых	<i>Haemophilus piscium</i>	Грам (-) палочки, $0,8 \times 1 \div 3$ мкм	—	20—25	То же	Колонии кремоватого цвета	Муть, постепенно превращающаяся в зернистую массу, оседающую на стенки и дно пробирки	Колонии круглые, гладкие, выпуклые, непрозрачные
Бактериальная печеночная болезнь лососевых	<i>Соругебактериум салмонелин</i>	Грам (+) дидобактерии, $0,4 \times 0,8$ мкм	—	18	»	—	Растет на специальных средах	
Фурункулез лососевых	<i>Aeromonas salmonicida</i> var. <i>salmonicida</i>	Грам (-) палочки, $0,5 \times 1 \div 2$ мкм	—	20—25	»	Коричневый пигмент	Тонкая пленка, осадок, бульон прозрачный, через 3—4 сут. коричневый пигмент	Матовые утолщенные колонии
	<i>A. s. var. masoucida</i>	То же	—	20—25	»	Замедленное пигментообразование или отсутствие пигмента	Тонкая пленка, осадок, бульон прозрачный	То же

сорта	МПЖ		лактозное Молоко	Гидролиз крахмала	Индол	Серо-водород	Цинк-хром-оксидаза	Среды с углеводами и спиртами					
	картофель	картофель						лактозное Молоко	глюкоза	лак-тоза	сахара-роза	маннит	мальтоза
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
—	—	Не изменяет	—	+	+	—	кг	—	—	—	к	—	.
.	—	.	.	—	—	.	к	—	к	—	.	—	.
	+	.	.	+	—	—	—	—	—	—	—	—	.
Растет на щелочном картофеле	Разжижение кратером или послонное	Не изменяет	+	—	—	+	кг	—	—	кг	кг	кг	—
То же	То же	То же	.	+	+	+	.	.	.	.	.	.	к

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Эритродерматит карпов, язвенная болезнь золотых рыбок	<i>A. s. var. achromogenes</i>	»	—	20—25	»	То же	То же	»
Септические заболевания, вызываемые подвижными аэромонадами и псевдомонадами	<i>A. punctata</i>	Грам (—) палочки, 0,5—0,8 × 0,8—2,0 мкм То же	+ монотрих	20—25	»	—	Нежная пленка, муть, хлопья  То же	Полупрозрачные, слегка голубоватые или беловато-матовые колонии То же
	<i>A. hydrophila (liquefaciens)</i>	То же	+ монотрих	20—25	»	—	То же	То же
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Грам (—) палочки, 0,4—0,5 × 0,7—1,0 мкм	+ лофотрих	20—25	Аэроб	Желто-зеленый флюоресцирующий пигмент	Нежная пленка, муть, зеленая флюоресценция	Влажные, блестящие, полупрозрачные колонии с желто-зеленой пигментацией То же
	<i>Ps. putida</i>	Грам (—) палочки, 0,5—0,8 × 1,0—2,0 мкм	+ лофотрих	25	Факультативный анаэроб	То же	То же	То же
Вибриоз	<i>Vibrio anguillarum</i>	Грам (—) вибрион, 0,8 × 1,5 мкм	+ монотрих	18—25	Аэроб	—	Равномерное помутнение, хорошо растет при наличии 1—7% хлорида натрия	Слизистые, прозрачные, затем серовато-желтые колонии
Болезнь колюнарис	<i>Flexibacter coluvaris</i>	Грам (—) палочки, 0,7 × 5—17 мкм	Жгутиков нет, скольжение	27—28	Строгий аэроб	Желтовато-зеленый пигмент	Растут на специальных средах	
Холодноводная болезнь	<i>Cytophaga psychrophila</i>	Грам (—) палочки, 0,75 × 3—7,5 мкм	То же	15—20	То же	То же	То же	То же

Условные обозначения: грам(—) грамотрицательные бактерии; грам (+) грамположительные бактерии; «+» — реакция положительная; d — реакция и газа; к — ферментация с образованием кислоты.

10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
«	«	«	.	+	-	+	к	-	к	-	к	-	.
Желтоватый налет	Разжижение вонкой	Покраснение, свертывание, лептонизация	+	-	(+)	+	кг кг кг кг кг	кг к - кг,	кг кг d d	кг кг кг кг кг	кг кг кг кг к	кг к (к) - d	кг
Толстый сероватый налет	Разжижение вонкой	Подщелачивание	-	-	(+)	+	- к к к к	- - - -	- - - к -	- - - -	- - - к -	- - - к -	.
Нежный, от серого до коричневого слизистый налет	-	»	-	+	(-)	+	к к к к	- - - -	- - - к -	- - - -	- - - к -	- - - к -	.
Желтый или кремовато-желтый налет	Послойное разжижение	Не изменяет	+	+	-	+	к к к к	- - - -	к - - к	к к к к	к к к к	- - -	.
	+	Коагуляция	-	+	+	+	к к к к	- - - -	к - - к	к к к к	к к к к	- - -	.

ция вариабельная; «→» — реакция отриц.; . . . . . ; . — данных нет; (+) — реакция замедленная; кг — ферментация с образованием кислоты

Порядок проведения работы следующий.

I. Демонстрации. 1. Просматривают чашки и «пестрые ряды» с культурами *A. salmonicida*, *A. punctata*, *Ps. fluorescens*, *V. anguillarum*, *Flexibacter columnaris*. Обращают внимание на морфологию колоний, пигментообразование, характер роста на МПБ, изменение МПЖ и лакмусового молока (табл. 9, графы 7, 8, 9, 11, 12). Отмечают у *Flexibacter columnaris* феномен «роения» — растекание колоний, их ризоидный край.

Обращают внимание на различия в росте *A. salmonicida* и *A. punctata* на полужидком агаре и в МПБ. *A. salmonicida* неподвижен, растет по уколу, в бульоне образует придонный осадок. Подвижный *A. punctata* вызывает диффузное помутнение полужидкого агара и бульона.

2. Просматривают готовые мазки *A. salmonicida*, *A. punctata*, *V. anguillarum*, миксобактерий, эдвардсиелл. Обращают внимание на морфологические различия (*A. salmonicida* — укороченная палочка, почти коккоид, *Flexibacter columnaris* — длинная, тонкая, изогнутая палочка).

II. Самостоятельная работа. 1. На основании изучения «слепых» чашек и «пестрых рядов» к ним идентифицируют *A. salmonicida*, *A. punctata*, *V. anguillarum*, *Ps. fluorescens*: изучают морфологию колоний; делают мазок и окрашивают по Граму; готовят препарат «висячая» или «раздавленная» капля; изучают «пестрые ряды».

Результаты идентификации, морфологию колоний и бактерий описывают и зарисовывают в тетради.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 13, 24, 55]

1. К каким порядкам относятся патогенные для рыб бактерии?
2. Какими морфологическими и тинкториальными признаками характеризуются возбудители бактериальных болезней рыб?
3. Какое значение имеет изучение культуральных признаков бактерий?
4. Как изучают подвижность бактерий?
5. Характеристика пигментообразования у различных бактерий (*A. salmonicida*, *Ps. fluorescens*, *Fl. columnaris*).
6. Значение изучения ферментативной характеристики бактерий.

### Занятие 16. Взятие и транспортировка патологического материала

**Содержание.** Ознакомление студентов с правилами асептического вскрытия рыбы, взятием, посевом и транспортировкой патологического материала.

**Материальное обеспечение.** Микроскоп МББ, иммерсионное масло, предметные стекла, стекло со шлифованным краем, смесь Никифорова, метиленовый синий Леффлера или фуксин Пфейфера, ножницы, пинцет, скальпель, инструментарий для вскрытия в стерилизаторе, бактериологическая петля, банка со спиртом для инструментов, 70°-ный спирт для протирания рук, ватные тампоны или марлевые салфетки, смоченные водой для протирания инструментов, стерильные пастеровские пипетки, шпатели, цилиндр и банка с дезинфицирующим раствором, стерильные влажные тампоны в чашке Петри, эмалированная кювета с парафином и препаровальные иглы для фиксирования рыбы, банка с Петри с МПА, карандаш по стеклу.

**Организация и проведение работы.** Правильная диагностика инфекционных заболеваний зависит от времени проведения и качества лабораторных исследований.

Проведение бактериологических исследований имеет ряд особенностей, несоблюдение которых может привести к неправильным выводам.

Прежде всего патологический материал отбирают с соблюдением правил асептики в стерильную посуду, на стерильные среды. Для исследования берут только живую рыбу, так как даже в агональном состоянии, когда проницаемость стенок кишечника и кровеносных сосудов увеличивается, сапрофитная микрофлора быстро проникает во все органы и ткани, затрудняя, а иногда делая невозможным выделение возбудителя заболевания.

Большую рыбу доставляют в лабораторию в молочных бидонах или эмалированных ведрах с крышкой, предварительно профлампированных спиртом и наполненных водой из того же водоема, или в полиэтиленовых пакетах, хорошо промытых и заполненных той же насыщенной кислородом водой.

Температура воды не должна быть выше 10—12°C, для чего в теплое время ее постепенно охлаждают кусочками льда. Рыб с характерными поражениями должно быть не менее 5 экз.

Если рыбу нельзя доставить в живом состоянии в лабораторию, то пораженные органы и ткани помещают в стерильные, плотно закрытые пробками баночки с консервантом<sup>1</sup>. Пробы с сопроводительным документом доставляют в лабораторию с нарочным как можно быстрее (летом не позже чем через 2 ч после взятия проб). Если доставка проб требует более длительного времени, баночки помещают в термос со льдом или посевы осуществляют в рыбоводном хозяйстве.

Рабочее место готовят заблаговременно: кювету для вскрытия рыбы, препаровальные иглы, стерилизатор с инструментами (ножницы, скальпель, пинцет), бактериологическую петлю, спиртовку, спички, баночку со спиртом, ватные тампоны, простерилизованные в чашке Петри, ватные тампоны, смоченные в воде, предметные и шлифованные стекла, пастеровские пипетки, шпатели, смесь Никифорова, полоски фильтровальной бумаги для впитывания крови, стерильные марлевые салфетки в пакетах, баночки и консервант для отбора проб, чашки Петри с МПА, среду Клодницкого, карандаш по стеклу, ручку, журнал для регистрации.

Перед взятием рыбы руки обрабатывают 70°-ным спиртом. Затем осматривают рыбу. При этом отмечают ее вид, возраст, размер и массу, наличие клинических признаков: изменение пигментации, гиперемию, точечные или обширные геморрагии, абсцессы, опухоли, некроз, ерошение чешуи, при язвообразовании — характер язв, состояние жабр (ослизненные, разбухшие, некротизирован-

---

<sup>1</sup> 1 л 0,85%-ного раствора хлорида натрия смешивают с 500 мл глицерина (х. ч.) и прибавляют 20%-ный раствор фосфорнокислого натрия до получения рН 8,0. Стерилизуют при 112°C в течение 10 мин.

ные, бледные, темные), плавников, глаз, наличие асцита, воспаление ануса, выделения из него, характер выделений (гнойные, слизистые, кровянистые).

При наличии язв и фурункулов делают первичный высеv из них. Рыбу обездвигивают (см. рис. 15, 16), заворачивают в стерильную салфетку так, чтобы пораженное место оставалось открытым. Если рыба была только что отловлена, бактериологической петлей берут соскоб с пораженного и для сравнения — со здорового участка тела, засевают на чашки с МПА и среду Клодницкого.

При наличии опухолей, абсцессов, фурункулов с них снимают чешую (если она есть), сверху прижигают участок кожи ватным тампоном, смоченным спиртом, или раскаленным шпательем и через струп проникают в глубину опухоли и насасывают содержимое, затем засевают на чашки с МПА и среду Клодницкого. Язвы, вероятность загрязнения которых посторонней флорой не исключена, промывают вначале стерильным физиологическим раствором или водой, а затем уже берут соскоб, захватывая по возможности и пораженные ткани.

При подозрении на эритродерматит карпа язвы промывают стерильной водой, хорошо протирают стерильным ватным тампоном гиперемизованный участок кожи вокруг язвы, острым скальпелем с помощью пинцета срезают пораженный участок кожи, измельчают стерильными ножницами и помещают в ступку с кварцевым песком. Кусочки кожи тщательно растирают, постепенно приливая изотонический раствор хлорида натрия (примерно десятикратный объем) и после 20-минутного отстаивания несколько капель надосадочной жидкости с помощью пипетки переносят на чашки Петри с агаром «Д» и тщательно растирают шпательем.

1. Исследование крови. Как правило, у здоровой рыбы в крови микроорганизмы или не обнаруживают, или обнаруживают в незначительном количестве. При септическом состоянии они выделяются в больших количествах, поэтому исследованию крови при инфекционных заболеваниях придается большое значение. Кровь можно брать из сердца, хвостовой вены или артерии (занятие 6).

Если по какой-либо причине кровь не удалось взять ни одним из указанных способов, ее берут прямо из сердца после вскрытия рыбы.

Первую каплю крови удаляют стерильным ватным тампоном, затем делают посев на чашки с МПА, среду Клодницкого и делают мазок на предметном стекле.

2. Исследование содержимого нижнего отдела кишечника. Конец пастеровской пипетки надламывают, причем острые края оплавляют на огне, чтобы не повредить стенку кишечника, и вводят в обработанное спиртом анальное отверстие. Содержимое кишечника засевают на чашки с МПА по методу Дригальского и среду Эндо.

3. Исследование при наличии асцита. В местах, где ощущается флюктуация, удаляют чешую, прижигают кожу, делают прокол острым концом пастеровской пипетки, набирают экссудат, из ко-

того делают высеv на чашки с МПА и мазок на предметном стекле.

4. Исследование мозга. У мелких рыб раскаленным шпателью прижигают затылочную часть головы, обломанным концом пастеровской пипетки делают прокол и набирают мозговое вещество для посева. У крупных рыб после прижигания шпателью предварительно делают прокол стерильным скальпелем.

Для исследования внутренних органов необходимо вскрыть брюшную полость. Рыбу или привязывают к доске, обработанной 5<sup>0</sup>/<sub>0</sub>-ным лизолом, или препаровальными иглами фиксируют голову и хвост в кювете с парафином (последнее более удобно, так как парафин легко моется, дезинфицируется и фламбируется).

Рыбу кладут на правый бок брюшком к исследователю, фиксируют, снимают чешую, вытирают слизь ватным тампоном, а вторым тампоном, смоченным спиртом, фламбируют боковую поверхность, острым скальпелем делают надрез средней линии выше анального отверстия, вводят тупую браншу ножниц в разрез и осторожно, стараясь не повредить кишечник, делают разрез вверх, к боковой линии, налево по направлению к голове, вниз к грудному плавнику (см. рис. 17, а, б). Пинцетом отворачивают боковую поверхность, описывают внутренние органы (см. занятие 5).

5. Исследование печени и почек. Участок печени и почек прижигают раскаленной пастеровской пипеткой. Острым концом другой пастеровской пипетки делают прокол и разрыхляют паренхиму. Содержимое пипетки переносят на чашку с МПА и растирают шпателью.

Небольшие органы берут полностью, быстро проводят сквозь пламя спиртовки и над чашкой Петри рассекают стерильным скальпелем. Кусочком, оставшимся на пинцете, делают мазки-отпечатки для прямой микроскопии, остальное растирают шпателью по поверхности агара.

6. Исследование содержимого желчного пузыря. Желчь берут пастеровской пипеткой после прижигания стенки. Если желчный пузырь очень мал, его обрабатывают спиртом, отсекают стерильными ножницами, кладут на поверхность МПА, вскрывают и делают посев содержимого.

7. Количественные исследования. Следует помнить, что многие возбудители болезней рыб являются обитателями водной среды, поэтому в некоторых случаях могут выделяться и от совершенно здоровой рыбы. Это в значительной мере осложняет диагностику и в некоторых случаях заставляет прибегать к количественным исследованиям. Для этого изолированные кусочки паренхиматозных органов помещают в маленькие стерильные бюксы известной массы и взвешивают. Затем пробы переносят в фарфоровые ступки, приливают десятикратное количество стерильного изотонического раствора хлорида натрия и тщательно растирают. После 10—20-минутного отстаивания 0,1 мл надосадочной жидкости высевают на МПА и тщательно растирают шпателью. В качестве контроля для сравнения аналогичным способом делают посеvы из органов

здоровой рыбы. После инкубирования посевов, зная массу исследуемой пробы, количество внесенного в ступку изотонического раствора хлорида натрия и посевную дозу (0,1 мл), делают перерасчет количества выросших колоний микроорганизмов на 1 г исследуемого органа.

Мазки крови и мазки-отпечатки фиксируют в смеси Никифорова, окрашивают в лаборатории и микроскопируют с иммерсией.

Все отмеченные изменения и выполненные работы, номера проб тщательно регистрируют в журнале. Посевы инкубируют в термостате при температуре 25—26°C и ежедневно просматривают, отмечая характер роста.

Порядок проведения работы следующий.

I. Демонстрации. 1. Рыба с различными поражениями (нативный или табличный материал).

2. Стерильное вскрытие рыбы.

II. Самостоятельная работа. Стерильное вскрытие рыбы. Работу выполняют вдвоем. Рыбу фиксируют в кювете с парафином. Из стерилизатора извлекают простерилизованные инструменты (ножницы, пинцет, скальпель) и помещают их в банку со спиртом, вскрывают рыбу.

Стерильным пинцетом отворачивают брюшную стенку и скальпелем осторожно отодвигают внутренние органы, освобождая перегородку околосердечной полости, через которую острым концом пастеровской пипетки проникают в сердце и набирают кровь. Первую каплю удаляют стерильным ватным тампоном, 2—3 капли наносят на поверхность МПА в чашке Петри и 1 каплю — на предметное стекло, из нее ассистент быстро делает мазок шлифованным стеклом, а затем растирает шпатель каплю крови на поверхности МПА.

Прижигают печень, делают прокол капилляром пастеровской пипетки, разрыхляют паренхиму, насасывают в пипетку, выдувают в чашку и растирают шпатель. Аналогично делают посев из почки. От селезенки отсекают небольшой кусочек, проводят его сквозь пламя спиртовки и растирают шпатель по поверхности МПА. Затем делают посев из различных отделов кишечника, прижигая его стенку и прокалывая острым концом пастеровской пипетки.

Результаты вскрытия записывают в рабочей тетради. Чашки с посевами надписывают и ставят в термостат.

Мазки крови и мазки-отпечатки фиксируют в смеси Никифорова в течение 20 мин, окрашивают метиленовым синим Леффлера или фуксином Пфейфера, микроскопируют с иммерсией.

Результаты микроскопирования зарисовывают и записывают.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 13]

1. Каковы основные правила взятия патологического материала?
2. Как оборудовано рабочее место для отбора проб?
3. Внешний осмотр рыбы и взятие материала при наружных повреждениях.
4. Как отбирается для исследования кровь?
5. Как исследуется содержимое кишечника?

6. Как проводится стерильное вскрытие рыбы?
7. Как проводится посев из печени, почек и желчного пузыря?
8. Как проводится количественное бактериологическое исследование?

## Занятие 17. Схема диагностики бактериальных заболеваний

**Содержание.** Ознакомление с последовательностью и методами проведения бактериологических исследований при лабораторной диагностике инфекционных болезней рыб.

**Материальное обеспечение.** Демонстрационная таблица «Схема диагностики бактериальных заболеваний рыб», бактериологическая петля, спиртовка, спички, реактивы для определения теста на цитохромоксидазу (1%-ный спиртовой раствор альфа-нафтола, 1%-ный водный раствор диметилпарафенилендиамингидрохлорида или диметилпарафенилендиаминоксалата), полоски фильтровальной бумаги в чашке Петри, градуированные пипетки, чистые пробирки, цилиндр с дезинфицирующим раствором, чашки с посевами патологического материала с предыдущего занятия, суточная агаровая культура кишечной палочки, 3-суточная культура *V. klebsiella* или *Aerobacter cloaca* на среде Кларка, 0,04%-ный спиртовой раствор метилового красного (реакция MR), 6%-ный спиртовой раствор альфа-нафтола и 16%-ный раствор КОН (реакция Фогес-Проскауэра-VP), «пестрый ряд» для работы студентов, индикаторные бумажки для определения индола.

**Организация и проведение работы.** Для обнаружения бактерий исследуют выделения, органы и ткани рыб, содержащие максимальное количество возбудителя. Исследованию подвергают кровь, экссудат, содержимое абсцессов, опухолей, инфильтратов, отделяемое язв, паренхиматозные органы, прежде всего почки, содержимое кишечника, слизь с жабр и поверхности тела.

Для правильного выбора методов выделения и культивирования возбудителя большое значение имеет сбор сведений о клинических признаках заболевания и эпизоотологических данных (вид рыбы, температура, при которой возникло заболевание, массовость заболевания, условия содержания рыбы и др.). Эти сведения, а также первичный внешний осмотр больных особей позволяют выбрать направление исследования.

Так, например, при наличии большого количества слизи на жабрах, в области спинного или хвостового плавников возможно подозрение на миксобактериоз, а обнаружение на жабрах и в слизи большого количества длинных, тонких грамотрицательных бактерий подтверждает этот диагноз. В этом случае патологический материал засевают на чашки с цитофаг-агаром или МПЖ.

Большинство возбудителей болезней рыб хорошо растут на обычных мясопептонных средах, что, с одной стороны, в значительной мере упрощает диагностику, так как нет необходимости применять большое количество различных сред, с другой — для получения изолированных колоний по методу Дригальского нужно применять большее количество чашек, так как на МПА очень хорошо растет сапрофитная микрофлора.

После осмотра больной рыбы делают мазки для прямой микроскопии и первичный посев исследуемого материала, как указано в занятии 16. При язвенном заболевании культивируемых лососей обязательно производят дополнительный посев на чашку с кровавым агаром, чтобы не упустить *Haemophilus piscium*.

Первичные посевы инкубируют при температуре 20—25°C и просматривают ежедневно, отмечая интенсивность роста и морфологию колоний, которая становится характерной через 48—72 ч. Особый интерес представляют посевы крови, почек, а также посевы из не вскрытых абсцессов, опухолей. Выделение однородной микрофлоры из этих объектов может служить важным диагностическим признаком.

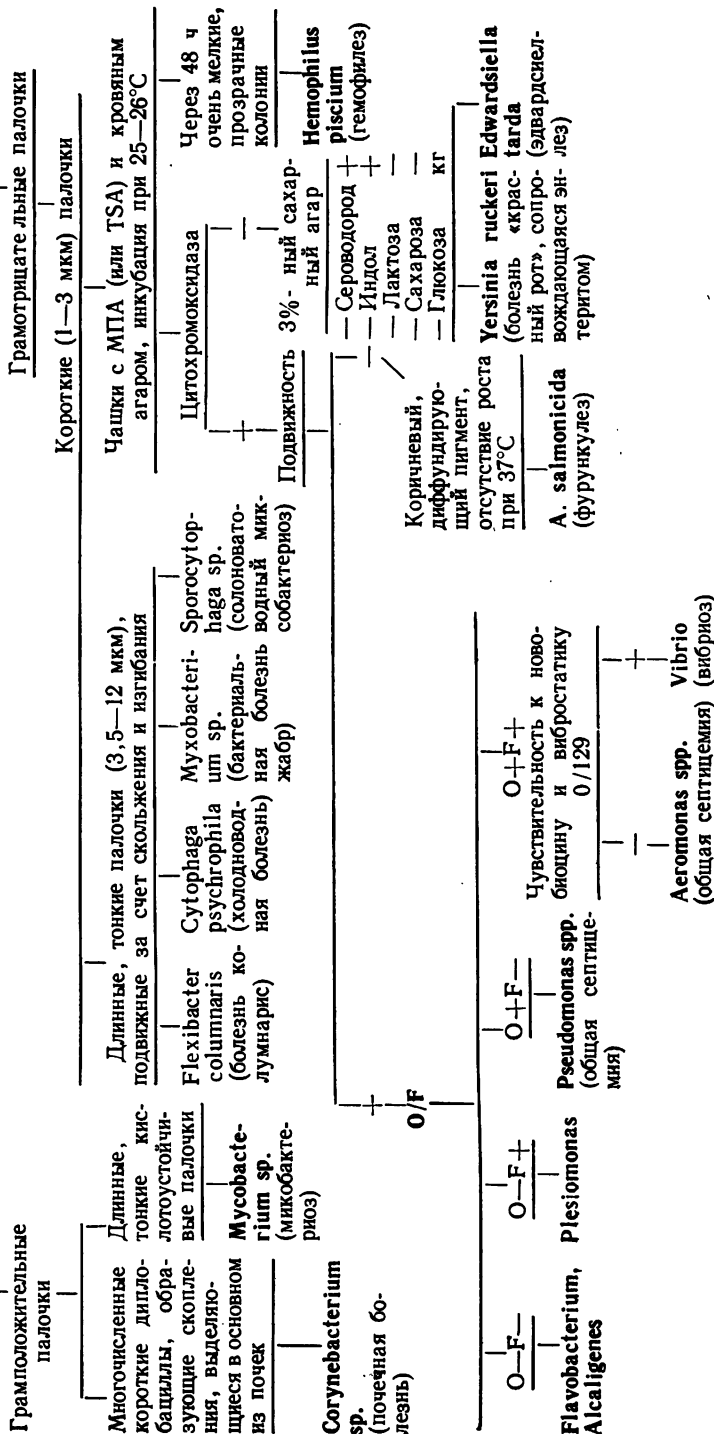
Все микроорганизмы, патогенные для рыб, кроме *N. piscium* и *Edwardsiella tarda*, дают положительную реакцию на цитохромоксидазу, и по этой реакции их можно легко обнаружить и одновременно охарактеризовать массивность выделения этих бактерий. Для этого чашки с посевами опрыскивают смесью 10%-ного спиртового раствора альфа-нафтола и 10%-ного водного раствора диметилпарафенилендиамингидрохлорида, смешанных в соотношении 1:1 непосредственно перед опрыскиванием. Опрыскивание осуществляют или при помощи дозатора для интраназального введения противогриппозной вакцины, или при помощи пульверизатора. В зависимости от применяемого реактива на цитохромоксидазу колонии оксидазоположительных микроорганизмов становятся через 30—40 с синими, розовыми или коричневыми. Изменившие цвет морфологически однородные колонии пересевают на лактозо-сахарозную среду Ресселя или среду Олькеницкого. Через 24 ч инкубирования в термостате посевы просматривают. Эти среды являются дифференциально-диагностическими. На среде Ресселя определяют ферментацию лактозы, сахарозы и газообразование, на среде Олькеницкого — ферментацию глюкозы, лактозы, сахарозы, расщепление мочевины, образование сероводорода и газообразование.

При однотипном изменении сред делают мазки для окраски по Граму и микроскопируют с иммерсией. Если характер ферментации неоднородный, то все посевы группируют и из каждой группы отбирают по 2—3 морфологически и культурально однородные культуры для посева на среду Хью-Лейфсона, на которой определяют характер расщепления глюкозы — окислительный или ферментативный (O/F-тест). Каждую культуру засевают в 2 пробирки со средой, причем одну заливают стерильным вазелиновым маслом для прекращения доступа кислорода. На следующий день по изменению исходного зеленого цвета среды на желтый или синий судят о характере происходящих процессов. Одновременно на этой среде можно определить и подвижность, и газообразование. В зависимости от результатов производят первичную дифференциацию культур до рода (табл. 10). Дополнительную дифференциацию безгазовых вибрионов и аэромонад проводят с помощью аминокислот лизина и аргинина или новобиоцина и вибриостатика O/129. Вид и биотип определяют, пересевая культуру на «пестрый ряд», состоящий из пробирок со средами: полужидкий мясопептонный агар, скошенный мясопептонный агар, две пробирки с мясопептонным бульоном, мясопептонный желатин, глюкоза, лактоза, сахароза, маннит, мальтоза, арабиноза, среда Кларка.

Схема лабораторной диагностики бактериальных болезней рыб  
 Патологический материал, полученный асептически

Таблица 10

Прямая микроскопия



На полужидком МПА дополнительно определяют подвижность, одновременно среда служит для сохранения культуры. На скошенном МПА наблюдают характер роста, пигментообразование и используют его как среду накопления. Одна из пробирок с МПБ служит для определения культуральных свойств микроорганизма, во вторую под пробку вкладывают индикаторные бумажки для определения индола и сероводорода. На МПЖ определяют протеолитическую активность штамма, учет проводят ежедневно, так как характер и активность разжижения желатина являются важными диагностическими признаками.

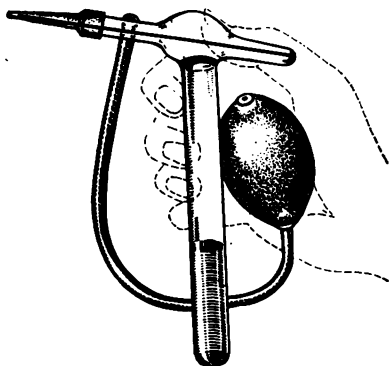


Рис. 50. Дозатор РДЖ-М4, используемый для определения цитохромоксидазы

На среде Кларка определяют активность кислотообразования (реакция с метиловым красным — МР) и продуцирование культурой ацетилметилкарбинола (реакция Фогес-Проскауэра-VP). Для дальнейшего изучения оставляют культуры, выделенные одновременно из крови и различных органов, одинаковые по морфологическим, тинкториальным, культуральным и ферментативным свойствам. Порядок проведения работы таков.

Знакомятся с демонстрационной таблицей «Схема диагностики инфекционных заболеваний».

Просматривают чашки с посевами, сделанными на предыдущем занятии. Описывают морфологию колоний. Выявляют оксидазоположительные колонии. Для экономии реактивов смесью растворов альфа-нафтола и диметилпарафенилендиамина смачивают полоску фильтровальной бумаги, кладут ее в чашку Петри. Прокаленной и охлажденной петлей снимают часть колонии и наносят небольшим штрихом на фильтровальную бумажку. Если штрих синее, культура оксидазоположительная. Таким образом проверяют несколько колоний. Для получения количественной характеристики выросшей микрофлоры смесь реактивов наносят на поверхность среды с помощью распылителя — дозатора жидкости РДЖ-М4 (рис. 50). Колонии оксидазоположительных микроорганизмов синее, остальные остаются без изменения (табл. VII, цв. вклейка).

Посиневшие колонии пересевают на среду Олькеницкого. Штрихом засевают скошенную поверхность снизу вверх, а затем прокалывают столбик петлей до дна.

Пересевают культуру со скошенного агара на «пестрый ряд». Техника посева такая же, как описано выше. Следует помнить, что полужидкий агар и мясопептонный желатин засевают уколом в центре среды, в жидких средах петлю опускают вниз и несколько раз встряхивают. Перед каждой процедурой петлю прокалывают и охлаждают о внутреннюю стенку пробирки.

После посева культуры в пробирку с МПБ пинцетом берут бумажки для определения индол- и сероводородобразования, открывают у спиртовки пробку, фламбируют края пробирки, вкладывают бумажки в пробирку, загибают верхний конец бумажек наружу и, проведя через пламя спиртовки, закрывают пробку. После посева штатив с пробирками ставят в термостат.

Из пробирки с 3-суточной культурой *V. klebsiella* на среде Кларка переносят 1 мл в чистую пробирку, приливают 0,5 мл 6%-ного спиртового раствора альфа-нафтола и 1 мл 16%-ного раствора КОН, пробирку сильно встряхивают и ставят в штатив. При положительном результате через 3—5 мин появляется вишневое окрашивание всей среды или поверхностного слоя. К оставшейся в пробирке среде Кларка добавляют несколько капель 0,04%-ного спиртового раствора метилового красного. При появлении красного окрашивания реакция положительная (+), желтого — отрицательная (—), кирпично-оранжевого — сомнительная (+ —).

Результаты записывают в тетрадь.

#### Контрольные вопросы [4, 42, 51, 52]

1. Каковы источники выделения бактерий при инфекционных заболеваниях рыб?
2. Каково значение клинико-эпизоотологических данных при диагностике инфекционных заболеваний?
3. Каковы этапы бактериологического исследования?
4. Как определять цитохромоксидазу?
5. Как определяют родовую принадлежность бактерий?
6. Как определяют видовую принадлежность бактерий?
7. Какова характеристика результатов посева на «пестрый ряд»?

### Занятие 18. Фурункулез и другие аэромонозы

**Содержание.** Ознакомление учащихся с инфекционными заболеваниями, вызываемыми аэромонадами: возбудителями, клиническими признаками заболевания, методами лабораторной диагностики.

**Материальное обеспечение.** 1. См. занятие 14. 2. Дифференциально-диагностическая таблица бактерий рода *Aeromonas* (по Schubert), чашки с МПА с посевами *A. salmonicida*, *A. punctata*, *A. hydrophila* и «пестрые ряды» к ним, 2-суточная культура *A. punctata* патогенного серотипа на скошенном агаре, агглютинирующая сыворотка, стерильный скошенный агар, «пестрые ряды» для самостоятельной работы студентов.

**Организация и проведение работы.** Представители рода *Aeromonas* сем. *Vibrionaceae* — широко распространенные обитатели воды, патогенные для морских и пресноводных животных. Они могут вызывать среди рыб и других гидробионтов эпизоотии, часто сопровождающиеся высокой летальностью.

По классификации Schubert, включенной в „Определитель бактерий” Берджи (1974), род *Aeromonas* делится на 3 вида: *A. hydrophila*, *A. punctata* и *A. salmonicida* с подвидами (табл. 11).

Аэромонады — граммотрицательные бактерии с одним полярно расположенным жгутиком, обладающие активной подвижностью, за исключением *A. salmonicida*, у которых жгутиков нет.

Дифференциально-диагностические признаки бактерий рода *Aeromonas* (по Schu-  
bert R., из Bergey, 1974)

Тест или субстрат	<i>A. hydrophila</i>			<i>A. punctata</i>		<i>A. salmonicida</i>		
	hydro- phila	anae- rogens	proteo- litica	punc- tata	caviae	salmo- nicida	achro- moge- nes	masou- cida
Рост при 37°C	+—	+	+	+	+	—	—	—
Коричневый водораствори- мый пигмент	—	—	—	—	—	+	—*	—*
Рост в бульоне с 7,5%- ным NaCl	—	—	+	—	—	—	—	—
Бутандиолдегидрогеназа	+	+	+	—	—	+	+	+
Газ на глицерине	+	—	—	—	—	+	—	+
Газ на глюкозе	+**	—**	—	+	—	+	—	+
Индол	+	+	+	+	+	—	+	+
Сероводород	+	+	+	+	+	—	—*	+
Аргинин-дегидролаза	+	+	+	+	+	—	—	—
Лизин-декарбоксилаза	—	—	+	—	—	—	—	+
<b>Биотипы</b>								
VP	+—	+—	+	—	—	—	—	+
Галактоза	+	+	—	+	+	+	+	+
Сахароза	d	+	—	d	+	—	+	+
Маннит	+	+	+	d	+	+	—	+
Арабиноза	d	d	—	d	+	+	—	+

\* Может быть слабоположительная реакция.

\*\* Может быть часть штаммов с отклонениями.

d Различные варианты.

Аэромонады неприхотливы, хорошо растут на простых питательных средах, применяемых в лабораторной практике, и легко могут быть выделены из исследуемых объектов — рыбы и воды.

*A. salmonicida* — возбудитель фурункулеза и эритродерматита карпов. Большинство видов пресноводных и морских рыб чувствительны к этому возбудителю, особенно лососевые.

Предварительный диагноз может быть установлен при выделении грамотрицательных коротких палочек (коккоидов), неподвижных, оксидазоположительных. Первичное выделение может быть произведено при посеве материала из почек или фурункулов (при фурункулезе) и пораженных участков кожи (при эритродерматите) на МПА или бактоагар «Д», на котором через 24—48 ч инкубирования при 25—26°C вырастают слегка уплощенные колонии. Появление через 72—96 ч коричневого водорастворимого пигмента подтверждает диагноз „фурункулез”. Колонии возбудителя эритродерматита желтовато-кремовые. Чтобы не упустить беспигментные подвиды *A. salmonicida* — var *achromogenes* и *A. salmonicida* var. *masoucida*, отличающиеся от *A. salmonicida* var. *salmonicida* и по ферментативным свойствам, кроме изучения пигментообразования и посева на «пестрый ряд», обязательно проверяют способность к

росту при 37°C (температурный тест): *A. salmonicida* при 37°C не растет.

Подвижные аэромонады *A. hydrophila* (*liquefaciens*), *A. punctata* могут вызвать септическое заболевание, регистрируемое под диагнозами «бактериальная геморрагическая септицемия», «геморрагическая септицемия», «инфекционная водянка» и др. Заболевание регистрируется повсеместно и чувствительно к нему, вероятно, все пресноводные рыбы.

Заболевание наиболее часто встречается в теплых водах с высоким содержанием органических веществ, вызывается обычными микроорганизмами воды под влиянием стрессовых факторов и не связывается с наличием рыб — носителей инфекции.

Клинические признаки аэромонадной инфекции не отличаются от таковых при других септицемиях.

Диагноз основывается на выделении и идентификации возбудителя. Первичное выделение производится из крови, асцитической жидкости и почек, посевы инкубируются при 23—25°C в течение 24—48 ч. Полупрозрачные, слегка голубоватые или беловато-матовые влажные колонии средней величины испытывают на наличие цитохромоксидазы. Положительно реагирующие колонии пересевают на среду Хью-Лейфсона и идентифицируют в соответствии со схемой (см. с. 105).

При выделении *A. punctata* культуры проверяют на стекле с поливалентной смесью агглютинирующих сывороток к патогенным серотипам *A. punctata*. Культуры, положительно прореагировавшие со смесью, изучают с отдельными типовыми сыворотками в развернутой реакции агглютинации.

Окончательное заключение об этиологической роли выделенных аэромонад делают после проверки патогенности методом биологической пробы.

Порядок проведения работы следующий.

Просматривают чашки с посевами *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. punctata*. Обращают внимание на морфологию колоний: *A. salmonicida* образует более уплощенные меньших размеров колонии, среда вокруг колоний окрашена в коричневый цвет, колонии *A. punctata* и *A. hydrophila* — более выпуклые, с ровным краем, полупрозрачные.

Просматривают «пестрые ряды» Обращают внимание на характерные различия *A. salmonicida* и *A. punctata* при культивировании на МПБ и полужидком МПА: *A. salmonicida* растет по уколу (культура неподвижная), в пробирке с МПБ образует придонный осадок, бульон остается прозрачным; *A. salmonicida* в отличие от *A. punctata* не образует индола и сероводорода; *A. punctata* вызывает равномерное помутнение обеих сред.

Готовят мазки бульонных культур *A. salmonicida* и *A. punctata* и окрашивают их по Граму. При микроскопировании обращают внимание на более укороченную форму клеток *A. salmonicida*.

Результаты изучения тинкториальных, морфологических и куль-

туральных свойств аэромонад записывают и зарисовывают в тетради.

Ставят реакцию агглютинации на стекле с патогенной культурой *A. punctata* (см. занятие 9).

Оставшуюся часть культуры используют для посева на «пестрый ряд», среду Хью-Лейфсона, скошенный агар для постановки температурного теста.

Проверяют способность использовать глюкозу в качестве источника углерода в аэробных или анаэробных условиях (окисление или ферментация — О/Ф-тест) на среде Хью-Лейфсона. Исследуемую культуру уколом засевают в 2 пробирки с этой средой, одну из пробирок после посева заливают стерильным вазелиновым маслом, столбик которого должен быть не менее 0,5 см. Обе пробирки инкубируют при 25—26°C в течение 4 сут. Результат учитывают по изменению цвета среды. Исходный цвет светло-зеленый. При образовании кислоты среда желтеет (в пробирке без масла — окисление — О+, с маслом — ферментация — F+). При образовании щелочи среда синее. Одновременно на этой среде можно определить подвижность и газообразование по помутнению среды и появлению пузырьков газа.

Определяют температурный тест: культуры *A. salmonicida* и *A. punctata* штрихом засевают каждую на 2 пробирки со скошенным агаром, причем одну пробирку помещают в термостат при 37°C, другую — при 26°C.

Пробирки с посевами и отработанным материалом сдают дежурному. Рабочее место тщательно убирают и дезинфицируют.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 9, 24, 52, 55]

1. Какие виды аэромонад патогенны для рыб?
2. Каковы характерные признаки аэромонад?
3. Каковы дифференциально-диагностические признаки *A. salmonicida*?
4. Какие заболевания вызываются аэромонадами?
5. Какие факторы способствуют возникновению аэромонадных инфекций?
6. Какие различия культуральных признаков аэромонад имеют диагностическое значение?
7. Как и для чего проводится реакция агглютинации на стекле?

### Занятие 19. Псевдомонады

**Содержание.** Ознакомление учащихся с инфекционными заболеваниями, вызываемыми псевдомонадами: возбудителями, клиническими признаками заболевания, методами лабораторной диагностики.

**Материальное обеспечение.** 1. См. занятие 14. 2. Дифференциально-диагностическая таблица рода *Pseudomonas*, чашки с МПА и «пестрые ряды» с посевами *Pseudomonas fluorescens*, *Ps. capsulata*, 2-суточная агаровая культура патогенного серотипа *A. punctata*, типовая агглютинирующая сыворотка к *A. punctata*, 10 чистых пробирок, физиологический раствор, пастеровские и градуированные 1-миллилитровые пипетки, 2%-ный раствор колларгола, стекло со шлифованным краем, посева *A. punctata* и *A. salmonicida* для учета температурного теста и на среде Хью-Лейфсона.

**Организация и проведение работы.** Псевдомонады — повсеместно распространенные бактерии, обитающие как в пресных, так

и в морских водах. Среди псевдомонад встречаются виды, патогенные для человека, теплокровных животных и рыб. Вероятно, все виды рыб могут поражаться псевдомонадами под влиянием различных факторов, снижающих резистентность организма рыб. Среди видов, патогенных для рыб, необходимо отметить такие, как *Ps. fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. capsulata*, *Ps. chlorographis*, *Ps. anguilliseptica* и др.

Заболевание, диагностируемое как псевдомонадная септицемия (бактериальная геморрагическая септицемия, геморрагическая септицемия), проявляется в виде генерализованного септического процесса, при котором клинические признаки аналогичны таковым при других септицемиях. Кроме того, псевдомонады могут поражать жабры (*Ps. chlorographis*), вызывать образование субэпидермальных петехий на поверхности тела, геморрагический стоматит (*Ps. anguilliseptica*).

Диагностика основывается на выделении и идентификации возбудителя. Первичное выделение микроорганизма производится при высеве из почек на МПА при температуре 20—25°C через 24—48 ч.

Предварительный диагноз подтверждается выделением коротких, цитохромоксидазоположительных, грамотрицательных палочек, окисляющих глюкозу, или неактивных в О/Ф-тесте (*Ps. alcaligenes*), часто продуцирующих флюоресцирующий пигмент. Большинство псевдомонад подвижны, но некоторые заболевания вызываются капсулообразующими неподвижными псевдомонадами (табл. 12).

В отличие от аэромонад псевдомонадная инфекция может возникать при более низкой температуре воды (до 2—5°C). Так же как и септицемии, вызванные подвижными аэромонадами, псевдомонады не связываются с наличием рыб-носителей, а в основном развиваются при нарушении режима содержания рыбы, создании стрессовых ситуаций. Для окончательного диагноза, также как и при аэромонадах, необходима проверка патогенных свойств бактерий путем постановки биологической пробы.

Порядок проведения работы следующий.

Проводят учет температурного теста *A. salmonicida* и *A. punctata*.

Учитывают результаты посева *A. salmonicida* на среде Хью-Лейфсона и сравнивают с исходной средой.

Патогенную культуру *A. punctata* испытывают в реакции на стекле с типовой агглютинирующей сывороткой *A. punctata*, после чего ставят развернутую реакцию агглютинации.

В штатив ставят 10 чистых пробирок, со 2-й по 9-ю пробирки наливают по 1 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия, затем в 1-ю и во 2-ю пробирки добавляют до 1 мл агглютинирующей сыворотки в разведении 1:40. После тщательного перемешивания из 2-й пробирки 1 мл смеси переносят в 3-ю и т. д., получая двукратные разведения сыворотки до предельного титра, указанного на этикетке (1:40, 1:80, 1:160 ... 1:5120). Из последней пробирки

Морфологические, культуральные и ферментативные свойства бактерий рода *Pseudomonas*

Вид бактерий	Окраска по Граму, морфология, размер	Подвижность	Капсула	Тип дыхания	Температурный оптимум, °С	Характер	
						МПА	7
1		3	4	5	6		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Грам (-) палочка, $0,5 \times 1 \div \div 2$ мкм	+ лофотрих	-	Аэроб	20—25	Круглые, выпуклые, беловатые, полупрозрачные колонии, с гладкой, блестящей поверхностью, ровными краями. На 3—4-е сутки желто-зеленый флуоресцирующий пигмент	
<i>Ps. putida</i>	Грам (-) палочка, $0,4 \div 0,8 \times \times 1,2 \div 2,6$ мкм	+ лофотрих	-	Факультативный аэроб	25—37	Круглые, выпуклые, слизистые колонии, беловатые или бесцветные, с гладкой, блестящей поверхностью. На 3—4-е сутки зеленый флуоресцирующий пигмент	
<i>Ps. capsulata</i>	Грам (-) палочка, $0,7 \div 1 \times \times 1,6 \div 2,5$ мкм	-	+	То же	25—30	Выпуклые или растекающиеся по поверхности колонии, белые, слизистые, клейстерообразные	
<i>Ps. popillifaciens</i>	Грам (-) палочка $0,2 \times 0,6$ мкм	+ моно- или лофотрих	-	Аэроб	25	Круглые, плоские колонии, серовато-белые, с блестящей гладкой поверхностью, ровными краями. Зелено-желтый флуоресцирующий пигмент	

роста на средах										Глюкоза	Сахароза	Арабиноза	Амняк	Сероводород	Индол	Примечание	
		МПБ	МПЖ	молоко	11	12	13	14	15								16
	8	9	10														
Равномерное помутнение, поверхностная пленка, на дне хлопьевидный осадок. На 3—4-е сутки желто-зеленая флюоресценция	Разжижение во- ронкой	Пептонизация, появление желто- зеленого пигмен- та сверху	к— к— к— к—	к— к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—
Равномерное помутнение, поверхностная пленка, зеленая флюоресценция	—	Не изменяется	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—	к— к— к—
То же	Разжижение во- ронкой	Свертывание, пеп- тонизация	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
»	—	Не изменяется	к—	к—	к—	к—	к—	к—	к—	к—	к—	к—	к—	к—	к—	к—	к—

Вид бактерий	Окраска по Граму, морфология, размер	Подвижность	Капсула	Тип дыхания	Температурный оптимум, °C	МПА		Характер
						3	4	
<i>Ps. anguilliseptica</i>	Грам (-) палочка 0,4 × 2,0 мкм	+	—	Аэроб	15—20			Хорошо растет на средах с 0,5—может не расти
<i>Ps. immobilis</i>	Грам (-) палочка 0,8 × 2,5 мкм	—	—	»	22			Выпуклые, беловато-серые, матовые колонии неправильной формы
<i>Ps. mesenterica</i>	Грам (-) палочка 0,5 × 3 ÷ 7 мкм	—	—	»	25			Круглые, выпуклые или уплощенные складчатые колонии серовато-белого цвета
<i>Ps. chlororaphis</i>	Грам (-) палочка	+	—	»	15—25			Круглые, выпуклые колонии средней величины, полупрозрачные, зеленый нефлюоресцирующий пигмент (хлорорафин)
<i>Ps. alcaligenes</i>	Грам (-) палочка	+	—	»	25—37			Круглые, выпуклые колонии средней величины, полупрозрачные. Пигмента не образует

\* Адонит.  
\*\* Этанол.

роста на средах		молоко		Примечание						
МПБ	МПЖ			Ллюкоза	Сахароза	Альфаиноза	Амниак	Серова-Дороа	Индол	
8	9	10		11	12	13	14	15	16	17
1 % хлорида натрия, без которого		Разжижение		О—F — те- ряет под- вижность при более 25°C						
Равномерное помутнение, зеле- ная флюоресценция	—	Свертывание								
То же	Разжижение	То же								
Равномерное помутнение	То же	Сорбит — Адонит —								
То же	»	Не изменяется	Растет при 41°C							

1 мл сыворотки в наибольшем разведении выливают в 10-ю пробирку — контроль сыворотки (КС). В пробирку с 2-суточной культурой на скошенном агаре наливают 4 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия и смывают культуру, которую по 1 капле добавляют в 9 пробирок [первые 8 — с сывороткой и 9-я с 0,9%-ным раствором хлорида натрия — контроль культуры (КК)]. Штатив с пробирками хорошо встряхивают для равномерного распределения бактериальной взвеси, ставят на 2 ч в термостат при 37°C, затем до следующего дня оставляют при комнатной температуре.

Просматривают чашки с посевами *Ps. fluorescens* и *Ps. capsulata*. Обращают внимание на характерные морфологические различия колоний. Прокаленной и охлажденной петлей проверяют консистенцию колоний и описывают в тетради.

Берут часть колонии *Ps. capsulata* и окрашивают капсулу по Боголепову. Остальную часть колонии используют для приготовления мазка и окрашивания по Граму. После микроскопирования зарисовывают оба препарата.

Учитывают «пестрый ряд» с посевами культуры *Ps. fluorescens*. Обращают внимание на низкую сахаролитическую активность (ферментация углеводов без газообразования) по сравнению с протеолитической (активное разжижение желатина и пептонизация молока).

Результаты учета записывают в тетрадь.

#### Контрольные вопросы [4, 39, 52]

1. Чем характеризуются бактерии рода *Pseudomonas*?
2. Какие виды псевдомонад патогенны для рыб?
3. Какие клинические и патологоанатомические признаки характерны для псевдомонадной инфекции?
4. При каких условиях возникает псевдомонадная инфекция?
5. Какова методика выделения псевдомонад?
6. Каковы морфологические и культуральные свойства псевдомонад?
7. Как проводится окрашивание капсул бактерий?

### Занятие 20. Вибриоз

**Содержание.** Ознакомление учащихся с инфекционными заболеваниями, вызываемыми вибрионами; возбудителями, клиническими признаками заболевания, методами лабораторной диагностики.

**Материальное обеспечение.** 1. См. занятие 14. 2. Дифференциально-диагностическая таблица рода *Vibrio*, чашки с МПА с посевами *V. anguillarum*, «пестрый ряд», штатив с пробирками с развернутой реакцией агглютинации *A. punctata*, агглютиноскоп.

**Организация и проведение работы.** Вибриоз — широко распространенное заболевание, возникающее в морских и солоноватых водоемах и особенно опасное при выращивании рыб в искусственных условиях. Возбудителем является *Vibrio anguillarum*, распространенный повсеместно, главным образом в морских и солоноватых водах, но описан ряд вспышек и в пресных водах. К *V. anguillarum* весьма чувствительны все морские и пресноводные рыбы.

*V. anguillarum* — граммотрицательные вибрионы, не образующие спор и капсул, величиной  $1,5 \times 0,5$  мкм, обладающие одним поляр-

но расположенным жгутиком, хорошо растущие на простом МПА. Оптимум роста отмечают при добавлении к среде 1,5—3,5% NaCl. Обнаружено 3 типа *V. anguillarum*, различающихся по патогенности и ферментативным свойствам (табл. 13).

Таблица 13

Дифференциально-диагностические признаки бактерий рода *Vibrio*

Тест или субстрат	<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>V. anguillarum</i>			<i>V. fisheri</i>	<i>V. costicola</i>
	тип 1	тип 2	тип А	тип В	тип С		
Желатин	+	±	+	+	+	+	d*
Глюкоза	к	к	к	к	к	к	к
Лактоза	—	—	—	—	—	—	—
Сахароза	к	к	к	—	к	d	к
Маннит	к	к	к	к	к	d	d
Мальтоза	к	к	к	к	к	—	—
Арабиноза	к	—	к	—	—	—	—
Индол	+	+	+	—	+	—	—
MR	+	—	d	d	d	+	—
VP	—	+	d	d	d	—	d
Утилизация цитрата	+	+	—	—	—	—	—
Гидролиз крахмала	+	+	+	+	+	d	—
Рост							
без NaCl	—	—	+	+	+	—	—
в 7%-ном NaCl	+	+	d	d	d	+	+
» 10%-ном NaCl	—	+	—	—	—	+	+
при 5°C	—	+	+	+	+	+	+
» 37°C	+	+	d	d	d	—	d
» 42°C	+	+	—	—	—	—	—
Аргинин	—	—	+	+	+	—	+
Лизин	+	+	—	—	—	+	—
Орнитин	+	+	—	—	—	—	—
Гемолиз эритроцитов ба- рана	d	d	d	d	d	—	—

\* d — 10% штаммов реагируют положительно.

Диагностика заболевания основана на выделении и идентификации возбудителя при посеве из почек и пораженных тканей на МПА, содержащем 1—1,5% хлористого натрия. Посевы инкубируют при 20—25°C в течение 24—48 ч.

Предварительный диагноз устанавливают при выделении коротких, подвижных, цитохромоксидазоположительных, грамотрицательных, слегка изогнутых палочек.

Окончательную диагностику проводят в соответствии с табл. 13.

Порядок проведения работы следующий.

Проводят учет развернутой реакции агглютинации патогенной культуры *A. punctata*.

С помощью агглютиноскопа исследуют контрольные пробы сыворотки и культуры. Контрольная проба сыворотки должна быть прозрачной, в контрольной пробе культуры — должна находиться гомогенная взвесь. В противном случае реакцию не учитывают.

Предварительный учет реакции агглютинации проводят невооруженным глазом, не встряхивая пробирок. При положительной реакции отмечают просветление жидкости, на дне пробирок — осадок в виде зонтика, при легком встряхивании разбивающийся на отдельные хлопья.

Окончательный учет производят с помощью агглютиноскопа. Реакцию считают положительной при наличии агглютинации в разведении сыворотки не менее половины титра. При равномерном помутнении жидкости в пробирках и наличии точкообразного осадка реакция отрицательная.

Изучают и описывают в тетради морфологию колоний *V. anguillarum* на чашках с МПА, по «пестрому ряду» определяют биохимический тип вибриона (см. табл. 13).

С бульонной культуры готовят мазок и окрашивают по Граму. Изучают морфологию вибриона и зарисовывают его.

Готовят «раздавленную» каплю, изучают подвижность вибриона, обращая внимание на его характерные «стреляющие» движения.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 9, 24, 52]

1. Каковы культурально-морфологические свойства возбудителя вибриоза рыб?
2. Каковы условия возникновения вибриоза?
3. Какова лабораторная диагностика вибриоза?

### Занятие 21. Миксобактериозы

**Содержание.** Ознакомление учащихся с инфекционными заболеваниями, вызываемыми миксобактериями: возбудителями, клиническими признаками заболевания, методами лабораторной диагностики.

**Материальное обеспечение.** 1. См. занятие 14. 2. Метиленовый синий Леффлера, чашки с цитофагагаром с посевами *Flexibacter columnaris*, сеголетки карпа, предварительно инфицированные *Fl. columnaris* путем орошения жабр.

**Организация и проведение работы.** Миксобактерии — обитающие в почве и воде сапрофиты, которых особенно много в разрушающейся органической среде. Несмотря на слабую инвазионность водных миксобактерий, при снижении резистентности организма рыбы, развивающемся под влиянием таких факторов, как резкие изменения температуры воды, недостаток кислорода, накопление аммиака и органических веществ, изменения кожных покровов, связанные с преждевременным половым созреванием, эти бактерии могут внедряться через кожу. Миксобактерии могут находиться на поверхности тела, особенно на жабрах.

К миксобактериозам относятся наиболее часто встречающаяся болезнь колумнарис, или столбчатая болезнь, поражающая всех пресноводных рыб, бактериальная холодноводная болезнь, поражающая лососевых, особенно молодь кижуча и чавычи, и спороцитофага -- болезнь, поражающая лососевых в морской и солоноватой воде.

Болезнь колумнарис встречается повсеместно и поражает всех пресноводных, включая декоративных рыб. Особенной чувствительностью отличаются катадромные рыбы, такие, как угорь.

Возбудителем болезни колумнарис является *Flexibacter columnaris* — длинные, тонкие (0,5—0,7×4,0—8,9 мкм) грамотрицательные бактерии, которые не имеют жгутиков, однако движутся, изгибаясь и скользя по слизи, выделяемой в большом количестве. Биохимически инертные (см. табл. 9) бактерии проникают в эпидермис, затем — в соединительную мышечную ткань, где происходит их размножение. На пораженных участках отмечаются гиперемия, распад тканей с кровоизлияниями на границе поражения.

Заболевание поражает рыбу всех возрастов, но прежде всего молодь угря и карпа в тепловодных хозяйствах при температуре воды около 25°C. Форель и другие виды рыб могут заболеть и при температуре ниже 15°C. Клинические признаки зависят от вида пораженной рыбы и степени вирулентности культуры. При поражении высоковирулентными возбудителями рыба может погибнуть без каких-либо внешних патологических изменений, хотя возбудитель выделяется из жабр, являющихся единственным очагом поражения. При поражении жабр у тихоокеанского лосося и тепловодных прудовых рыб развивается обширный некроз, начинающийся с концов лепестков, прогрессирующий по направлению к жаберным дугам и приводящий к потере групп лепестков. При обширном поражении жабр рыба погибает от асфиксии.

При поражении менее вирулентными штаммами на поверхности тела развиваются наружные повреждения, имеющие диагностическое значение. У бесчешуйчатых рыб сначала на голове и туловище появляются небольшие повреждения, округлые, с серо-голубым некротическим центром и красными краями, которые затем распространяются на всю поверхность тела. У чешуйчатых рыб некроз начинается с наружных границ плавников, затем распространяется по всей поверхности тела. Диаметр поражения может достигать нескольких сантиметров, кожа в пораженной области может эрозироваться и изъязвляться. На жабрах поражения распространяются радиально от фокальной (центральной) точки, пораженные ткани бледнеют и некротизируются, но расплавления жаберных лепестков не происходит. Иногда желтопигментные клетки возбудителя присутствуют в достаточном количестве и окрашивают пораженное место в желтый или оранжевый цвет.

При патологоанатомическом обследовании рыбы наблюдают обескровленные жабры, в брюшной полости большое количество соломенно-желтой серозной жидкости, содержащей сгустки крови, на печени — слабую пятнистость, гипертрофированные почки, в селезенке — локализованные серовато-белые очаги. Отмечают сильную гиперемия брыжеечных кровеносных сосудов.

Предварительный диагноз основывают на выделении из пораженных мест длинных, тонких грамотрицательных палочек. На цитофаг-агаре после 3 дней инкубации при 20°C вырастают сухие ризоидные желтоватые колонии; клетки подвижные (скользят или изгибаются), без жгутиков. Диагностическое значение имеет и то, что заболевание возникает при 14°C и выше.

Окончательный диагноз устанавливают после проверки выделенных культур в реакции агглютинации на стекле с поливалентными агглютинирующими сыворотками к флексибактериям.

Для обоснования диагноза необходимо исследовать пробы от 5 погибающих рыб из каждого очага (садка, резервуара, пруда).

Холодноводная болезнь, вызываемая миксобактериями *Sytophaga psychrophila*, вероятно, поражает всех лососевых, однако особенной чувствительностью отличаются молодь кижуча и все возрастные группы чавычи.

Заболевание возникает в пресных водах при температуре воды 12°C и ниже и поражает в основном молодь. Возбудитель выделяется из наружных повреждений и внутренних органов. У личинок может эрозироваться брюшная поверхность желточного мешка с последующим его разрывом и освобождением содержимого. У молодки с острой формой болезни может развиваться потемнение кожи в области хвостового стебля и наступить гибель без проявления каких-либо внешних повреждений. Чаще всего заболевание начинается с поражения ткани у основания жирового или спинного плавника, затем распространяется на все плавники и хвостовой стебель. Края плавников приобретают беловатое окрашивание, пораженные ткани некротизируются, некроз распространяется на весь хвостовой стебель, приводя к его разрушению и отпадению. При хронической форме болезни у рыб могут проявиться лордоз и сколиоз (искривление позвоночника).

При диагностировании заболевания учитывают температуру воды, при которой оно возникает (12°C и ниже), а также выделение из пораженных тканей длинных, тонких грамотрицательных палочек. На цитофага-агаре через 3 дня инкубации при 20°C вырастают влажные, желтые, распыльчатые колонии. За счет выделяемой слизи бактерии могут осуществлять скользкие движения на поверхности плотного агара.

Солоноватоводный миксобактериоз вызывается бактериями *Sporocytophaga*, таксономическое положение которых до настоящего времени точно не установлено.

Заболевание описано в США, Шотландии, Японии, характеризуется пятнистым некрозом кожи, наиболее часто появляющимся на боковых и брюшной поверхности тела рыбы. Поражения жабр не описаны. Поражения, которые могут быть обширными, имеют вид поверхностных ссадин. Из пораженных мест выделяются длинные, относительно тонкие, грамотрицательные палочки; в мазках палочки часто располагаются в своеобразных конфигурациях — частокола или подковы. Бактерии растут на цитофага-агаре только после добавления 1,5—2,0% морской соли, образуют желтые колонии через несколько дней инкубирования при 20—22°C. В старых колониях среди вегетативных клеток часто обнаруживают микрочисты.

Смертность от солоноватоводного миксобактериоза может быть значительной у лососевых при интенсивном культивировании их в морской воде.

Порядок проведения работы следующий.

Небольшое количество слизи с жабр экспериментально зараженных сеголетков помещают на предметное стекло, капнув несколько капель метиленового синего Леффлера, накрывают покровным стеклом и придавливают. При микроскопировании видны длинные, тонкие голубоватые палочки.

Изучают морфологию колоний *Fl. columnaris* на цитофаг-агаре. Обращают внимание на наличие желто-зеленого пигмента, расплывчатый, ризоидный край колоний. Делают мазок и окрашивают его по Граму; сравнивают морфологию клеток в нативном препарате и мазке по Граму. Результаты микроскопирования записывают и зарисовывают в тетрадь.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 9, 52]

1. Дать характеристику миксобактерий.
2. Какие факторы способствуют возникновению миксобактериозов?
3. Какие заболевания относятся к миксобактериозам?
4. Каковы распространенность и клиническая картина болезни колумнарис, какие рыбы восприимчивы к ней?
5. Каковы этиологический агент и патогенез болезни колумнарис?
6. Какова лабораторная диагностика колумнарис-болезни?
7. Каковы этиология и условия возникновения холодноводной болезни?
8. Каковы клинические признаки холодноводной болезни?
9. Какова лабораторная диагностика холодноводной болезни?
10. Каковы этиология, условия возникновения и клинические признаки солонатоводного миксобактериоза?
11. Каковы лабораторная диагностика солонатоводного миксобактериоза и особенности культивирования возбудителя?

#### Занятие 22. Эдвардсиеллез, гемофилез

**Содержание.** Ознакомление учащихся с инфекционными заболеваниями, вызываемыми *Edwardsiella tarda* и *Haemophilus piscium*: возбудителями, клиническими признаками заболевания, методами лабораторной диагностики.

**Материальное обеспечение.** 1. См. занятие 14. 2. Чашки Петри с МПА, с выросшими культурами *E. tarda* и кровяным агаром с *H. piscium*, «пестрые ряды».

**Организация и проведение работы.** Представители семейства *Enterobacteriaceae* — *Edwardsiella tarda* — широко распространенные бактерии, наносящие значительный ущерб угреводным хозяйствам. Кроме угря чувствительны к возбудителю канальный сомик, золотой карась и другие пресноводные рыбы. *E. tarda* обнаруживают также у различных животных, включая тюленей, морских львов, черепах, аллигаторов, змей. Кроме того, *E. tarda* может играть роль этиологического фактора при некоторых заболеваниях человека, крупного рогатого скота, свиней и птиц.

Заболевание начинается при высокой температуре воды (около 30°C). У канального сомика, например, сначала ниже боковой линии появляются небольшие геморрагии кожи. Позже по бокам и на хвостовом стебле развиваются внутримышечные абсцессы — обширные полости, заполненные газом с гнилостным запахом и некротизированной тканью. При интенсивном газообразовании пораженное место имеет вид опухоли или беловатого пятна.

У угря заболевание протекает с характерными признаками бактериальной септицемии, однако в отличие от нее — с образованием очагов гнилостного распада в печени, почках, на голове, особенно на жаберных крышках, а также появлением на поверхности тела кровоточащих язв. В селезенке и почках возникают многочисленные колонии бактерий в виде серовато-белых пятен. Различают две формы эдвардсиеллеза — нефротическую и гепатическую.

При нефротической форме в гемоэпителиальной ткани почек развиваются некротические процессы, образуются обширные язвы, в которых размножаются бактерии, вызывающие лизис окружающих тканей. Метастатические поражения хорошо заметны и в окружающих органах.

При гепатической форме первичные обширные поражения появляются в печени. При прогрессировании болезни в печени формируются обширные язвенные абсцессы, гнойный перитонит. Распространяется воспаление на селезенку и тимус. При заболевании кефали у нее нарушается координация движений, рыба держится у поверхности воды. На поверхности тела видны обширные с гнилостным запахом абсцессы с геморрагическими краями.

Для лабораторного подтверждения диагноза на простой МПА делают посев из почек, печени, нескрытых полостей. Через 48—76 ч инкубации при 25°C вырастают небольшие, круглые, прозрачные, слабовыпуклые, оксидазоотрицательные колонии, подвергающиеся дальнейшему изучению. Дифференциально-диагностическими признаками *E. tarda* являются отсутствие ферментации маннита и одновременное продуцирование индола и сероводорода (табл. 14).

Таблица 14

Ферментативные свойства *E. tarda* и *H. piscium*

Вид	Тест							
	MR/VP	индол	серово-дород	МПЖ	глюкоза	лактоза	сахароза	маннит
<i>E. tarda</i>	+/-	+	+	-	кГ	-	-	-
<i>H. piscium</i>	+/-	-	-	-	к	-	к	-

Продолжение

Вид	Тест							
	арабиноза	раминоза	ксилоза	фруктоза	галактоза	манноза	инозит	мальтоза
<i>E. tarda</i>	-	-	-	кГ	кГ	кГ	-	кГ
<i>H. piscium</i>	-	-	-	к	к	к	-	к

Гемофилез — язвенная болезнь, поражающая лососевых рыб. У пораженной рыбы на поверхности тела появляются беловатые пятна, на месте которых позднее образуются пузыри. При прогрессировании патологического процесса на пораженных местах кожа разрывается и образуются плоские язвы (как будто кожа срезана ножом). Постепенно дно язв углубляется в результате некротического распада мышечной ткани, развиваются асцит, пучеглазие, разрушение челюстных хрящей и межплавниковых перегородок. Возбудитель болезни — *H. piscium* — грамотрицательные бактерии. В мазках-отпечатках из язв они представляют собой отдельные палочки с закругленными концами. В мазках из питательных сред бактерии располагаются изолированно или в виде дипло- и стрептобактерий.

*H. piscium* растет на МПА или агаре «Д» с добавлением крови форели или кролика или измельченной ткани форели (от 3 до 5%) при оптимальных показателях: рН 7 и температуре 20—25°C. Рост замедленный, через 1 нед развиваются кремоватые колонии диаметром 1—3 мм, непрозрачные, круглые, выпуклые, гладкие. Характерно образование S-форм (выпуклые, блестящие, маслянистые) и R-форм колоний (плотные, с неровным краем, хрупкие). На жидких средах отмечают помутнение, затем зернистый осадок.

*H. piscium* МПЖ не разжижает, углеводы ферментирует до кислоты (см. табл. 14).

Порядок проведения работы следующий.

Знакомятся с морфологией колоний *E. tarda* и *H. piscium*. Обращают внимание на кремовую окраску колоний *H. piscium*.

Знакомятся с ферментативной характеристикой *E. tarda* и *H. piscium*. Обращают внимание на более глубокое расщепление углеводов *E. tarda* до кислоты и газа. Характеризуют дифференциальные признаки и записывают в тетрадь.

Делают мазки и красят по Граму. Результаты микроскопирования зарисовывают в тетради.

#### Контрольные вопросы [40, 52]

1. Какова этиология эдвардсиеллеза?
2. Какие виды рыб восприимчивы к эдвардсиеллезу?
3. Каковы клинические признаки эдвардсиеллеза у форели и угря?
4. Каковы клинические формы эдвардсиеллеза?
5. Лабораторная диагностика эдвардсиеллеза.
6. Какова этиология гемофилеза?
7. Какие виды рыб поражаются гемофилезом?
8. Каковы клинические признаки гемофилеза?
9. Лабораторная диагностика гемофилеза.

#### Занятие 23. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам

Содержание. Методы определения чувствительности бактерий к антибиотикам и другим химиотерапевтическим препаратам.

Материальное обеспечение. Суточная бульонная культура *A. punctata*, чашки Петри с МПА, диски с антибиотиками, пинцет, спиртовка, спички, пастеров-

ские пипетки, цилиндр с дезинфицирующим раствором, карандаш по стеклу, полоска миллиметровой бумаги, подготовленная накануне занятий чашка с ростом бактериальной культуры и дисками.

**Организация и проведение работы.** Эффективность лечения зависит от правильности выбора антибиотика или химиотерапевтического средства. Для этого после выделения чистой культуры и идентификации возбудителя определяют его чувствительность к антибиотикам.

При обнаружении в патологическом материале нескольких видов условно-патогенных бактерий необходимо решить вопрос об их роли в возникновении патологического процесса. В таких случаях большое значение имеют количественное исследование и учет микроорганизмов. Как правило, преобладающий вид играет роль этиологического фактора при данном патологическом процессе. Однако не следует забывать о том, что патологический процесс может вызываться и ассоциациями микроорганизмов, при этом патогенность каждого вида может взаимно усиливаться. В таких случаях чувствительность к антибиотикам проверяют отдельно для всех видов микроорганизмов, выделенных в чистой культуре.

Чувствительность к антибиотикам чаще всего определяют методом диффузии в агар с применением стандартных бумажных дисков на плотных питательных средах (МПА или кровяном агаре).

Стандартные диски-кружки диаметром 5 мм готовят из специальной фильтровальной бумаги, пропитанной антибиотиками и окрашенной в контрастные цвета.

В стерильные чашки Петри наливают 2% МПА или кровяной агар толщиной 4—5 мм, чашки слегка подсушивают в термостате. В зависимости от интенсивности роста исследуемой культуры ее используют после 1—3 суточного инкубирования при оптимальной температуре на МПА или МПБ. Из агаровых культур с помощью физиологического раствора готовят 1-миллиардную бактериальную взвесь.

На поверхность подсушенной среды наносят несколько миллилитров исследуемой культуры, равномерно распределяют по поверхности среды, избыток культуры отсасывают пастеровской пипеткой, оставляют чашки на столе на 30—40 мин. Затем на поверхность подсушенной среды стерильным остроконечным пинцетом накладывают диски с антибиотиками, слегка придавливая их браншами к агару. Диски располагают на расстоянии 2—2,5 см друг от друга и от края чашки (табл. VIII, цв. вклейка).

Чашки с дисками переворачивают вверх дном и помещают в термостат на 1—2 сут при температуре инкубирования, оптимальной для данного микроба.

Диффундируя в агар, антибиотик образует вокруг диска зону угнетения роста чувствительных к нему бактерий. Измерение зоны угнетения производят с помощью полоски миллиметровой бумаги, учитывая диаметр зоны, проходящей через центр диска: при диаметре зоны угнетения роста менее 11 мм бактерии резистентные

или слабочувствительные, 11—20 мм — чувствительные и более 20 мм — высокочувствительные.

Если нет готовых дисков, их можно приготовить в лаборатории из фильтровальной бумаги хорошего качества (ГОСТ 6722—65), простерилизовать в сушильном шкафу в течение 1 ч при 100°C и пропитать раствором антибиотика. Диски диаметром 5 мм адсорбируют 0,0075 мл раствора, содержание антибиотика в диске должно быть (в мгк): эритромицин — 100, тетрациклин — 30, стрептомицин — 30, левомицетин — 30, канамицин — 30, гентамицин — 30, полимиксин — 15.

Пропитанные растворами антибиотиков диски высушивают в течение 4 ч при температуре 40°C. Приготовленные диски можно хранить в стерильных пенициллиновых флаконах в течение 6 мес.

Порядок проведения работы следующий.

Суточную бульонную культуру *A. punctata*, предварительно профламбировав край пробирки, выливают на МПА в чашке. Слегка покачав чашку, равномерно распределяют культуру, пастеровской пипеткой отсасывают избыток культуры и выливают в банку с дезинфицирующим раствором. Чашки подсушивают и накладывают диски. Чашки подписывают и ставят в термостат.

Проводят учет чувствительности к антибиотикам. Складывают миллиметровую бумагу в виде линейки и измеряют по дну чашки диаметр зоны угнетения роста.

Результат учета записывают и зарисовывают в тетради.

#### Контрольные вопросы [27]

1. С какой целью определяют чувствительность к антибиотикам?
2. Как определяют чувствительность к антибиотикам?
3. В чем заключается метод диффузии в агар?
4. Как проводится учет чувствительности к антибиотикам?

### Занятие 24. Определение патогенных свойств бактерий (биологическая проба)

**Содержание.** Освоение метода определения патогенных свойств (вирулентности) выделенных бактерий для установления их этиологической роли при заболевании рыб.

**Материальное обеспечение.** Аквариумы с отстоявшейся водой, рыба для постановки биологической пробы, бульонная и агаровая культура *A. punctata*, изотонический раствор хлорида натрия, оптический стандарт мутности, стерилизатор со стерильными шприцами и иглами для внутрикожных, внутримышечных и внутривенных инъекций, скарификатор, скальпель, пинцет анатомический, ножницы, стерильные ватные тампоны, спирт в баночке, спиртовка, спички, марлевые салфетки для заворачивания рыбы, лоток или кювета для отработанных тампонов, стерильные пробирки, градуированные пипетки на 1,0 и 5,0 мл.

**Организация и проведение работы.** Выделение бактерий из организма больной рыбы не всегда свидетельствует об их причастности к данному заболеванию. По Р. Коху, этиологическая роль микроорганизма считается доказанной, если он всегда выделяется при данном заболевании, не встречается у здорового человека или

животного. При экспериментальном заражении им вызываются характерные клинические признаки и при этом он повторно выделяется из экспериментально зараженного организма.

Для рыб это не всегда приемлемо, так как, обитая в воде, они постоянно находятся в окружении водных бактерий, многие из которых могут проникать в их организм, не принося никакого вреда, если этому не будут способствовать неблагоприятные условия окружающей среды. В некоторых случаях водные сапрофитные бактерии настолько изменяют свои свойства, что из условно-патогенных становятся патогенными, способными обусловить развитие патологического процесса. Поэтому выделение бактериальных культур, подозреваемых в качестве этиологического агента, должно подтверждаться постановкой биологической пробы для определения его патогенности и вирулентности.

Вирулентность — биологическое свойство микроорганизмов, которое характеризует степень их патогенности в момент изучения, является индивидуальным признаком и может варьировать в очень широких пределах.

Степень вирулентности характеризуется способностью изучаемой культуры вызывать развитие клинических признаков и гибель экспериментально зараженных рыб и зависит как от культурально-морфологических и токсигенных свойств возбудителя, так и от резистентности рыбы, связанной с ее видом, возрастом, условиями содержания (особенно температурного режима), а также от способа заражения.

Для биологической пробы берут рыбу без признаков ослабления, травматических повреждений и обязательно из водоема, благополучного по инфекционным заболеваниям.

Биологическую пробу можно проводить в аквариумах или бетонированных садках, при этом соотношение объема воды и массы рыбы должно быть не менее 20:1. Воду постоянно аэрируют и регулярно проводят гидрохимические исследования, поддерживают температуру, оптимальную для развития изучаемого заболевания.

Для биологической пробы используют 1- или 2-суточную культуру, выращенную на МПА, смывают изотоническим раствором хлорида натрия и стандартизованную по оптическому стандарту так, чтобы в 1 мл этого раствора содержалось определенное количество микробных тел. Количество вводимой культуры необходимо знать для определения степени вирулентности культуры и получения сравнимых результатов.

В некоторых случаях используют 1- или 2-суточную бульонную культуру, из которой делают ряд десятикратных разведений. Если невозможно выделить чистую культуру возбудителя или необходимо быстро решить вопрос о вирулентности агента, можно использовать для биологической пробы патологический материал. Пораженные органы и ткани тщательно растирают в фарфоровой ступке, смешивают с десятикратным объемом изотонического раствора хлорида натрия и полученную взвесь вводят подопытным рыбам.

Если культура в течение длительного времени хранилась на

искусственных средах, она может частично или полностью утратить свою вирулентность, для восстановления которой необходимо провести несколько пассажей через организм рыбы. После проверки чистоты культуры и ее ферментативных свойств культуру используют для проведения биологической пробы.

Для определения токсигенности исследуемой культуры ее выращивают в течение не менее 10 сут на МПБ, затем фильтруют через бактериальные фильтры, из полученного фильтрата делают ряд последовательных десятикратных разведений и изучают его токсичность, вводя подопытным рыбам.

Исследуемую культуру можно вводить различными способами: внутримышечно, внутривнутрибрюшинно, подкожно, внутривнутрибрюшинно, катетером через рот, скарификацией (рис. 51), орошением жабр и контактно, подсаживая здоровых рыб к больным или помещая травмированных и нетравмированных рыб в аквариум, в воду которого вносят определенное количество изучаемой культуры. Выбор способа введения изучаемой культуры зависит от биологических особенностей возбудителя и характера клинических проявлений, вызываемых им.

Разведения стандартизированной взвеси микробов, бульонной культуры и токсина готовят так, чтобы различные дозы бактерий или токсина содержались в одинаковых объемах жидкости.

Для биопробы, если вид, возраст и массу рыбы не оговаривают особо, берут карпа массой 200—300 г, форель — 100—200 г. Количество рыб, используемых в опыте, определяют в каждом случае конкретно. Для каждой дозы исследуемой культуры или токсина используют не менее 3—5 рыб. Такому же количеству контрольных рыб аналогичным способом вводят стерильный бульон или изотонический раствор хлорида натрия. Для повышения достоверности полученных результатов каждую серию опытов следует повторить дважды.

После введения культуры за опытной и контрольной рыбой проводят ежедневные наблюдения. При этом обращают внимание на характер ее поведения, изменение пигментации, наличие гиперемии, геморрагий, их характер и локализацию, появление отечности, инфильтратов, абсцессов, язв.

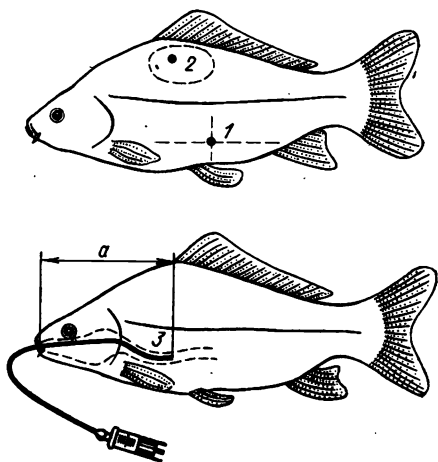


Рис. 51. Места введения культуры при постановке биологической пробы методами:

1 — внутривнутрибрюшинной инъекции; 2 — внутримышечной инъекции и скарификации; 3 — через зонд (из Луцкого, 1973)

Каждую погибшую рыбу подвергают патологоанатомическому вскрытию, отмечают изменения внутренних органов и берут патологический материал для бактериологических исследований.

При наличии характерных клинических и патологоанатомических признаков и гибели не менее 50% подопытных рыб, от которых повторно выделили изучаемый возбудитель, в соответствии с ветеринарным законодательством биопроба считается положительной. Однако при оценке биопробы следует иметь в виду, что в отдельных случаях развитие характерной клинической картины может и не сопровождаться гибелью рыбы или количество погибших особей составит менее 50%.

Для количественной оценки вирулентности бактерий или токсичности фильтрата могут быть использованы следующие показатели.

1. Минимальная смертельная доза ( $D_{lm}$  — *Dosis letalis minima*) — наименьшая доза микробов, которая при данном способе заражения в определенных условиях опыта вызывает гибель 95% подопытных рыб.

2. Минимальная, безусловно, смертельная доза ( $D_{cl}$  — *Dosis certe letalis*) — минимальная доза микробов, обусловившая гибель 100% опытных рыб.

3. Средняя смертельная доза микробов ( $LD_{50}$  — *Dosis letalis 50%*), вызывающая гибель 50% опытных рыб.

Первые два показателя характеризуются по результатам опыта,  $LD_{50}$  определяется путем математических расчетов (см. с. 147).

Для приготовления бактериальной взвеси определенной концентрации пользуются оптическим стандартом мутности, выпускаемым ГИСК им. Л. А. Тарасевича. Стандарт состоит из двух запаянных пробирок-эталонов, заполненных дистиллированной водой со взвешенными частицами стекла «Пирекс», которые при взбалтывании образуют взвесь, по степени мутности соответствующую 5 и 10 международным единицам мутности. Мутность стандарта на 10 единиц соответствует следующей концентрации микроорганизмов:

- 850 млн./мл микробов кишечной группы ( $0,4 \div 0,8 \times 1 \div 3$  мкм);
- 10 млрд./мл микробов коклюшной группы ( $0,2 \div 0,4 \times 1,2$  мкм);
- 1,5 млрд./мл бруцелл ( $0,3 \div 0,6 \times 2,5$  мкм);
- 2,5 млрд./мл холерных вибрионов ( $0,2 \div 0,4 \times 1 \div 4$  мкм);
- 4,5 млрд./мл туляреминых микробов ( $0,1 \div 0,3 \times 0,2 \div 0,5$  мкм).

В комплект стандарта входят шрифтовая таблица и 3 пустые стандартные пробирки, соответствующие пробиркам-эталонам.

В пробирку с суточной агаровой культурой стерильно наливают 5 мл изотонического раствора хлорида натрия и, вращая пробирку между ладонями, смывают с агара культуру до получения гомогенной взвеси. Стерильной градуированной пипеткой набирают 0,5 мл полученной взвеси и переносят в стандартную пробирку и небольшими, точно учитываемыми порциями приливают изотонический раствор хлорида натрия, все время сравнивая мутность взвеси в этой пробирке с эталоном на 10 единиц. Сравнение проводят

невооруженным глазом при хорошем дневном освещении, поместив позади пробирок шрифтовую таблицу.

Чтобы узнать, какой концентрации живых бактериальных клеток изучаемой культуры соответствует эта стандартизованная взвесь, делают несколько дозированных (по 0,1 мл) посевов на чашки с МПА или агаром «Д» из пробирок с десятикратными разведениями стандартизованной взвеси. Нанесенные капли тщательно растирают шпателью и посевают инкубируют при температуре, оптимальной для данного микроба, после чего, зная разведение и посевную дозу, высчитывают количество живых бактерий в 1 мл взвеси. Например, из исходной взвеси сделали 5 десятикратных разведений и из каждой пробирки по 0,1 мл взвеси посеяли на две чашки с МПА. На чашках с посевами из разведений  $10^{-1}$  и  $10^{-2}$  получили сливной рост, из разведений  $10^{-3}$  выросли 95 и 87 колоний, из разведения  $10^{-4}$  — 8 и 9 колоний, из разведения  $10^{-5}$  — по одной колонии. Все результаты необходимо привести к одному разведению  $10^{-3}$ , тогда число колоний будет соответственно 95—87, 80—90 и 100—100 или в среднем 92 колонии. Если из 0,1 мл разведения  $10^{-3}$  выросли 92 колонии, то в 1 мл стандартизованной взвеси будет  $92 \cdot 10 \cdot 1000 = 920\,000$  клеток.

Предварительное проведение таких исследований позволяет точно знать количество вводимого возбудителя.

Порядок проведения работы следующий.

1. Приготовление бактериальной взвеси *A. punctata* определенной концентрации. В пробирку с суточной агаровой культурой *A. punctata* стерильно приливают 5 мл изотонического раствора хлорида натрия. Быстрыми вращательными движениями пробирки между ладонями смывают со скошенной поверхности агара культуру, при этом следят, чтобы не намочила пробка. Добившись однородности взвеси, 0,5 мл ее переносят в пробирку оптического стандарта мутности и приливают 1 мл изотонического раствора хлорида натрия. Затем берут эталон на 10 единиц, хорошо встряхивают и помещают рядом с первой пробиркой. Обе пробирки держат в левой руке, подложив под них шрифтовую таблицу, а правой доливают точно учитываемые небольшие количества изотонического раствора хлорида натрия до тех пор, пока по степени мутности обе пробирки не сравняются. Подсчитывают количество добавленного раствора хлорида натрия, выливают взвесь в банку с дезинфицирующим раствором, куда опускают и пробирку. Аналогичное разведение делают уже в стерильной пробирке для биологической пробы, из которой стерильно делают ряд десятикратных разведений для введения подопытным рыбам.

2. Внутримышечное введение культуры. Помещают в штатив пробирки с приготовленными разведениями изучаемой культуры, извлекают из стерилизатора инструментарий, набирают в шприц культуру, поднимают шприц вверх и избыток культуры вместе с пузырьками воздуха выдавливают в стерильный ватный тампон, который затем кладут в лоток для отработанного материала. Подготовленный шприц кладут в крышку стерилизатора. Отлавливают

рыбу, заворачивают ее в салфетку так, чтобы место инъекции было открытым, и фиксируют руками голову и хвост. Удаляют несколько чешуек, стерильным тампоном и изотоническим раствором хлорида натрия тщательно протирают место инъекции — участок тела с наиболее развитым мышечным слоем, вводят иглу почти под прямым углом в глубь мышц и, надавливая на поршень, производят инъекцию культуры. Внутримышечно можно ввести до 2 мл жидкости. По окончании введения к месту укола прикладывают кусочек стерильной ваты и, слегка придавливая, быстро извлекают иглу, после чего рыбу опускают в аквариум.

3. Внутривентральное введение культуры. Культуру и рыбу готовят аналогично. При этом способе инъекции важно не повредить внутренние органы, поэтому желательно пользоваться слегка притупленными иглами. Иглу осторожно вводят в брюшную стенку и, почувствовав прекращение сопротивления тканей, шприц поворачивают параллельно брюшной стенке и вводят культуру.

4. Подкожное введение культуры. Прокалывают кожу и продвигают иглу на несколько миллиметров по направлению к голове, слегка отклоняют иглу вправо и влево и вводят культуру в образовавшуюся полость. Если не отклонять иглу, то введенная жидкость вытечет наружу.

5. Внутривенное введение культуры. Его осуществляют очень тонкой иглой. У чешуйчатых карпов удаляют одну чешую, обрабатывают место инъекции, как указано в п. 2, и вводят иглу в чешуйный карман, держа шприц параллельно боковой поверхности.

У зеркальных карпов иглу вводят под эпидермис, через который виден конец иглы. При правильном введении культуры в месте инъекции у зеркальных карпов образуется «наплыв» — эпидермис приподнимается, а у чешуйчатых в месте инъекции — ерошение чешуи.

6. Введение культуры методом скарификации. На обработанной поверхности кожи карпа прокаленным и охлажденным скарификатором или скальпелем делают 4 насечки так, чтобы не прорезать дерму. Стерильной пипеткой на скарифицированную поверхность нанести 0,2 мл взвеси, подержать рыбу в течение нескольких секунд для лучшего контакта культуры с местом ее инокуляции и рыбу опустить в воду.

Каждому опыту должен соответствовать контроль — аналогичным способом введенный стерильный МПБ или изотонический раствор хлорида натрия.

За рыбой проводят ежедневное наблюдение, регистрируя характер ее поведения и появление клинических признаков.

7. Обработка данных. Записывают в тетрадь схему стандартизации культуры и проведение биопробы.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 13, 27, 40, 55]

1. Для чего ставят биопробу?
2. Что такое вирулентность?
3. Какие требования предъявляются к рыбе, взятой для биопробы?

4. Какие существуют способы введения культуры?
5. Как осуществляется контроль за биопробой, что при этом отмечается?
6. Как проводится оценка результатов биопробы?
7. Как проводится количественная оценка вирулентности бактерий?

## МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ РЫБ

Основными методами, используемыми в вирусологии при диагностике вирусных заболеваний, являются культивирование и идентификация вирусов.

Для доказательства вирусной этиологии заболеваний необходимо выполнение так называемых постулатов Риверса, которые включают: выделение инфекционного агента из организма больного животного; пассирование выделенного агента на культуре клеток или чувствительных животных; доказательство вирусной природы выделенного агента; воспроизведение подобного заболевания у здорового животного того же или родственного вида; повторное выделение того же вируса от экспериментально зараженных животных.

Вирус выделяют в основном на культурах клеток, подбирая в каждом конкретном случае культуры, чувствительные к данному вирусу.

Для идентификации вирусов используют несколько взаимодополняющих методов: электронная микроскопия вируса; изучение физико-химических свойств; обнаружение характерных морфологических изменений в зараженных клетках или характерных симптомов у зараженных животных; различные иммунологические методы.

Выполнение лабораторных занятий, изложенных в этом разделе, позволит овладеть основными вирусологическими методами.

### Занятие 25. Первичнотрипсинизированная культура клеток

**Содержание.** Освоение метода получения первичнотрипсинизированной культуры клеток из ткани гонад карпа.

**Материальное обеспечение.** Карп с гонадами (яичниками) II стадии зрелости по шкале Киселевича, питательная среда 199 (основная среда Игла или 0,5%-ный раствор гидролизата лактальбумина), сыворотка крупного рогатого скота без консерванта, раствор антибиотиков (пенициллина и стрептомицина), сухой препарат трипсина, пробирки с МПБ, трижды перекристаллизованные неорганические соли NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O или готовый 0,25%-ный раствор трипсина «Дифко», солевой сбалансированный раствор Хенкса или Эрла, трижды дистиллированная вода, 0,5%-ный раствор трипанового синего, этиловый спирт, стерилизатор со стерильными инструментами (ножницами, хирургическим и анатомическим пинцетами), скальпель, столик для вскрытия рыбы, спиртовки или газовые горелки, стерильный фильтровальный аппарат с мембранным фильтром с диаметром пор 0,2 или 0,45 мкм, резиновая груша со шлангом, вата, сосуд со льдом, стерильная стеклянная посуда (пробирки, флаконы, пипетки, плоскодонная колба для трипсинизации вместимостью 100—150 мл, чашка Петри, центрифужные пробирки), камера Горяева, штативы для пробирочных культур, рефрижераторная центрифуга, термостат (28—30°C), микроскоп МББ, магнитная мешалка, холодильник, вакуумный насос (электрический или водоструйный), сливной сосуд, сосуд для стерильных инструментов.

**Организация и проведение работы.** Первичнотрипсинизированной культурой клеток называют клеточную культуру, полученную непосредственно из немалигнизированных (нормальных) тканей животных или человека в эмбриональном или постнатальном (послеродовом) периоде. В основе метода получения первичнотрипсинизированной культуры клеток лежит обработка кусочков ткани протеолитическими ферментами типа трипсина, которая приводит к разрушению межклеточных протоплазматических мостиков и расщеплению клеточной массы.

Для получения первичной культуры клеток рыб используют различные органы и ткани: недозрелые гонады самок, почки, сердце, кожу, плавники и др. Однако наиболее часто культуру клеток готовят из гонадной ткани самок, так как клетки гонад обладают большой потенцией роста *in vitro* (вне организма). Гонады должны быть II или II—III стадий зрелости по шкале Киселевича. Такие гонады не содержат икринок, различимых невооруженным глазом. Содержимое икринок отрицательно влияет на рост клеток.

Первичные культуры клеток используют для выделения и накопления вирусов, в качестве индикаторной системы при изучении различных свойств вируса, для изучения особенностей взаимодействия вируса с клеткой, а также для решения практических задач, связанных с диагностикой и производством препаратов для профилактики вирусных инфекций.

Культуры получают в условиях строгой асептики. Для успешного проведения вирусологических исследований и получения культур клеток важное значение имеет качество воды, которая используется для приготовления сред, солевых и дезагрегирующих растворов, мойки посуды. Вода не должна содержать токсических веществ, таких, как ионы тяжелых металлов (Сг, Fe и др.), пирогенных веществ и др.

Немаловажное значение для получения культур клеток имеет чистота используемой посуды и резиновых предметов. Остаток белка, недостаточно полное удаление следов щелочей и кислот во время мойки, плохая стерилизация могут привести к гибели культур.

1. Порядок приготовления воды. Для очистки воды используют стеклянные дистилляторы и бидистилляторы (БД-2, БД-4 и др.), деионизационные (ионообменные) установки. Вода, используемая для приготовления растворов и питательных сред, должна быть, по меньшей мере, дважды дистиллированной. При первой дистилляции добавляют перманганат калия для осаждения ионов тяжелых металлов и органических веществ, при второй дистилляции — раствор едкого натра. При наличии ионообменника дистиллированную воду можно пропустить через него.

Основными параметрами, характеризующими качество воды, являются удельная электропроводность, которая не должна превышать  $2 \cdot 10^{-6}$  См/см, и рН (не менее 5).

2. Мойка и стерилизация стеклянной посуды. Существует немало моющих средств, которые с успехом могут быть использованы

для обработки посуды (различные марки стиральных порошков, тринатрийфосфат, ОП-10 и др.). Для очистки сильно загрязненной посуды можно использовать хромовую смесь — хромпик (40 г  $K_2Cr_2O_7$  на 1 л  $H_2SO_4$ ).

При обработке посуды и резиновых предметов любым из моющих средств необходимо придерживаться следующей схемы: а) замачивание в одном из моющих растворов; б) мойка ершом в теплой воде с применением моющего средства и многократное ополаскивание теплой водопроводной водой; в) 3—4-кратное ополаскивание дважды дистиллированной водой; г) высушивание в сушильном шкафу; д) монтаж; е) автоклавирование в течение 30 мин при 1 атм или обработка сухим жаром (при  $180^{\circ}C$  2 ч). Резиновые предметы стерилизуют только автоклавированием.

Сильно загрязненную посуду после обработки моющим раствором ополаскивают водой и погружают в раствор хромпика на 30—40 мин, затем хромпик отмывают водопроводной водой, посуду погружают в слабый раствор бикарбоната натрия, после чего вновь ополаскивают водопроводной водой. Дальнейшую обработку ведут согласно пунктам в—е.

Подготовку посуды для стерилизации (монтаж посуды) осуществляют следующим образом. Горлышко колб, флаконов плотно закрывают алюминиевой фольгой, пробирки без пробок заворачивают в плотную бумагу или алюминиевую фольгу, верхний конец пипеток забивают ватой и помещают по нескольку штук в цилиндр для пипеток или каждую пипетку отдельно заворачивают в алюминиевую фольгу или пергаментную бумагу.

Пробки для пробирок и другой стеклянной посуды лучше стерилизовать отдельно, завернув их в алюминиевую фольгу или пергаментную бумагу.

3. Приготовление 0,5%-ного раствора трипсина. Используют трипсин, выпускаемый фирмой «Дифко» (США), трипсин для культур клеток (ГДР) или трипсин других марок. Для приготовления раствора трипсина используют высокоочищенные соли. Соли квалификации х: ч. (химически чистые), ч. д. а. (чистые для анализа); ч. (чистые) необходимо трижды перекристаллизовать. В 900 мл трижды дистиллированной воды последовательно растворяют следующие соли (в г):

NaCl	8,0
KCl	0,2
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	1,42
$KH_2PO_4$	0,2
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,1

Затем добавляют до 1 л трижды дистиллированную воду и вносят 5 г трипсина.

Вместо раствора трипсина, приготовленного в лаборатории, можно использовать 0,25%-ный раствор трипсина «Дифко», выпускаемый Институтом полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР. Концентрацию трипсина в нем повышают до 0,5%, добавляя сухой препарат трипсина.

Раствор трипсина фильтруют через бумажный фильтр, а затем стерилизуют фильтрацией через мембранный фильтр под вакуумом или лучше под давлением, так как этот метод более надежный (см. рис. 46). Профильтрованный раствор трипсина проверяют на стерильность, для этого небольшое количество раствора трипсина вносят в пробирку с МПБ и еще одну пробирку с МПБ берут в качестве контроля. Обе пробирки помещают в термостат при 28°C. При отсутствии роста на МПБ бактериальной микрофлоры в течение 1—3 сут трипсин считается стерильным и может быть использован в работе.

Порядок проведения работы следующий.

1. Выбор донора. Для получения гонад необходимо отбирать клинически здоровых неполовозрелых (2—3-летнего возраста) самок карпа. Для определения пола обхватывают брюшко рыбы большим и указательным пальцами и, слегка массируя его, перемещают пальцы по направлению к анальному отверстию. У самцов при этом иногда выделяются молоки. Рыб, у которых не выделяются молоки, используют для получения гонад. К сожалению, при таких манипуляциях молоки выделяются не у всех самцов, поэтому окончательно определить пол рыбы удается только после вскрытия.

2. Подготовка рыбы для взятия гонад. Рыбу обездвиживают, а затем обескровливают путем отрезания хвостового стебля или нарушения целостности сердечной камеры. На левой стороне тела рыбы обрезают грудной и брюшной плавники и удаляют чешую. Поместив рыбу на столик для вскрытия, свободную от чешуи боковую поверхность протирают ватным тампоном, смоченным этиловым спиртом, и вносят в бокс. В боксе поверхность тела рыбы еще 1—2 раза протирают спиртом.

3. Взятие гонад и подготовка их для трипсинизации. Всю последующую работу, включая посев клеток, проводят, соблюдая правила асептики. Стерильными ножницами вскрывают брюшную полость, вырезая брюшную стенку обычным способом (рис. 52). Анатомическим пинцетом извлекают левый яичник и помещают в стерильную чашку Петри, затем удаляют плавательный пузырь и извлекают правый яичник. Гонады освобождают от жира, серозных оболочек и крупных кровеносных сосудов, измельчают ножницами, промывают по нескольку раз раствором Хенкса или Эрла и переносят в колбу для трипсинизации.

4. Дезагрегация гонадной ткани. В колбу с гонадной тканью добавляют раствор трипсина (на 1 объем ткани 10 объемов трипсина) и помещают на магнитную мешалку. Трипсинизацию ткани проводят при комнатной температуре (через магнитную мешалку необходимо пропускать воду комнатной температуры). Через 10—15 мин трипсинизации надосадочную жидкость отсасывают пипеткой, в колбу добавляют такую же порцию питательной среды (раствора Хенкса или Эрла) и вновь помещают на магнитную мешалку. Полученная первая фракция в большой степени загрязнена кле-

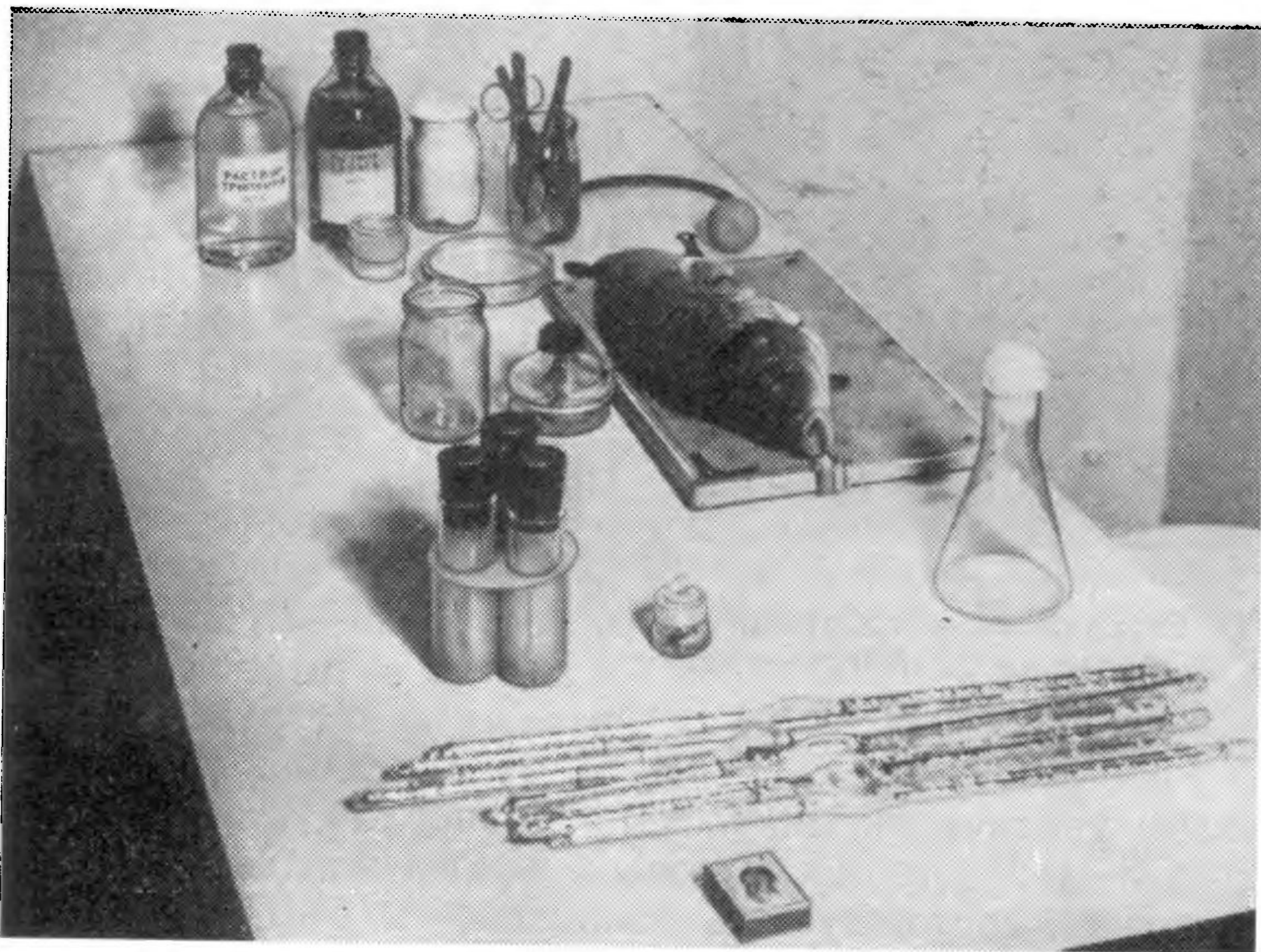


Рис. 52. Рабочее место, подготовленное для взятия гонад у карпа-донора

точным детритом, поэтому ее сливают в сливной сосуд. Через 10—15 мин образовавшуюся клеточную взвесь собирают во флакон, а в колбу добавляют свежую порцию раствора трипсина и всю процедуру повторяют. Чередую таким образом питательную среду с раствором трипсина, дезагрегацию ткани проводят до полного ее истощения (т. е. когда от кусочков ткани в колбе прекратится отделение клеток).

Клеточную взвесь, полученную при трипсинизации, собирают в отдельный флакон с небольшим количеством сыворотки крупного рогатого скота для нейтрализации фермента. Флакон с клеточной взвесью в течение всей процедуры дезагрегации сохраняют в находящемся в холодильнике сосуде со льдом.

5. Подготовка клеточной взвеси для подсчета. После окончания дезагрегации клетки осаждают центрифугированием при 60 g (приложение 13) в течение 20 мин. Осадок объединяют, ресуспендируя в небольшом количестве питательной среды.

6. Подсчет концентрации клеток. К 1 мл клеточной суспензии добавляют равный объем 0,5%-ного раствора трипанового синего и подсчитывают в счетной камере Горяева. Подсчет клеток ведут в 5 больших квадратах камеры. Считают неокрашенные клетки, так как окрашиваются при этом только нежизнеспособные клетки. Количество клеток в 1 мл взвеси рассчитывают по формуле  $X = a \cdot 100000$ , где  $a$  — количество клеток в 5 больших квадратах.

7. Посев клеток в культуральные сосуды. Клетки высевают в концентрации 600 тыс. клеток на 1 мл среды. Для получения необходимой концентрации к имеющейся клеточной взвеси добавля-

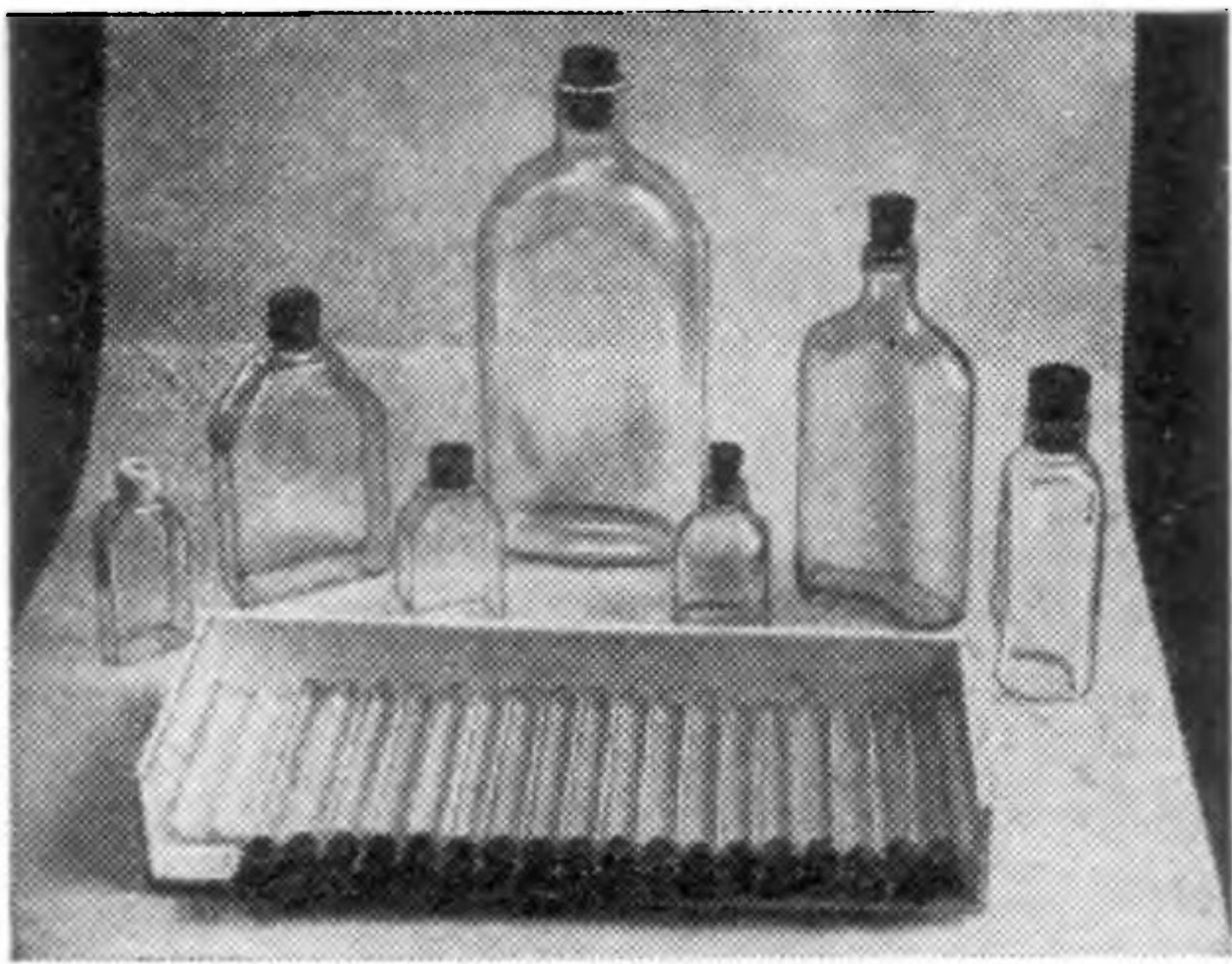


Рис. 53. Стеклоянная и пластикавая посуда, наиболее часто используемая для выращивания культур клеток

ют соответствующее количество питательной среды и сыворотки, но при этом конечная концентрация сыворотки должна составить 10—15%. К питательной среде добавляют антибиотики — пенициллин (100 ЕД/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл).

Клетки высевают в пробирки (по 1 мл) или другие культуральные флаконы (рис. 53) и инкубируют в термостате при температуре 28—30°C. Пробирки помещают в штативы для пробирочных культур под углом около 5°.

Наблюдение за ростом ведут при малом увеличении микроскопа. Монослой, как правило, образуется на 3—5-й день после посева и представляет собой смешанную культуру, состоящую из эпителио- и фибробластоподобных клеток (рис. 54). Через каждые 7—10 дней проводят смену среды с целью увеличения срока жизни культуры. Для смены среды используют среду того же состава, что для посева клеток.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 16, 35, 38, 57]

1. Что такое первичная культура клеток и для чего ее используют?
2. Требования, предъявляемые к воде, и методы ее очистки.
3. Порядок обработки стеклянной посуды.

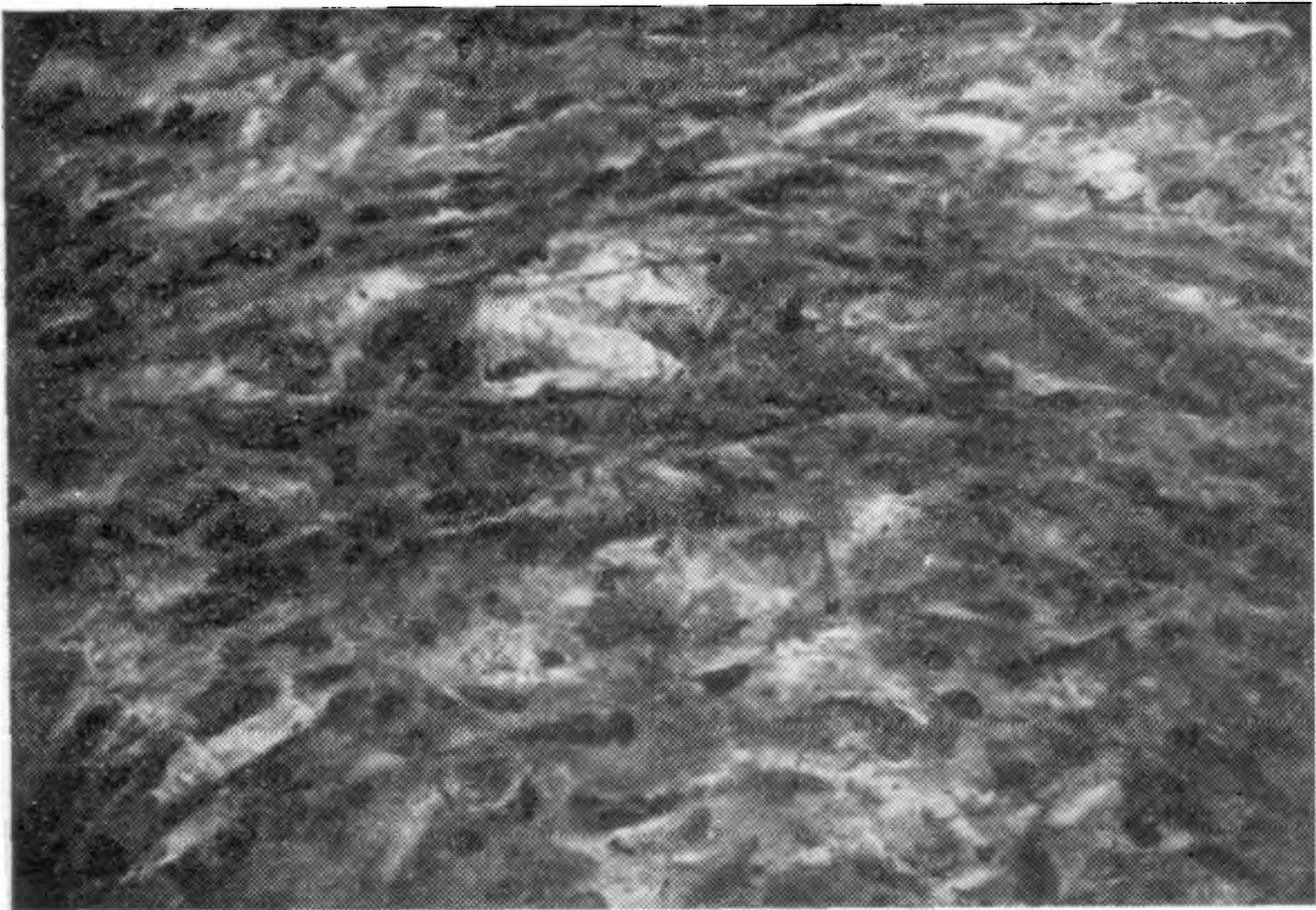


Рис. 54. Первично-трипсинизированная культура клеток из ткани гонад карпа на 5-е сутки после посева. Окраска по Паппенгейму

4. Рыбу какого возраста можно использовать в качестве донора гонад? Как определяют стадии зрелости гонад?

5. Почему для получения первичной культуры клеток из ткани гонад предпочтение отдают гонадам II стадии зрелости?

6. Каковы основные условия, необходимые для успешного получения культуры клеток?

7. Каковы этапы получения первичной культуры клеток?

8. Каким образом происходит расщепление ткани на клетки при обработке ее трипсином и добавлении питательной среды?

9. Как влияет температура на процесс трипсинизации ткани?

10. Почему окрашиваются только нежизнеспособные (погибающие или погибшие) клетки?

11. Каков состав среды, используемой для роста культуры клеток?

12. Почему клетки растут на поверхности стекла в виде монослоя?

13. Каков срок жизни первичной культуры клеток и каким образом можно его продлить?

## Занятие 26. Перевиваемые культуры клеток

**Содержание.** Оработка метода пассирования перевиваемых культур клеток.

**Материальное обеспечение.** Перевиваемая культура клеток, питательная среда и сыворотка, соответствующие данной линии клеток, 0,25%-ный раствор трипсина «Дифко», 0,02%-ный раствор версена, раствор пенициллина и стрептомицина, стерильная посуда (пробирки или флаконы для культуры клеток, градуированные пипетки на 1 и 2 мл и пипетки Мора на 5 и 10 мл, флаконы для приготовления питательной среды и диспергирующего раствора), сливной сосуд, спиртовки или газовые горелки, этиловый спирт, вата, резиновая груша со шлангом, термостат, микроскоп МББ, штативы для пробирочных культур.

**Организация и проведение работы.** Перевиваемыми называют культуры клеток, обладающие потенцией бесконечного размножения *in vitro*. Их широко используют для изучения вирусных болезней рыб. В СССР наибольшее применение нашли следующие клеточные линии: FHM — из тканей хвостового стебля жирноголового голяна *Pimephales promelas*, RTG-2 — из гонад радужной форели *Salmo gairdneri*, EPC — из клеток оспенных разrostов на коже карпа *Cyprinus carpio*.

Для поддержания роста перевиваемых культур необходимо проводить их систематическое пассирование (пересев). Процедура пересева культуры клеток складывается из трех основных этапов: выбор сосуда с хорошим состоянием культуры клеток, диспергирование клеточного монослоя, приготовление клеточной взвеси и посев клеток в новые культуральные сосуды.

Полноценная культура клеток может быть получена только от генерации жизнеспособных клеток. Поэтому просмотр культуры в световом микроскопе для оценки качества монослоя имеет решающее значение при выборе культуры для пересева. При хорошем состоянии культуры между клетками четко видны границы, а сами клетки имеют типичную для данной линии морфологическую характеристику (рис. 55—57). Наличие большого количества округленных клеток, нарушение типичной морфологической картины культуры, появление клеток с вакуолями, включениями и другими цитопатологическими признаками делают данную генерацию культуры непригодной для пересева. От этих изменений следует отли-

чать небольшое количество округлых клеток, которые легко смываются с поверхности монослоя и никак не отражаются на его качестве и годности к пересеву.

При проведении очередного пассажа культуру клеток из культурального сосуда пересевают в определенном отношении, которое называется отношением субкультивирования. Оптимальным отношением субкультивирования для перевиваемых культур клеток ЕРС и RTG-2 является 1 : 5 или 1 : 6, для культуры клеток FHM—

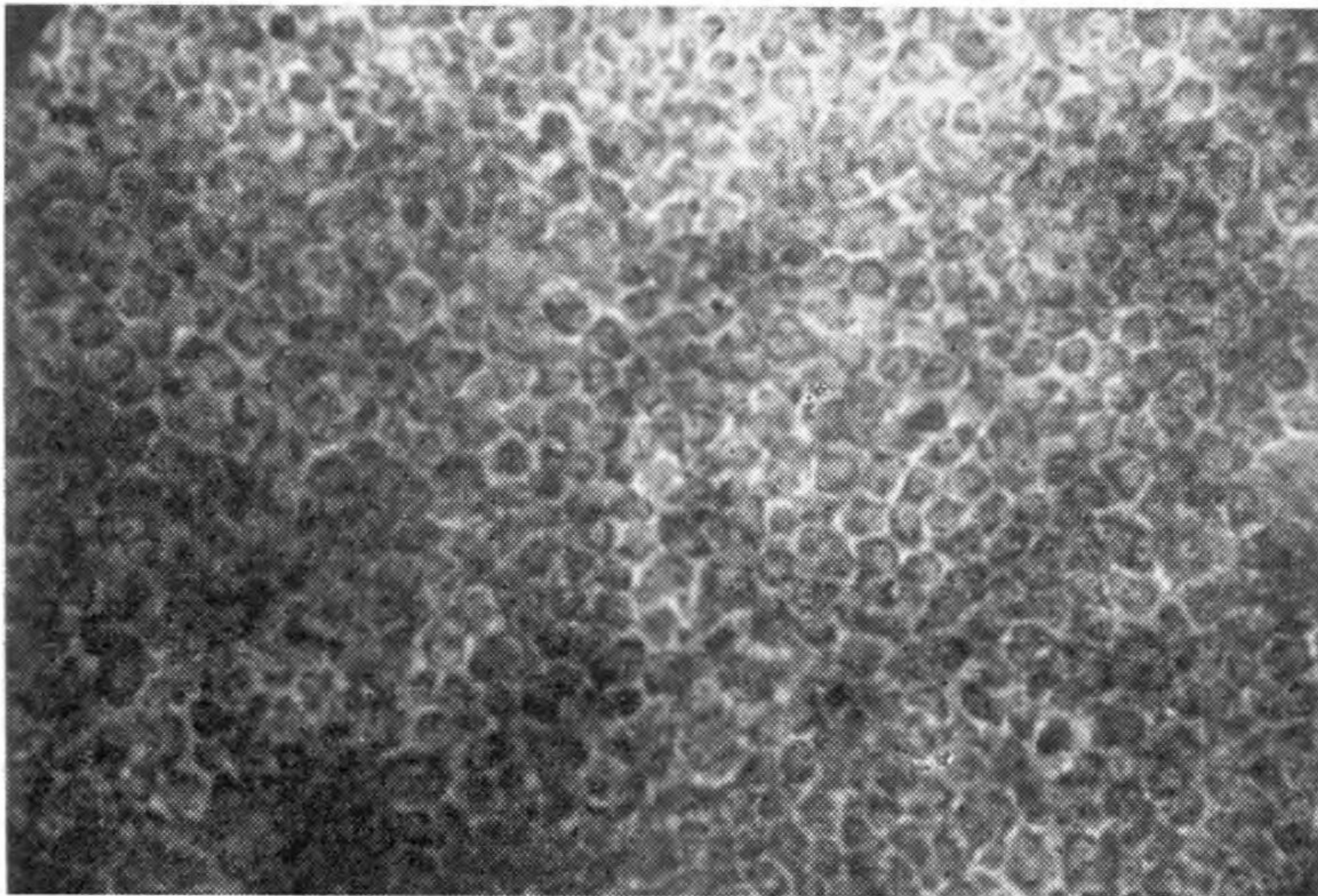


Рис. 55. Перевиваемая культура клеток ЕРС

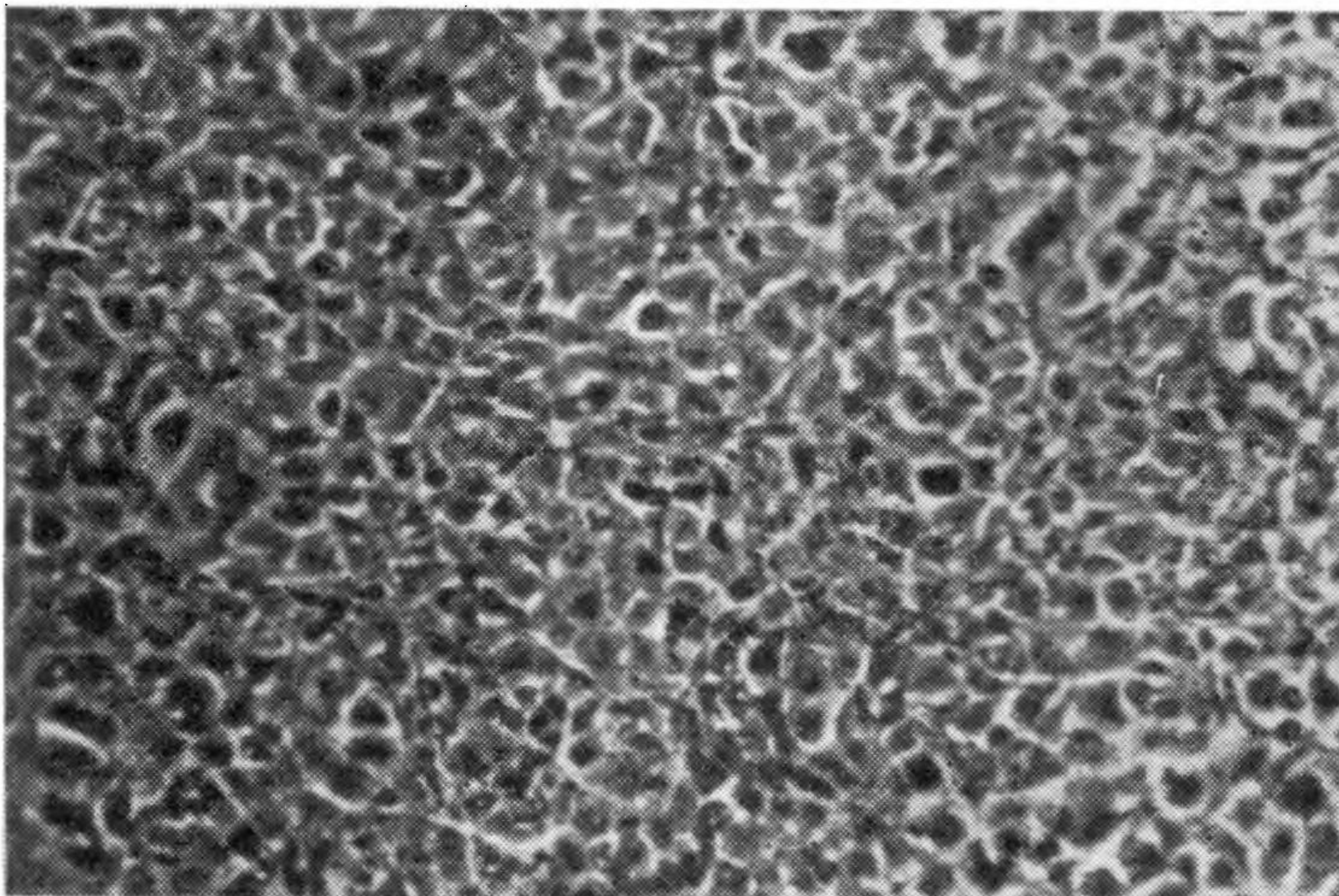


Рис. 56. Перевиваемая культура клеток FHM (из Хилл, 1976)

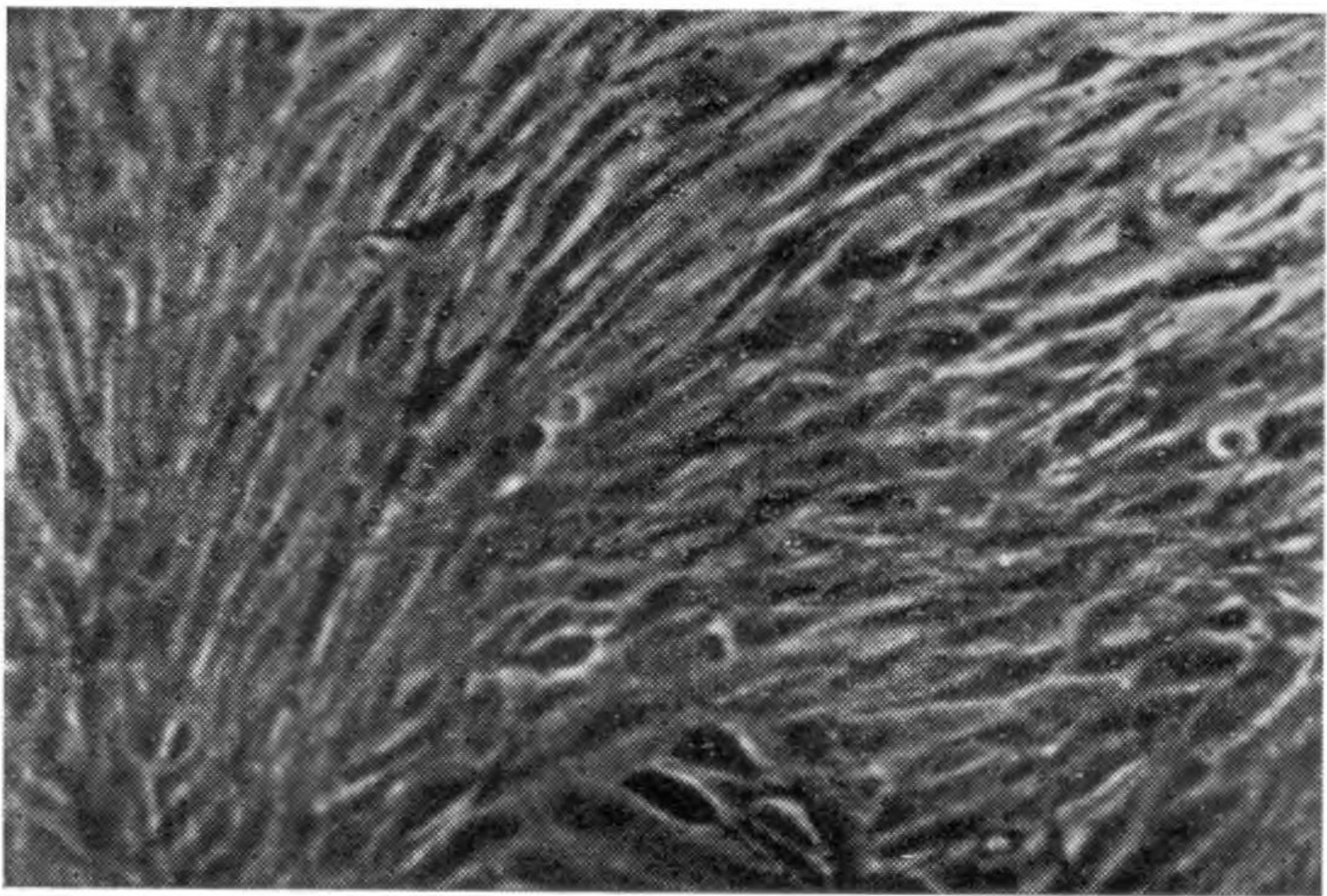


Рис. 57. Перевиваемая культура клеток RTG-2 (из Хилл, 1976)

1 : 4. Это значит, что первые две культуры из одного культурально-го сосуда пересевают в 5 или 6 таких же сосудов, последнюю — в 4 сосуда.

Порядок проведения работы следующий.

1. Отбор клеточной культуры для посева. Флаконы или пробирки с клеточными культурами просматривают при малом увеличении микроскопа. Для посева отбирают флаконы с хорошо сформированным монослоем и без признаков дегенерации.

2. Приготовление ростовой питательной среды. В стерильном флаконе готовят питательную среду следующего состава:

Среда Игла MEM, %	90
Сыворотка эмбриона крупного рогатого скота, %	10
Пенициллин, ЕД/мл	100
Стрептомицин, мкг/мл	100

Необходимый объем питательной среды определяют, учитывая отношение субкультивирования данной культуры клеток.

3. Приготовление диспергирующего раствора. Для отделения клеточного монослоя от стекла в стерильном флаконе готовят диспергирующий раствор, состоящий из растворов трипсина и версена.

Для культуры клеток FHM и EPC применяют смесь, состоящую из 5 частей 0,25%-ного раствора трипсина «Дифко» и 7 частей 0,02%-ного раствора версена. Для культуры RTG-2 диспергирующий раствор готовят, смешивая равные объемы растворов трипсина и версена.

Объем диспергирующего раствора готовят из расчета полного покрытия клеточного монослоя, а также небольшого количества

для предварительного ополаскивания клеток. Готовят его непосредственно перед употреблением.

4. Диспергирование и посев клеточной культуры. Проведение очередного пассажа перевиваемой культуры клеток осуществляют согласно приведенной ниже последовательности:

из культуральных флаконов сливают питательную среду;

в сосуд вносят небольшое количество диспергирующего раствора, ополаскивают им клеточный монослой и сливают;

вносят новую порцию диспергирующего раствора из расчета полного покрытия монослоя и оставляют на некоторое время (от 30 с и более, подбирают эмпирически);

после помутнения клеточного монослоя раствор сливают;

встряхиванием и покачиванием флакона добиваются полного отделения клеток от стекла;

во флакон вносят питательную среду (объем среды для ФНМ в 4 раза больше исходного, для ЕРС и RTG-2 — в 5—6 раз);

клетки ресуспендируют легким пипетированием и разливают в культуральные флаконы.

Флаконы с клеточной взвесью помещают в термостат. Культуру клеток ФНМ и ЕРС инкубируют при 28—30°C, RTG-2 — при 20—22°C. После образования сплошного монослоя меняют среду. Для этого готовят поддерживающую среду, которая отличается от ростовой меньшим содержанием сыворотки (до 2%). Для хранения клеточные культуры помещают в термостат при температуре 14—16°C. При регулярной смене среды через каждые 5—7 дней клеточный монослой может сохраняться до 3 мес.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 16, 38, 57, 58]

1. Что такое перевиваемая культура клеток и чем она отличается от первичной?
2. Какие перевиваемые культуры клеток Вы знаете?
3. Как оценивается состояние культуры клеток?
4. Какова роль трипсина и версена в диспергировании клеточного монослоя?
5. Какова схема пассирования перевиваемых культур клеток?
6. Какими факторами определяется время, необходимое для диспергирования монослоя?
7. Для чего используют перевиваемые культуры клеток?
8. Почему в поддерживающей среде количество сыворотки меньше по сравнению со средой роста?
9. Какие условия необходимы для продления срока сохранения клеточной генерации?

### З а н я т и е 27. Взятие и обработка патологического материала

**Содержание.** Отработка приемов взятия и обработки патологического материала.

**Материальное обеспечение.** Рыба с клиническими признаками вирусного заболевания, раствор Хенкса или Эрла, растворы пенициллина и стрептомицина, спирт этиловый, пробирки со стерильным МПБ, чашки Петри с МПА, столик для вскрытия рыбы, стерилизатор со стерильными инструментами (ножницами, анатомическими и хирургическими пинцетами), скальпель, стерильная фарфоровая ступка с пестиком, стерильный кварцевый песок, спиртовки или газовые горелки, стерильная посуда (пипетки, центрифужные пробирки, флаконы для пато-

логического материала), стерильный фильтровальный аппарат с мембранным фильтром с диаметром пор 0,45 мкм, вата, резиновая груша со шлангом, вакуумный насос (электрический или водоструйный), рефрижераторная центрифуга, термостат.

**Организация и проведение работы.** Патологический материал для вирусологических исследований берут от живых или только что погибших рыб с выраженными клиническими признаками заболевания в его начальной стадии или в разгаре. При сборе патологического материала необходимо учитывать способность вируса размножаться и накапливаться в тех или иных органах и тканях рыбы (тропизм вируса) и отбирать в первую очередь те органы и ткани, в которых вирус накапливается в наибольших количествах. При заболеваниях невыясненной этиологии исследуют в основном наиболее пораженные органы и ткани. Рыбу младших возрастных групп берут в количестве 30—40 шт. из одного пруда, объединяя по 10 шт. в одну пробу. Рыбу старших возрастных групп берут по 5—10 шт. из пруда, объединяя по 5 рыб в пробу.

Отбор патологического материала и последующую его обработку производят в асептических условиях. Патологический материал, используемый для проведения вирусологических исследований, освобождают от бактериальной и другой микрофлоры.

Порядок проведения работы следующий.

1. Сбор патологического материала. Рыбу обездвиживают, помещают на столик для вскрытия и вносят в бокс. В зависимости от поставленной задачи берут необходимые органы и ткани. Как правило, каждый орган берут отдельно и объединяют в одну пробу от нескольких рыб. Ножницами вырезают кусочки пораженной кожи и мышц и помещают в стерильную фарфоровую ступку. Удаляют жаберную крышку, ножницами вырезают жаберные дужки, обрезают жаберные лепестки и помещают в ступку.

Соблюдая правила асептики, вскрывают рыбу (см. занятие 25), пинцетом берут внутренние органы (печень, почки, селезенку и др.) и помещают в ступку. Кусочки кишечника и его содержимое собирают отдельно от остальных внутренних органов и помещают в стерильную ступку.

Асцитную жидкость отбирают пипеткой и переносят в пробирку с раствором Хенкса или Эрла до получения соотношения 1 : 10 или больше.

2. Экстракция вируса. Пробы кожи, мышц, жабр, а также внутренних органов тщательно измельчают и растирают в фарфоровых ступках с кварцевым песком. Из измельченных органов и тканей готовят 10%-ную суспензию на растворе Хенкса или Эрла и центрифугируют в течение 10—15 мин при 1000—2000 g.

Из кишечного содержимого готовят 20%-ную суспензию на растворе Хенкса или Эрла и центрифугируют при том же режиме.

3. Деконтаминация патологического материала (освобождение от бактериальной микрофлоры). Надосадочную жидкость осторожно отсасывают пипеткой и помещают в стерильные флаконы.

Деконтаминацию патологического материала проводят одним из двух способов — фильтрацией или обработкой антибиотиками. Сильно контаминированные патологические материалы фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор не более 0,45 мкм под вакуумом или под давлением (см. рис. 46).

Для деконтаминации патологических материалов, не сильно загрязненных бактериальной микрофлорой (например, патологический материал из паренхиматозных органов и др.), иногда бывает достаточной только обработка антибиотиками (пенициллин 1000 ЕД/мл, стрептомицин 1000 мкг/мл). После добавления антибиотиков патологические материалы выдерживают в течение 2—3 ч при комнатной температуре.

Патологические материалы, обработанные с помощью антибиотиков или путем фильтрования, проверяют на бактериальную стерильность, высевая на МПБ и МПА. В пробирки с МПБ вносят по 0,1—0,2 мл патологического материала, в чашку Петри с МПА — 0,2 мл патологического материала и распределяют по поверхности агара стеклянным шпателем. Пробирки и чашки Петри помещают в термостат при той температуре, при которой будут инкубироваться зараженные этим патологическим материалом культуры клеток, и ведут наблюдения в течение нескольких дней.

Освобожденные от бактериальной микрофлоры патологические материалы рекомендуется сразу же использовать для заражения культур клеток или рыбы. В тех случаях, когда этого сделать нельзя, патологические материалы сохраняют некоторое время в замороженном состоянии (при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  и ниже).

#### Контрольные вопросы [4, 5, 38, 52, 53, 56]

1. Что такое тропизм вируса?
2. Почему нельзя брать патологический материал от давно погибшей рыбы?
3. В какой период заболевания вероятность выделения вируса наибольшая и почему?
4. Как осуществляется сбор патологического материала и что при этом необходимо учитывать?
5. Каким образом экстрагируют вирус?
6. Какие методы и средства используют для деконтаминации патологического материала от бактериальной микрофлоры?
7. Почему обработанный патологический материал предпочтительно сразу использовать для исследований?
8. Как хранят обработанный патологический материал?

### Занятие 28. Выделение вируса на культурах клеток

**Содержание.** Освоение метода заражения культур клеток и пассирования вируса.

**Материальное обеспечение.** Первичная или перевиваемая культура клеток, среда и инактивированная сыворотка, соответствующие данной культуре клеток, раствор Хенкса или Эрла, растворы пенициллина и стрептомицина, обработанный патологический материал, свободный от бактериальной микрофлоры, стерильная посуда (пипетки на 5 и 10 мл, градуированные пипетки на 1 мл или 2 мл, флакон для приготовления питательной среды), спиртовки или газовые горелки, спирт этиловый, вата, штатив для пробирочных культур клеток, сливной сосуд, резиновая груша со шлангом, морозильная камера ( $-20^{\circ}\text{C}$  и ниже), термостат, микроскоп МББ.

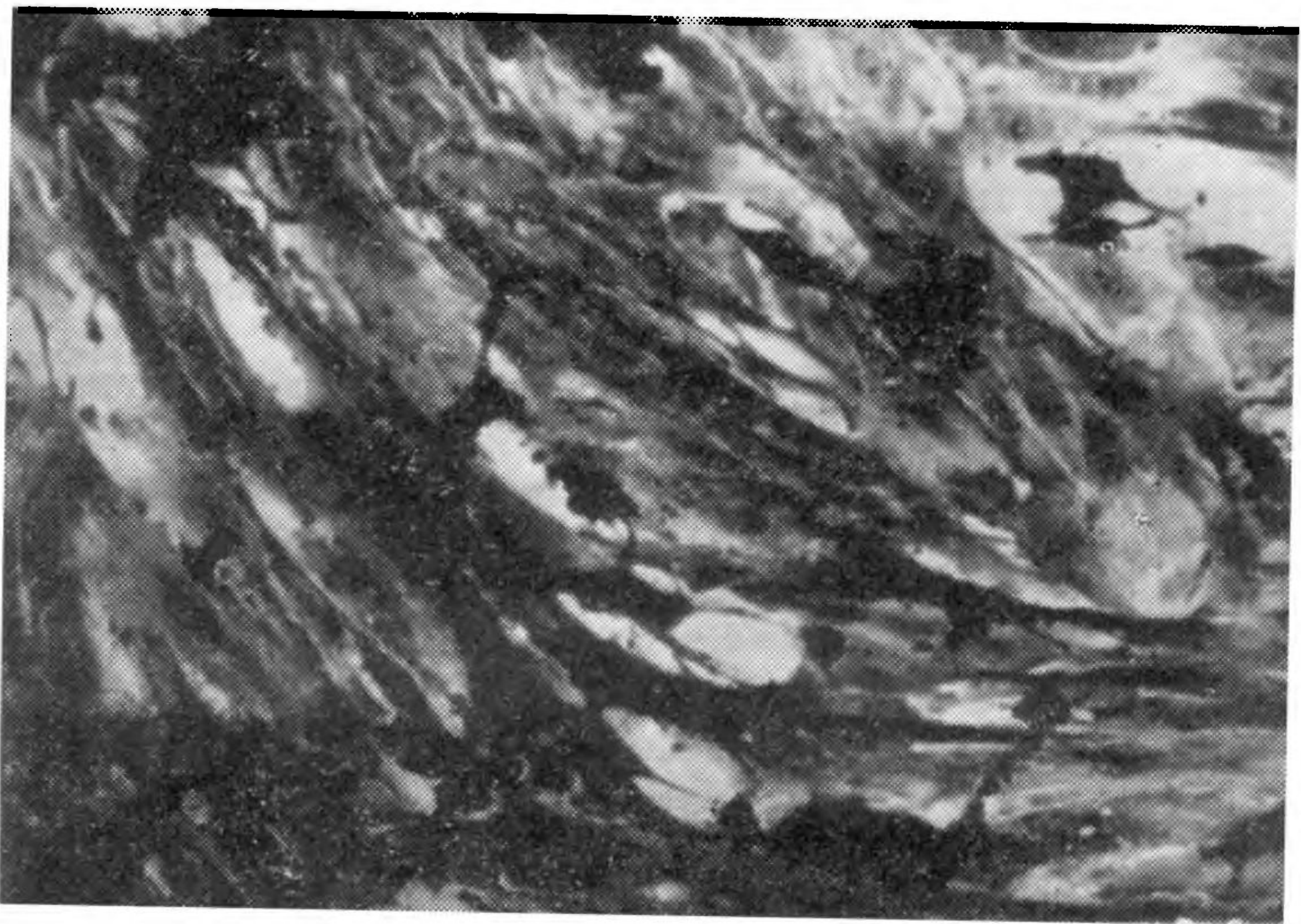


Рис. 58. Цитопатогенное действие вируса, выделенного от карпа при некрозе жабр на первично-трипсинизированной культуре клеток из ткани гонад карпа через 1 сут с момента заражения. Окраска по Паппенгейму

**Организация и проведение работы.** Выделение вируса на культурах клеток — одно из требований, предъявляемых для доказательства вирусной природы заболевания. Для выделения вируса необходимо подобрать чувствительные к нему культуры. Чувствительность клеток к вирусу определяется способностью вируса размножаться в данных клетках. Многие вирусы, размножаясь в клеточных культурах, нарушают их метаболизм и вызывают при этом цитопатические изменения, видимые при световой микроскопии нативных зараженных культур клеток или окрашенных препаратов из них (рис. 58).

Степень поражения клеточного монослоя оценивается по 4-кредитовой системе: + — поражение до 25% монослоя, ++ — до 50%, +++ — до 75%, ++++ — до 100%. Для выделения вируса необходимо использовать молодые клеточные культуры с хорошим состоянием клеточного монослоя (без признаков дегенерации), иначе очень трудно будет отличить изменения, вызываемые вирусом в клетках, от неспецифической дегенерации.

При заражении вирусом культуры клеток используется поддерживающая среда, которая содержит минимальное количество сыворотки (0,5—2%), необходимое для поддержания жизнеспособности клеток. В свою очередь сыворотка не должна содержать специфических и неспецифических ингибиторов, угнетающих размножение вируса. Неспецифические ингибиторы, как правило, содер-

жаты во всех сыворотках и подразделяются на термолабильные и термостабильные. Сыворотки, используемые при заражении культур клеток, необходимо освободить от термолабильных ингибиторов, прогревая их при 56°C в течение 30 мин.

Для каждого вируса существует своя оптимальная температура размножения в культуре клеток, что необходимо учитывать при выделении вируса.

Размножение вируса при первом заражении культуры клеток не всегда вызывает в ней видимые цитопатические изменения. Это может случиться либо из-за отсутствия достаточно активного размножения вируса, либо из-за неспособности вируса вызывать в данной культуре клеток какие-либо патологические изменения. В подобных случаях проводят 3—4 так называемых «слепых пассажа» в надежде, что в результате таких пассажей количество вируса увеличится, он адаптируется к данной культуре клеток и в проведенных пассажах его удастся обнаружить.

Нередко при первичном заражении культуры клеток патологическим материалом отмечают клеточную дегенерацию, сопровождающуюся иногда полным разрушением монослоя. Это происходит в результате токсического действия патологических материалов. Токсический эффект проявляется очень быстро, обычно через несколько часов после заражения. Однако уже во втором пассаже он выражен гораздо слабее или может отсутствовать совсем.

Порядок проведения работы следующий.

1. Отбор клеточных культур для заражения. Клеточные культуры просматривают при малом увеличении микроскопа. Для заражения отбирают пробирки с молодыми клеточными культурами без видимых цитопатических изменений.

2. Приготовление поддерживающей питательной среды. В стерильном флаконе готовят питательную среду следующего состава:

Среда, используемая для роста данной культуры, %	98—99,5
Сыворотка инактивированная, %	2—0,5
Пенициллин, ЕД/мл	100
Стрептомицин, мкг/мл	100

3. Порядок заражения культуры клеток. Клеточные культуры дважды отмывают питательной средой без сыворотки (можно использовать также раствор Хенкса или Эрла). Удалив среду из пробирки, вносят по 0,2—0,3 мл изучаемого патологического материала в каждую пробирку. Для каждого патологического материала используют по 4—6 пробирок с культурой клеток. Пробирки оставляют при комнатной температуре на 1—2 ч для адсорбции вируса на клетках. По прошествии указанного времени в каждую пробирку вносят поддерживающую питательную среду до первоначального объема. В некоторых случаях после окончания процедуры адсорбции испытуемые суспензии сливают, а в пробирки вносят поддерживающую питательную среду в первоначальном объеме.

В качестве контроля используют 4—6 пробирок с культурой клеток, с которыми проделывают те же самые манипуляции, исключая заражение.

Зараженные и контрольные культуры клеток инкубируют в термостате при температуре, оптимальной для размножения данного вируса. Культуры клеток ежедневно просматривают при малом увеличении микроскопа. Просмотр начинают с контрольных культур клеток. При наличии выраженных цитопатических изменений культуры клеток замораживают. При отсутствии изменений в течение 10—14 дней культуры также замораживают. После размораживания проводят следующий пассаж патологических материалов на свежей партии клеточной культуры.

Процесс замораживания и оттаивания проводят с целью разрушения клеток и освобождения из них вируса.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 38, 52, 53, 56]

1. Чем определяется чувствительность культуры клеток к вирусу?
2. Что такое цитопатогенное действие (ЦПД) вируса и как оно проявляется?
3. Как оценивается ЦПД?
4. Какие культуры клеток используют для выделения вируса?
5. Что означает понятие «слепые пассажи» и для чего они проводятся?
6. С какой целью прогревают сыворотку, используемую для приготовления питательной среды?
7. Что такое пассирование вируса на культуре клеток?
8. Из каких этапов складывается проведение каждого пассажа вируса?
9. Для чего проводят замораживание и оттаивание патологических материалов перед следующим пассажем?
10. Почему перед заражением культуры клеток монослой ее необходимо отмывать?

### Занятие 29. Титрование вируса

**Содержание.** Расчет ТЦД<sub>50</sub> по методу Рида и Менча.

**Материальное обеспечение.** Культура клеток, выращенная в пробирках, среда и инактивированная сыворотка, необходимые для данной культуры клеток, раствор Хенкса или Эрла, раствор пенициллина и стрептомицина, вирусосодержащая суспензия, стерильные пробирки с пробками, стерильные градуированные пипетки на 1, 2, 10 мл, стерильный флакон для приготовления питательной среды, штатив для пробирок, штатив для пробирочных культур, спиртовки или газовые горелки, спирт этиловый, сливной сосуд, сосуд с дезинфицирующим раствором, резиновая груша со шлангом, вата, микроскоп МББ, термостат.

**Организация и проведение работы.** Титрование вируса — количественное определение вирусной активности. Титр вируса выражается количеством инфекционных единиц, содержащихся в единице объема суспензии вируса. За инфекционную единицу вируса принимается такая его доза, которая вызывает инфекцию у 50% зараженных ею чувствительных объектов. Такая доза вируса называется инфекционной дозой и обозначается ИД<sub>50</sub>.

В качестве чувствительных объектов при титровании вирусов рыб используют главным образом культуры клеток. Титрование на культуре клеток осуществляют по цитопатогенному действию вирусов. В этом случае ИД<sub>50</sub> называют тканевой цитопатической

дозой (ТЦД<sub>50</sub>), а титр вируса выражают количеством ТЦД<sub>50</sub> в 1 мл вирусной суспензии. Титр вируса при этом определяют методом конечных разведений. Согласно этому методу в чувствительные культуры клеток вводят определенный объем суспензии вируса в последовательно возрастающих разведениях и, учитывая результат каждого введения как положительный (если есть ЦПД) или отрицательный (если ЦПД отсутствует), рассчитывают затем конечную точку титрования — 1 ТЦД<sub>50</sub>.

Для титрования вирусов, дающих ярко выраженное ЦПД (например, вирус VHS), используют также метод блюшек. При этом зараженный вирусом монослой клеток заливают смесью питательной среды с агаром, чтобы предотвратить перенос вируса на другие клетки, значительно удаленные от первично инфицированных, и иметь возможность идентифицировать первоначальные очаги заражения (бляшки). Каждая бляшка возникает из одной инфекционной единицы, которую обозначают БОЕ (бляшкообразующая единица), а титр вируса выражают количеством БОЕ в единице объема суспензии вируса.

Знание точного титра вируса необходимо при постановке серологических реакций, заражении чувствительных животных и во многих других случаях.

#### Порядок проведения работы следующий.

1. Отбор клеточных культур. Клеточные культуры просматривают при малом увеличении микроскопа. Для каждого предполагаемого разведения вируса отбирают по 4—6 пробирок с хорошо сформированным клеточным монослоем и без цитопатических изменений. Столько же пробирок с культурой оставляют в качестве контроля.

2. Приготовление питательной среды. В стерильных флаконах готовят питательную среду того же состава, что и для заражения культур клеток (см. занятие 28).

3. Приготовление разведений вируса. В ряду стерильных пробирок готовят серию десятикратных разведений вирусосодержащего материала. Для этого в каждую пробирку вносят по 4,5 мл среды, не содержащей сыворотки (можно использовать также раствор Хенкса или Эрла). Затем в первую пробирку сухой пипеткой вносят 0,5 мл исходной вирусной суспензии. Новой пипеткой тщательно перемешивают полученную суспензию и 0,5 мл ее переносят во вторую пробирку. Пипетку вновь отбрасывают, а новой пипеткой после тщательного перемешивания 0,5 мл переносят в следующую пробирку и т. д.

4. Заражение клеточных культур. Вирусом каждого разведения заражают по 4—6 пробирок с культурами клеток. Для этого из пробирок, предназначенных для заражения, удаляют питательную среду, дважды ополаскивают монослой средой без сыворотки (раствором Хенкса или Эрла). В каждую пробирку вносят по 0,2 мл вирусной суспензии. Оставляют при комнатной температуре в течение 1—2 ч для адсорбции вируса на клетках, после чего в каж-

дую пробирку добавляют питательную среду до первоначального объема. В качестве контроля используют 4—6 пробирок с культурой клеток, в которых ростовая среда заменена на поддерживающую после предварительного 2-кратного ополаскивания.

Пробирки с контрольными и зараженными культурами клеток инкубируют в термостате при температуре, оптимальной для размножения данного вируса. Клеточные культуры ежедневно просматривают при малом увеличении микроскопа. Результаты опыта записывают в таблицу. Наблюдения продолжают до тех пор, пока не перестанут появляться новые признаки ЦПД вируса. Для расчета титра важно только, заражены культуры клеток или нет, и не учитывается процент поражения монослоя. Расчет ТЦД<sub>50</sub> ведут по методу Рида и Менча.

5. Расчет ТЦД<sub>50</sub> по методу Рида и Менча. Согласно методу Рида и Менча процент положительных результатов рассчитывают, исходя не из действительных частот ответов, наблюдаемых при различных разведениях, а из так называемых «аккумулятивных сумм» положительных и отрицательных результатов, используемых затем для расчета величины ТЦД<sub>50</sub> путем интерполяции. В основе метода лежит допущение, согласно которому каждый испытуемый объект, ответивший положительно на введение вируса данного разведения, ответит положительной реакцией и на введение более концентрированного вируса. И наоборот, в случае если данное разведение дало отрицательную реакцию, постулируется, что при введении пробы большего разведения также будет получена отрицательная реакция.

**Примерный расчет ТЦД<sub>50</sub>.** Будем считать, что вирусом каждого разведения заражено 6 пробирок с культурой клеток, причем для заражения в пробирки вносили по 0,2 мл вирусосодержащего материала (табл. 15).

Графа 2 — количество пробирочных культур клеток с признаками ЦПД из 6 зараженных.

Графа 3 — количество пробирочных культур клеток без признаков ЦПД из 6 зараженных.

Т а б л и ц а 15

Разведе- ние ви- руса	Экспериментальные данные		Кумулятивные данные			
	количество пробирок с ЦПД	количес- тво пробир- ок без ЦПД	общее ко- личество пробирок с ЦПД	общее ко- личество пробирок без ЦПД	количество про- бирок с ЦПД/ общее количест- во пробирок	Процент про- бирок с ЦПД
1	2	3	4	5	6	7
10 <sup>-1</sup>	6	0	19	0	19/19	100
10 <sup>-2</sup>	5	1	13	1	13/14	92,9
10 <sup>-3</sup>	4	2	8	3	8/11	72,7
10 <sup>-4</sup>	2	4	4	7	4/11	36,4
10 <sup>-5</sup>	1	5	2	12	2/14	14,3
10 <sup>-6</sup>	1	5	1	17	1/18	5,6
10 <sup>-7</sup>	0	6	0	23	0/23	0

Графу 4 составляют по данным графы 2 на основании следующих рассуждений. Пробиричная культура клеток, в которой обнаружено ЦПД при заражении разведением вируса  $10^{-6}$ , будет иметь признаки ЦПД при заражении ее любой большей концентрацией вируса. Добавляя к одной пробиричной культуре с признаками ЦПД из зараженных разведением  $10^{-5}$  одну пробиричную культуру с ЦПД из зараженных разведением  $10^{-6}$ , в сумме получаем, что при заражении разведением  $10^{-5}$  ЦПД появится в 2 пробирках. Соответственно при заражении разведением  $10^{-4}$  ЦПД появится в 4 пробирках и т. д.

На основании аналогичных рассуждений и данных графы 3 составляют графу 5. Таким образом, пробирка без признаков ЦПД из зараженных разведением  $10^{-2}$  не будет иметь признаки ЦПД при заражении любым более высоким разведением вируса. Добавляя к двум пробиричным культурам без признаков ЦПД из зараженных разведением  $10^{-3}$  пробирку без ЦПД из зараженных разведением  $10^{-2}$ , в сумме получаем, что при заражении разведением  $10^{-3}$  ЦПД будет отсутствовать в 3 пробирках. Соответственно при заражении разведением  $10^{-4}$  ЦПД будет отсутствовать в 7 пробирках и т. д.

В графе 6 показано отношение количества пробирок с ЦПД (данные графы 4) к общему количеству зараженных пробирок (сумма данных граф 4 и 5). В графе 7 приведен процент пробирок с признаками ЦПД, рассчитанный по данным графы 6.

В нашем примере искомым 50%-ный показатель  $TЦД_{50}$  находится между разведениями  $10^{-3}$  и  $10^{-4}$ .

Для подсчета  $Ig TЦД_{50}$  находим фактор пропорциональности, соответствующий величине, на которую  $Ig$  разведения  $10^{-4}$  отличается от искомого значения (выраженного также через  $Ig$ ):  $(50-A)/(B-A) = (50-36,4)/(72,7-36,4) = 0,374$ , где  $A$  — % пробирок с признаками ЦПД из зараженных разведением  $10^{-4}$ , т. е. разведением, при заражении которым ЦПД появится меньше чем в 50% зараженных пробиричных культур;  $B$  — % пробирок с признаками ЦПД из зараженных разведением  $10^{-3}$ , т. е. разведением, при заражении которым ЦПД появится более чем в 50% зараженных пробиричных культур.

Зная фактор пропорциональности, находим десятичный логарифм искомого разведения ( $Ig TЦД_{50}$ ):

$$-4,000 - (-0,374) = -3,626;$$

$$I g TЦД_{50} = -3,626;$$

$$1 TЦД_{50} = 10^{-3,626}.$$

Следовательно,  $1 TЦД_{50}$  содержится в 0,2 мл вирусной суспензии разведения  $10^{-3,626}$ . Титр вируса выражается количеством  $TЦД_{50}$  в единице объема исходной вирусной суспензии, т. е. равен  $10^{3,626} TЦД_{50}/0,2$  мл.

### Контрольные вопросы [4, 28, 31, 38]

1. Что такое титр вируса?
2. Что такое  $IД_{50}$ ?
3. Для чего проводят титрование вируса?
4. Как готовят десятикратные разведения вируса?
5. Какое допущение лежит в основе расчета  $IД_{50}$  по методу Рида и Менча?
6. Что такое фактор пропорциональности при расчете титра?
7. Приведите пример расчета  $TЦД_{50}$  по методу Рида и Менча.
8. Какие способы титрования Вы знаете?
9. Что такое БОЕ?

## Занятие 30. Реакция нейтрализации на культуре клеток

**Содержание.** Оработка метода идентификации вируса в реакции нейтрализации.

**Материальное обеспечение.** Испытуемый антиген (культуральная вирусосодержащая жидкость), гипериммунная сыворотка, нормальная сыворотка (получе-

на от животного того же вида, от которого получена гипериммунная), пробирочная культура клеток, чувствительная к данному вирусу, среда и инактивированная сыворотка, необходимые для данной культуры клеток, раствор пенициллина и стрептомицина, стерильная посуда (пробирки с пробками, пипетки градуированные на 1, 2, 5 и 10 мл, флакон для приготовления питательной среды), микроскоп МББ, термостат, штатив для пробирок, штатив для пробирочных культур клеток, спиртовки или газовые горелки, спирт этиловый, резиновая груша со шлангом, вата, сливной сосуд, сосуд с дезинфицирующим раствором, таблица антилогарифмов.

**Организация и проведение работы.** Серологические методы диагностики позволяют быстро и точно поставить диагноз на инфекционное, в том числе вирусное, заболевание. В основе серологических реакций лежит связывание антигена антителами гомологичной антисыворотки. В зависимости от типа присутствующих в сыворотке антител (нейтрализующих, преципитирующих, комплекссвязывающих) используют соответствующие серологические реакции: реакцию нейтрализации (РН), реакцию преципитации (РП) и реакцию связывания компонента (РСК).

Реакция нейтрализации — один из основных серологических методов, применяемых в вирусологической практике. Она используется для идентификации выделенных вирусов при диагностике заболеваний вирусной этиологии, оценки противовирусных диагностических и профилактических препаратов. Принцип реакции нейтрализации заключается в том, что вирус, нейтрализованный специфическими антителами, теряет способность размножаться в чувствительной системе, т. е. в культуре клеток или рыбы. В реакции нейтрализации можно определять по известным антителам неизвестный вирусный антиген или по заведомо известному (стандартному) антигену — неизвестные антитела в сыворотках больных или переболевших рыб.

В ихтиовирусологии используют в основном первый вариант реакции. В этом случае идентификацию выделенного вируса в реакции нейтрализации проводят, применяя набор диагностических гипериммунных антисывороток (антител) и гомологичных к ним антигенов (вирусов). Гипериммунные антисыворотки получают, заражая лабораторных животных (в основном кроликов) известными штаммами вирусов — возбудителей болезней рыб. Схему иммунизации животного подбирают индивидуально для каждого вируса. После получения антисывороток определяют в них титры специфических антител. Пригодными считают антисыворотки, содержащие антитела в достаточно высоких титрах.

Испытуемым антигеном, как правило, служит культуральная вируссодержащая жидкость, но можно также использовать и патологический материал, обработанный общепринятым способом.

При определении антител в сыворотках рыб в качестве стандартных антигенов применяют штаммы известных вирусов, предварительно определив их титр. Используемые в реакции нейтрализации сыворотки должны быть освобождены от термолabileльных ингибиторов прогреванием при 56°C в течение 30 мин.

Наибольшее распространение получили два варианта реакции: реакция нейтрализации с титрованием вируса при постоянном разведении сыворотки (в икhtiовирусологии используют в основном ее); реакция нейтрализации с титрованием антител при постоянной дозе вируса.

В том случае, когда постановка реакции по первому варианту затруднена ограниченным количеством гипериммунной сыворотки, идентифицировать вирус можно с помощью более экономичной и простой реакции. Однако для ее постановки необходимо знать титры гипериммунной сыворотки и испытуемого вируса. Гипериммунную сыворотку разводят в 20—100 раз и более в зависимости от титра и смешивают с равным количеством вирусосодержащей жидкости, разведенной до концентрации 100 ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл. После часовой экспозиции при комнатной температуре заражают обычным способом 4 пробирки с культурой клеток, внося в них по 0,2 мл смеси. Параллельно с основной реакцией ставят необходимые контроли. Результат считается положительным, если ЦПД в пробирках основной реакции не наблюдается.

Порядок проведения работы следующий.

Реакция нейтрализации с титрованием вируса при постоянном разведении сыворотки.

1. Инактивирование сывороток. Инактивируют нормальную и гипериммунную сыворотки, используемые в реакции, если они не инактивированы.

2. Приготовление разведений ингредиентов реакции. Питательной средой без сыворотки и антибиотиков разводят антиген и сыворотки, как указано ниже:

а) в ряду стерильных пробирок, размещенных в штативе, готовят десятикратные разведения испытуемого вирусного антигена (см. занятие 29), начиная с разведения 1 : 5. При этом получают ряд последовательных разведений вируса — 1 : 5, 1 : 50, 1 : 500 и т. д. Последнее разведение вируса должно содержать менее 1 ТЦД<sub>50</sub>/0,2 мл (0,2 мл — объем материала, используемый для заражения одной пробирки с культурой клеток);

б) гипериммунную сыворотку разводят 1 : 2 или 1 : 5 (не более); если титр сыворотки мал, ее используют неразведенной;

в) нормальную сыворотку разводят так же, как и гипериммунную.

3. Постановка реакции. В штативе размещают три ряда стерильных пробирок. Количество пробирок в каждом ряду равняется числу приготовленных разведений вируса. В первый ряд разливают разведенную гипериммунную сыворотку, во второй ряд — разведенную нормальную сыворотку, в третий ряд — питательную среду. Каждый ингредиент вносят в объеме 0,5 мл.

Приготовленные разведения вируса переносят по 0,5 мл в соответствующие пробирки каждого из трех рядов, причем вирус каждого разведения переносят отдельной пипеткой или одной, начиная с наибольшего разведения. Таким образом, в каждом ряду

пробирок получают последовательные десятикратные разведения вируса  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  и т. д.

Для постановки контролей на токсичность сывороток поступают следующим образом. В отдельную пробирку вносят 0,5 мл приготовленного разведения гипериммунной сыворотки, а затем прибавляют к ней равное количество питательной среды. То же проделывают с нормальной сывороткой.

Пробирки с приготовленными смесями тщательно встряхивают и выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч. По истечении времени производят заражение чувствительной культуры клеток (см. занятие 28), заражая каждым разведением вируса с гипериммунной, нормальной сывороткой и питательной средой по 4 пробирки с культурой клеток. Параллельно ставят контроли на токсичность используемых сывороток и контрольные пробы культуры клеток.

Пробирки с культурой клеток инкубируют в термостате при оптимальной для размножения данного вируса температуре, ежедневно просматривают под малым увеличением микроскопа для обнаружения ЦПД вируса. Результаты заносят в табл. 16. Учет результатов реакции проводят через определенное время, спустя которое ЦПД уже не проявляется в тех пробирках, где оно отсутствовало. При этом результаты контролей культуры клеток и токсичности сывороток должны быть такими, как указано в табл. 16.

Титр вируса, а также титр вируса в присутствии гипериммунной и нормальной сывороток рассчитывают по методу Рида и Менча. Находят индекс нейтрализации (IN); он соответствует максимальному количеству ИД<sub>50</sub>, которое может быть нейтрализовано гипериммунной сывороткой.

Расчет IN ведут по формуле

$$\lg \text{IN} = \lg T_1 - \lg T_2,$$

где  $T_1$  — титр вируса в присутствии нормальной сыворотки;  $T_2$  — титр вируса в присутствии гипериммунной сыворотки.

Значение IN находят по таблице антилогарифмов. Принято считать значения IN до 10 отрицательным результатом реакции, от 10 до 49 — сомнительным, 50 и более — положительным.

Результаты реакции можно считать достоверными только в том случае, если гипериммунная сыворотка проверена на специфическую нейтрализующую активность. Для этого предварительно определяют титр нейтрализующих антител в этой сыворотке или ее индекс нейтрализации в реакции с гомологичным вирусом.

При идентификации вируса реакцию нейтрализации ставят с несколькими гипериммунными сыворотками. Тип вируса устанавливают по гипериммунной сыворотке, которая показала наивысший индекс нейтрализации.

Сравнивая индекс нейтрализации гипериммунной сыворотки в реакции с испытуемым вирусом с индексом нейтрализации ее в реакции гомологичным (стандартным) вирусом, на который она была получена, судят об антигенном родстве этих вирусов.

Реакция нейтрализации с титрованием вируса

Ингредиенты реакции	Основная реакция		Контроль						токсичнос- ти		культуры клеток		
	нейтрализующей ак- тивности NS		активности испытуемого вируса						SS	NS			
	Конечные разведения испытуемого вируса						10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>				10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>			10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>			
Гипериммунная сыворотка (SS)	0,5	0,5	—	—	—	—	—	—	—	0,5	—	—	
Нормальная сыворотка (NS)	—	—	0,5	0,5	0,5	0,5	—	—	—	—	0,5	—	
Испытуемый вирус в соответствую- ющих разведениях	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—	—	—	
Питательная среда	—	—	—	—	—	—	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
Результаты	Количество пора- женных пробирок из 4	Клетки выгля- дят нормально (токсичного эффекта нет)											
	Титр вируса	Клетки выгля- дят нормально (токсичного эффекта нет)											
Индекс нейтрали- зации													

1. Каков принцип серологических реакций?
2. Какие антитела присутствуют в сыворотке больных рыб и в каких реакциях они определяются?
3. Каков принцип реакции нейтрализации?
4. Какие компоненты участвуют в реакции нейтрализации и как их готовят?
5. Какие модификации реакции нейтрализации существуют, чем они отличаются друг от друга и какие из них используют в ихтиовирусологии?
6. В каких случаях используется реакция нейтрализации с титрованием антигена и титрованием антител?
7. Схема постановки реакции нейтрализации с титрованием вируса.
8. Как осуществляется учет реакции нейтрализации с титрованием вируса?
9. Что такое индекс нейтрализации и как он определяется?
10. Какие контроли ставят в реакции нейтрализации и для чего?

### З а н я т и е 31. Метод флюоресцирующих антител

**Содержание.** Идентификация вируса непрямым методом иммунофлюоресценции.

**Материальное обеспечение.** Вирусодержащая суспензия, культура клеток, чувствительная к данному вирусу, выращенная на покровных стеклах, питательная среда и инактивированная сыворотка, необходимые для данной культуры клеток, раствор пенициллина и стрептомицина, стерильная посуда (флакон для приготовления питательной среды, пипетки на 1, 2, 5 мл), химически чистый ацетон, изотонический забуференный раствор NaCl с pH 7,2—7,4, специфическая гипериммунная сыворотка, полученная при иммунизации стандартным вирусом, нормальная сыворотка животного того же вида, антивидовой флюоресцирующий иммуноглобулин, флюоресцирующий иммуноглобулин, специфичный по отношению к белкам сыворотки животного другого вида, забуференный глицерин с pH 8,2, термостат (37°C), влажная камера (чашка Петри с кружком смоченной фильтровальной бумаги), люминесцентный микроскоп, спиртовки или газовые горелки, сливная банка, сосуд с дезинфицирующим раствором, спирт этиловый, резиновая груша со шлангом, фильтровальная бумага.

**Организация и проведение работы.** Метод флюоресцирующих антител (МФА, метод иммунофлюоресценции) широко применяют в вирусологических исследованиях.

Наиболее часто МФА применяют с целью:  
идентификации вируса;  
определения локализации вирусных антигенов в клетке;  
изучения динамики синтеза различных вирусных антигенов в зараженной клетке;

индикации зараженных вирусом клеток в системах, где отсутствует цитопатический эффект; в подобных случаях окрашивание клеток флюоресцирующими антителами может послужить основой количественного определения инфекционности вирусов;

индикации зараженных вирусом клеток, в которых при отсутствии синтеза инфекционного вируса тем не менее продолжают синтезироваться другие белки, кодируемые вирусным геномом.

МФА — достаточно чувствительный и специфичный метод диагностики, позволяющий экономить время и материалы. В МФА используют антитела, меченные флюоресцирующими красителями (флюорохромами). Соединение антител с флюорохромами (конъюгация) осуществляют по специальной методике. Флюорохромы характеризуются тем, что при облучении ультрафиолетовым светом их молекулы флюоресцируют. В качестве флюорохромов использу-

ют различные вещества. Наибольшее применение нашел флюоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), дающий яркую желто-зеленую флюоресценцию. Мечение антител флюорохромами позволяет обнаружить комплекс антиген — антитело в люминесцентном микроскопе.

МФА используют для диагностики VHS, IHN, IPN, SVC и других вирусных болезней рыб.

Существует два основных метода диагностического применения флюоресцирующих антител — прямой и непрямой.

1. Прямой метод. Для обнаружения антигенов прямым методом используют меченую гипериммунную сыворотку. Если антитела сыворотки гомологичны вирусному антигену, они вступают с ним в связь и образуют флюоресцирующий комплекс антиген — антитело. Несвязавшиеся антитела удаляют отмыванием препарата буфером.

Для доказательства специфичности флюоресценции в качестве контрольных при постановке прямого МФА следует использовать: незараженные клетки, обработанные меченой иммунной сывороткой;

зараженные клетки, обработанные меченой нормальной сывороткой;

зараженные вирусом клетки, сначала обработанные нефлюоресцирующей антисывороткой к данному вирусу, а затем меченой иммунной сывороткой;

зараженные вирусом клетки, сначала обработанные нормальной, а затем меченой иммунной сывороткой.

2. Непрямой метод. В отличие от прямого метода иммунофлюоресценции непрямой метод представляет собой сочетание двух иммунологических реакций. При первой реакции содержащиеся в зараженных клетках вирусные антигены обрабатывают немеченой специфической иммунной сывороткой. Если антитела сыворотки гомологичны антигену и связались с ним, то образуется нефлюоресцирующий комплекс антиген — антитело. Для обнаружения этого комплекса на препарат наносят флюоресцирующую антивидовую сыворотку, содержащую антитела к белкам сыворотки того вида животного, от которого была получена специфическая иммунная сыворотка. При взаимодействии флюоресцирующей антивидовой сыворотки с комплексом антиген — антитело образуется флюоресцирующий комплекс.

Непрямой метод более гибок, чем прямой, так как в этом случае достаточно иметь одну меченую антивидовую сыворотку и, применяя в каждом случае соответствующую видовую специфическую иммунную сыворотку, можно выявлять различные антигены. Кроме того, непрямой метод более чувствителен, чем прямой, поскольку в результате первой реакции между антигеном и антителом увеличивается поверхность, связывающая антитела, меченные флюорохромом. Однако при непрямом методе возрастает опасность неспецифической флюоресценции, поэтому для ее исключения необходимо поставить контроли:

незараженные клетки, обработанные теми же реагентами; зараженные клетки, обработанные вначале нормальной, а затем меченой антивидовой сывороткой;

зараженные вирусом клетки, обработанные противовирусной антисывороткой, а затем меченой антивидовой сывороткой, специфичной по отношению к  $\gamma$ -глобулину иной видовой принадлежности.

Для МФА предпочтительно использовать не нативные сыворотки, а их глобулиновые фракции с целью исключения неспецифической конъюгации с флюоресцентными красителями. Глобулиновые фракции выделяют из сыворотки крови различными методами: высаливанием некоторыми солями, разделением при помощи ионообменников, препаративного электрофореза и др.

В качестве исследуемых объектов, проверяемых на присутствие вирусного антигена, в МФА используют мазки-отпечатки пораженных органов и тканей, гистологические срезы замороженных тканей или культуры клеток, выращенные на покровных стеклах и зараженные вирусом.

Порядок проведения работы следующий.

Культуру клеток выращивают на покровных стеклах. Для этого полоски покровных стекол размером  $24 \times 9$  мм, обработанные так же, как и вся стеклянная посуда, помещают в пробирки. При посеве культуры в такие пробирки концентрация клеток должна быть выше обычной. В пробирки заливают такой объем клеточной суспензии, чтобы покровное стекло было полностью покрыто.

Культуру клеток, выращенную на покровных стеклах, заражают вирусной суспензией и инкубируют в течение 24—48 ч при оптимальной для размножения данного вируса температуре.

Для постановки контролей, описанных выше, оставляют одну пробирку с незараженной и две пробирки с зараженной культурой клеток.

Покровные стекла с зараженной культурой клеток ополаскивают солевым забуференным раствором. Затем фиксируют в ацетоне в течение 10 мин при комнатной температуре. На фиксированные препараты после испарения ацетона наносят каплю разведенной специфической иммунной сыворотки. Разведение зависит от титра сыворотки и определяется заранее.

Препараты помещают во влажную камеру при  $37^{\circ}\text{C}$  и выдерживают в течение 30 мин. Затем препараты промывают в течение 30 мин в 3 сменах солевого забуференного раствора для удаления несвязавшейся сыворотки. На препараты наносят антивидовой стандартный иммуноглобулин, меченный ФИТЦ, помещают во влажную камеру при  $37^{\circ}\text{C}$  и выдерживают 30 мин. После этого препараты промывают, как описано выше, высушивают между листами фильтровальной бумаги, наносят на них по капле забуференного глицерина (рН 8,2), накрывают покровным стеклом и просматривают под иммерсией в люминесцентном микроскопе.

Одновременно с испытуемыми препаратами по тем же самым этапам проводят покровные стекла с контрольными культурами,

которые на каждом этапе обрабатывают соответствующими ингредиентами.

В препаратах, полученных из зараженных культур клеток, наблюдается специфическое яркое желто-зеленое свечение, в контрольных свечение отсутствует или наблюдается слабое диффузное свечение.

#### Контрольные вопросы [4, 31, 35, 38, 53]

1. Каков принцип МФА?
2. Что такое флюорохромы, какие флюорохромы Вы знаете?
3. Для чего используется МФА?
4. Какова схема прямого метода иммунофлюоресценции?
5. Какова схема непрямого метода иммунофлюоресценции?
6. Что используют в качестве антигена в МФА?
7. Каково применение МФА в ихтиовирусологии?
8. Почему предпочтительнее использовать в МФА глобулиновые фракции, а не нативные сыворотки?
9. Какими качествами различаются прямой и непрямой методы иммунофлюоресценции?
10. Почему для отмывания клеточного монослоя используют не дистиллированную воду, а изотонический забуференный солевой раствор?
11. Как возникает неспецифическая флюоресценция и каковы способы ее устранения?

### З а н я т и е 32. Физико-химические свойства вируса

**Содержание.** Оработка методик определения чувствительности вируса к хлороформу, эфиру, величине рН, а также нагреванию.

**Материальное обеспечение.** Вирусосодержащая культуральная суспензия, пробирочная культура клеток, чувствительная к данному вирусу, питательная среда и инактивированная сыворотка, необходимые для данной культуры клеток, раствор пенициллина и стрептомицина, хлороформ, диэтиловый эфир, фосфат-цитратный буфер с рН 3,0, трис-НСI буфер с рН 8,0, стерильная стеклянная посуда (центрифужные пробирки с пробками, пробирки с пробками, градуированные пипетки на 1 мл, пипетки на 5 и 10 мл, флакон для приготовления питательной среды), стерильные резиновые пробки с отводными трубками, штатив для пробирок, штатив для пробирочных культур, вакуумный насос, рефрижераторная центрифуга, водяная баня с регулируемой температурой, термостат, холодильник, микроскоп МББ, спиртовки или газовые горелки, спирт этиловый, резиновая груша со шлангом, вата, сливной сосуд, сосуд с дезинфицирующим раствором.

**Организация и проведение работы.** Для идентификации выделенного вируса помимо проведения серологических реакций определяют некоторые его физико-химические свойства (чувствительность к эфиру, хлороформу, рН и др.).

При обработке эфиром содержащиеся во внешней оболочке вируса липиды растворяются в нем. Это приводит к разрушению оболочки и потере инфекционности вируса. По чувствительности вируса к эфиру судят о наличии у него внешней липидсодержащей оболочки.

Считается, что к действию хлороформа резистентны мелкие вирусы диаметром менее 35 нм.

Определение чувствительности вируса к различным значениям рН и нагреванию при различных температурах используется в дальнейшей работе с данным вирусом.

## Порядок проведения работы следующий.

Все работы по изучению физико-химических свойств вируса проводят с соблюдением правил асептики.

1. Определение чувствительности вируса к эфиру. В стерильную пробирку вносят 8-мл вирусосодержащей культуральной жидкости, затем добавляют 2 мл диэтилового эфира и плотно закрывают резиновой пробкой.

Параллельно необходимо поставить контроли:

контроль необработанного вируса (в пробирку вносят 8 мл вирусосодержащей культуральной жидкости);

контроль на токсичность эфира для культуры клеток (в пробирку вносят 8 мл культуральной жидкости незараженной культуры клеток, затем добавляют 2 мл диэтилового эфира).

Все три пробирки (опытная и две контрольные) тщательно встряхивают в течение 10 мин и оставляют в течение 16—20 ч при 4°C (в холодильнике). По истечении времени заменяют пробки содержащих эфир пробирок на пробки с отводными трубками и эфир из водной фазы откачивают под вакуумом. Если нет вакуумного насоса, то пробирки можно закрыть ватно-марлевыми пробками и поставить в холодильник при 4°C для испарения эфира.

После полного удаления эфира определяют титр вируса, обработанного эфиром, и исходного необработанного. Если вирус нечувствителен к эфиру, то титр обработанного вируса не будет отличаться от титра контрольного.

Параллельно в 4 пробирочные культуры вносят по 0,2 мл культуральной жидкости незараженной культуры клеток, обработанной эфиром. При полном удалении эфира изменений в культуре клеток не наблюдается.

2. Определение чувствительности вирусов к хлороформу. В центрифужную пробирку к 9,5 мл вирусосодержащей культуральной жидкости добавляют 0,5 мл хлороформа. Параллельно ставят такие же контрольные пробы, как и при определении чувствительности вируса к эфиру.

Все три пробирки встряхивают в течение 10 мин. Для отделения хлороформа смесь центрифугируют при 60 g в течение 15 мин, в результате чего происходит разделение на две фазы — верхнюю, водную, и нижнюю, содержащую хлороформ. Если вирус не инaktivировался, он находится в верхней фазе. Определяют титр вируса из верхней фазы и вируса, не обработанного хлороформом.

Если вирус нечувствителен к хлороформу, то титр обработанного вируса не отличается от титра контрольного (необработанного).

Параллельно в 4 пробирочные культуры вносят по 0,2 мл водной фазы центрифугата культуральной жидкости незараженной культуры, обработанной хлороформом. При полном отделении хлороформа центрифугированием изменений в культуре клеток не наблюдается.

3. Определение чувствительности вируса к рН 3,0. К 1 мл вирусосодержащей культуральной жидкости добавляют 5 мл фосфатцитратного буфера с рН 3,0 (приложение 14). После тщательного перемешивания выдерживают при комнатной температуре в течение 30, 60, 120 мин. К 1 мл полученной смеси добавляют 5 мл трис-НСI буфера с рН 8,0 для нейтрализации кислоты.

С контрольным вирусом проделывают те же манипуляции, только вместо первого буфера (рН 3,0) добавляют питательную среду. Определяют титр вируса, обработанного кислотой, и контрольного. По снижению титра обработанного вируса по сравнению с контрольным судят о действии на него кислоты.

4. Определение чувствительности вируса к нагреванию. Определяют устойчивость вируса при различных режимах нагревания, начиная от комнатной температуры и выше (30, 45, 56, 60°C и др.), в течение 15, 30, 60 мин и более. Для этого вирусосодержащую суспензию с известным титром разливают в несколько флаконов. Помещают в водяную баню с заданной температурой. Через указанные интервалы времени забирают по одному флакону и определяют титр вируса. По снижению титра вируса определяют влияние нагревания на вирус.

#### Контрольные вопросы [4, 28, 38]

1. Для чего определяют физико-химические свойства вируса?
2. Какова схема обработки вируса эфиром и какие контроли при этом необходимы?
3. Как влияет эфир на вирусы?
4. Как влияет хлороформ на вирусы?
5. Какова схема обработки вируса хлороформом и какие контроли при этом необходимы?
6. Каковы компоненты, необходимые для определения чувствительности вируса к кислоте, и требования, предъявляемые к ним?
7. Какова схема постановки опыта по определению чувствительности вируса к кислоте?
8. Какова схема опыта по определению чувствительности вируса к нагреванию?
9. Чем объясняется инактивация вируса при воздействии эфира, хлороформа, рН и температуры?

### З а н я т и е 33. Применение электронной микроскопии для изучения анатомии и морфологии вирусов

**Содержание.** Методы изготовления препаратов вируса для просвечивающей электронной микроскопии и оборудование лаборатории электронной микроскопии.

**Материальное обеспечение.** Рыба с признаками вирусного заболевания или культура клеток, зараженная вирусом, с ЦПД не менее чем на два креста, буфер Миллонига, 4%-ный глутаровый диальдегид на буфере Миллонига, 1%-ный раствор осмиевой кислоты на буфере Миллонига, абсолютный ацетон, 3%-ный раствор уранилацетата на 30°-ном ацетоне, 3%-ный раствор фосфорновольфрамовой кислоты (рН 6,5—6,8), эпон-аралдитовая заливочная смесь, катализатор DMP-30, парафин, обезвоженный дихлорэтан или хлороформ, стакан с дистиллированной водой, формвар, блок с залитым объектом, ножницы, лезвие бритвы, пинцет глазной, пастеровские пипетки, препаровальная игла, линейка, стеклорез, плоскогубцы для разламывания стекла, пинцет с тонко заточенными концами для работы с медными сеточками, столик для вскрытия рыбы, чашки Петри, бюкс на 50 мл, пенициллиновые флаконы с пробками, пробирки центри-

фужные, полиэтиленовые капсулы для заливки образцов, стеклянные заготовки для изготовления ножей, клейкая лента, спиртовка или газовая горелка, медные сеточки для электронной микроскопии, предметное стекло, кусочек чистой марли, мембранные фильтры, фильтровальная бумага, пластиковая панель, сеточки с углеродными пленками-подложками, препараты вирусов рыб, изготовленные по методу ультрамикротомии и негативного контрастирования, настольная лампа, центрифуга настольная, термостат (60°C), ультрамикротом, вакуумная напылительная установка, просвечивающий электронный микроскоп.

**Организация и проведение работы.** Все известные вирусы рыб входят в состав тех или иных таксонов классификации, составленной для вирусов других животных и растений. Одним из важнейших признаков классификации вирусов является строение вириона. По этому признаку почти все известные в настоящее время вирусы делятся на две группы: вирусы с кубическим типом симметрии и вирусы со спиральным типом симметрии капсида. На рис. 59 приведено схематическое изображение строения вирионов этих двух групп вирусов.

Вирион с кубическим типом симметрии имеет форму правильного двадцатигранника-икосаэдра. На рис. 59 показано строение простого вириона. Его нуклеиновая кислота связана непосредственно с капсомерами, слагающими капсид.

Более сложно устроенные вирусы имеют внутри икосаэдрического капсида один или несколько белков, связанных с нуклеино-

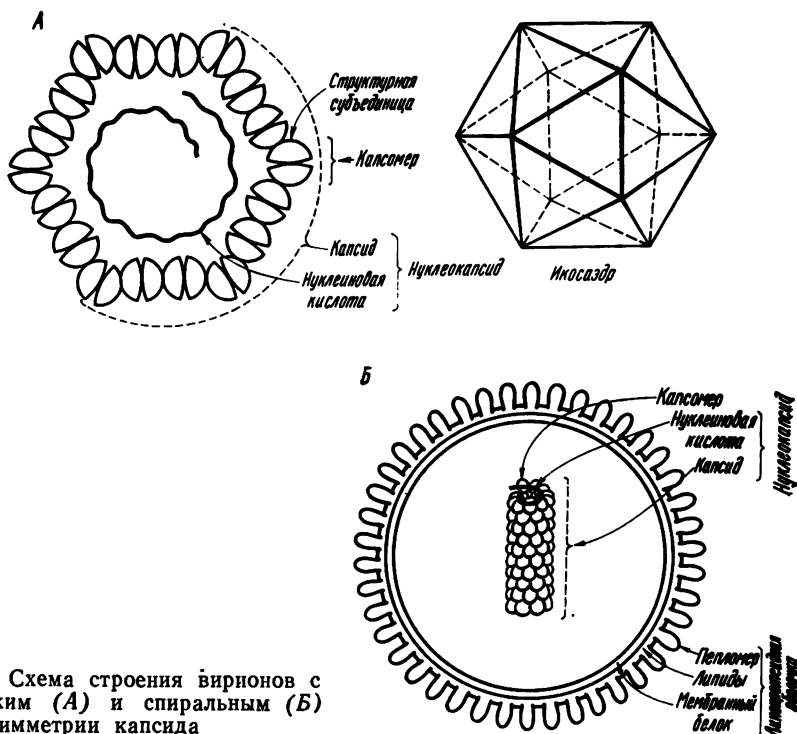


Рис. 59. Схема строения вирионов с кубическим (А) и спиральным (Б) типом симметрии капсида

вой кислотой. Такую структуру внутри капсида называют нуклеоидом. Нить нуклеиновой кислоты вирусов со спиральным типом симметрии находится в непосредственной связи с капсомерами и скручена в спираль. В таком виде нуклеокапсид вириона представляет собой длинную тонкую трубку диаметром в несколько нанометров, которая может быть гибкой (как у миксовирусов), в форме стержня (у вируса табачной мозаики) или закручена в виде цилиндра (у рабдовирусов). Внешняя оболочка состоит из вирус-специфического мембранного белка, липидов клеточного происхождения и имеет на своей поверхности морфологические единицы (пепломеры) одного или более типов, состоящих из гликопротеидов. Вирионы обоих типов могут иметь или не иметь внешнюю оболочку.

Важным таксономическим признаком является количество капсомеров, слагающих капсид. Для многих групп вирусов с икосаэдрическим капсидом оно определяется по формуле

$$N = 10x(n - 1)^2 + 2,$$

где  $n$  — количество капсомеров, лежащих на одном ребре капсида;  $x=1$ , если ребро капсида проходит через центры капсомеров;  $x=3$ , если ребро капсида проходит поочередно через центры капсомеров, а также между ними.

Различить вирионы в световом микроскопе невозможно в силу его низкой разрешающей способности. Разрешающей способностью микроскопа называется расстояние между двумя наиболее близко расположенными друг к другу точками объекта, которые при рассмотрении в микроскоп еще можно видеть раздельно. Эта величина прямо пропорциональна длине волны электромагнитного излучения, применяемого в микроскопе, и для светового микроскопа равна примерно  $0,5\lambda$  ( $\lambda$  — длина волны света), или около 250 нм. Только размеры самых крупных вирусов соизмеримы с этой величиной.

Длина волны движущихся электронов гораздо меньше, и это позволяет получать в современных электронных микроскопах разрешение менее 1,5 Å (ангстрем), что более чем в 1000 раз выше, чем у световых микроскопов.

Существующие электронные микроскопы делятся на два основных типа — просвечивающие и сканирующие. В просвечивающих электронных микроскопах изображение создается электронами, прошедшими сквозь размещенный на пути их движения объект исследования. В результате рассеивания части движущихся электронов на структурах объекта, контрастированных атомами тяжелых металлов, на флюоресцентном экране, куда попадают неотклонившиеся электроны, образуется свето-теневое изображение объекта. Указанное выше разрешение в 1,5 Å достигается именно на микроскопах такого типа.

Сканирующую электронную микроскопию применяют для изучения морфологии объекта. Для этого после специальной подготовки объекта на поверхность его напыляют тонкий слой платины или золота. После помещения в колонну микроскопа поверхность

объекта сканирует тонкий электронный луч. Падающие электроны выбивают из металлического покрытия объекта вторичные электроны, которые улавливаются детектором и формируют изображение объекта. Последнее образуется в результате того, что количество образующихся вторичных электронов зависит от угла падения возбуждающих электронов на поверхность объекта. Разрешающая способность современных сканирующих электронных микроскопов в несколько десятков раз ниже, чем просвечивающих, поэтому их можно применять только при работе с крупными вирусами.

Существует два основных метода подготовки препаратов для просвечивающей электронной микроскопии, применяемых в вирусологической практике: изготовление ультратонких срезов зараженной вирусом ткани и негативное контрастирование суспензии вируса.

Метод изготовления ультратонких срезов складывается в основном из тех же этапов, что и метод изготовления гистосрезов для световой микроскопии: фиксация ткани, обезвоживание, заливка в заливочные среды, изготовление срезов, окрашивание (контрастирование) срезов. Однако этот метод имеет свои особенности.

1. Фиксация ткани. Наибольшее признание при электронномикроскопическом изучении ультраструктуры тканей нашел метод двойной фиксации. Кусочек ткани или органа последовательно фиксируют в растворах глутарового диальдегида и четырехоксида осмия. Метод позволяет сочетать положительные качества обоих

фиксаторов. Глутаровый диальдегид  $\text{O}=\text{C}(\text{H})-(\text{CH}_2)_3-\text{C}(\text{H})=\text{O}$  связывает в основном белки и в меньшей мере другие компоненты ткани. Четырехокись осмия  $\text{OsO}_4$  преимущественно взаимодействует с тканевыми липидами. Помимо фиксирующего четырехокись обладает также контрастирующим свойством, так как в фиксированных ею структурах ткани содержатся атомы тяжелого элемента Os.

2. Заливка ткани. Наиболее распространена в настоящее время заливка тканей в эпоксидные смолы — эпон и аралдит. С этой целью используют коммерческие препараты Epon 812 и Araldite M (или аралдит другой марки). Для придания блокам, полученным из этих смол, необходимой твердости и пластичности применяют уплотнители и пластификаторы. Полимеризация смол происходит в присутствии катализаторов.

3. Ультратонкие срезы и их контрастирование. Принципиально важным показателем пригодности среза для электронномикроскопического исследования является его толщина. Максимальная толщина пригодных для исследования срезов составляет 1000 Å. Некоторым исследователям удается получать срезы толщиной 100 Å. Принято считать, что разрешение, которое можно получить на срезе, составляет примерно одну десятую его толщины.

Для того чтобы рассмотреть строение объекта биологического

происхождения под электронным микроскопом, необходимо контрастировать структуры, слагающие его. Контрастирование ультратонких срезов производят, обрабатывая их растворами солей тяжелых металлов. Наиболее часто с этой целью применяют уранил-ацетат и цитрат свинца. Связываясь с различными внутри- и внеклеточными структурами объекта, атомы этих элементов делают их непрозрачными для электронов (электронно-плотными).

4. Негативное контрастирование. Наряду с позитивным контрастированием биологических объектов важное значение имеет метод негативного контрастирования. В настоящее время изучение структуры вирусов, их морфологии немыслимо без применения этого метода. Информацию, получаемую с его помощью, невозможно получить ни одним другим способом. Сущность этого метода заключается в следующем. Вирусную суспензию обрабатывают раствором контрастирующего вещества. Процедуру проводят при таком значении рН, при котором контрастирующее вещество не связывается с органическими компонентами вирионов, а лишь окружает их, создавая электронно-плотный фон, на котором хорошо видны сами вирионы. Располагаясь между различными структурами поверхности вирионов и таким образом контрастируя их, оно позволяет рассмотреть детали тонкого строения вирионов.

В качестве контрастирующих веществ используют различные соли, содержащие атомы тяжелых металлов: фосфорно-вольфрамовокислый натрий, молибденовокислый аммоний, йодистый кадмий и др.

Электронно-микроскопическое исследование содержащего вирус или подозреваемого на присутствие вируса материала имеет, скорее, научный интерес, но ни в коей мере не может являться достаточным для диагностики методом. Роль такого исследования особенно возрастает в случае выделения нового, неизвестного вируса, так как на основании строения вирионов оно дает возможность предположить таксономическую принадлежность вируса, а это облегчит последующую его идентификацию.

Порядок проведения работы следующий.

I. Ознакомление с методикой заливки образцов в эпоксидные смолы. Процедура заливки образцов по данной методике достаточно продолжительна. Работу с фиксирующими, обезвоживающими и заливочными веществами необходимо проводить под вытяжкой. В связи с этим рекомендуется выполнить только первый этап методики — взятие материала, а с остальными этапами просто ознакомить студентов.

II. Взятие материала. Предназначенную для исследования рыбу обездвиживают, ножницами вырезают у нее небольшой кусочек интересующего органа или ткани и, отполоскав его от крови в буфере Миллонига (приложение 15), переносят в чашку Петри с фиксатором (4%-ный глутаровый диальдегид). Здесь лезвием бритвы отрезают от него 2—3 мелких кусочка объемом не более 1 мм<sup>3</sup> каждый. Затем пастеровской пипеткой переносят их в бюк-

су с 4%-ным раствором глутарового диальдегида. Использование кусочков большего объема значительно затрудняет качественную фиксацию и заливку ткани.

При работе с культурой клеток поступают следующим образом. Пробирку с четко выраженным ЦПД вируса (не менее чем на два креста) тщательно встряхивают, добываясь отделения монослоя от стекла. Если это не удается, монослой снимают лезвием бритвы или другим способом. Клеточную взвесь переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют при 60 г в течение 10—15 мин. Надосадочную жидкость сливают, а к осадку приливают 4%-ный раствор глутарового диальдегида. Далее осадок обрабатывают так же, как и обычные кусочки тканей.

III. Фиксация. Образцы фиксируют в глутаровом диальдегиде в течение 4 ч, а затем ополаскивают в трех сменах буфера Миллонига. Здесь и в дальнейшем реактивы приливают и собирают пастеровскими пипетками, которые после употребления выбрасывают. Фиксация в 1%-ной четырехокиси осмия (осмиевой кислоте) в течение 1 ч. После окончания фиксации образцы отмывают в трех сменах буфера Миллонига. При необходимости можно сохранить образцы в буфере Миллонига в течение ночи в холодильнике.

IV. Предварительное контрастирование. Образцы контрастируют в течение 3 ч, добавив к ним 3%-ный раствор уранилацетата на 30°-ном ацетоне.

V. Обезвоживание. Образцы последовательно помещают в ацетон возрастающей концентрации по схеме:

Ацетон	
30°-ный	10 мин
50°-ный	10 мин
70°-ный	10 мин
96°-ный	10 мин
100°-ный*	3-10 мин

VI. Пропитывание. Пропитывают обезвоженные образцы заливочной смесью из эпона и аралдита, постепенно заменяя содержащийся в образцах ацетон на заливочную смесь. Для этого с помощью пастеровской пипетки образец переносят из сосуда с одной смесью в сосуд с другой смесью по схеме:

Эпон-аралдитовая смесь — ацетон 1:2	1 ч
Эпон-аралдитовая смесь — ацетон 2:1	1 ч
Эпон-аралдитовая смесь	2—4 ч
Новая порция эпон-аралдитовой смеси	На ночь
Новая порция заливочной смеси с катализатором	2 ч

Как обезвоживание образцов, так и их пропитывание проходит гораздо надежнее, если содержимое сосудов с образцами будет постоянно перемешиваться. С этой целью можно использовать, например, аппарат для культивирования тканей во вращающихся пробирках.

\* Абсолютный ацетон получают, сохраняя ацетон в присутствии прокаленного (обезвоженного)  $\text{CaCl}_2$ .

VII. Заливка. Образцы переносят в полиэтиленовые капсулы (по одному кусочку в каждую капсулу) и затем заполняют капсулы свежей порцией заливочной смеси с катализатором. С помощью тонкой иглы размещают образцы точно по центру дна капсул и закрывают их крышечками.

Затверждение (полимеризация) смолы достигается инкубацией капсул при 60°C в течение 48 ч.

VIII. Изготовление стеклянных ножей. Резание залитого блока производится с помощью стеклянных ножей. Помимо них возможно также применение алмазных ножей, гораздо более твердых и долговечных, однако стеклянные ножи в силу ряда положительных качеств (доступность материала для изготовления ножей, достаточно высокое качество получаемых ножей, дешевизна стекла и др.) получили сейчас очень широкое распространение. Выход высококачественных ножей значительно возрастает при использовании специальных приборов для изготовления ножей. В случае их отсутствия ножи можно изготовить вручную, хотя это менее надежный и более трудоемкий способ. Ножи готовят из предназначенных специально для этой цели стеклянных полос шириной 25 мм и толщиной 5—9 мм. При отсутствии таких заготовок подбирают подходящее стекло такой же толщины. Качество ножа определяется качеством самого стекла.

Процедура изготовления ножей сводится к следующему. Стеклянную полосу или выбранную пластину стекла с помощью стеклореза или алмаза разрезают на квадраты со стороной 25 мм. При этом надрезы делают на одной стороне заготовки. В результате с одной стороны такого квадрата все четыре ребра имеют след в виде зазубрин («оперение»), оставшийся после прохождения стеклореза, а ребра с противоположной стороны образованы в результате свободного разлома и не имеют «оперения». Последний надрез делают именно с этой стороны и почти по диагонали квадрата. После раскалывания по этому надрезу и получают собственно стеклянный нож (рис. 60). Изготавливают ножи с разными углами — от 35 до 60°.

Раскалывают заготовки, пользуясь парой специально предназначенных для этого плоскогубцев. Заготовку захватывают плоскогубцами по обе стороны от надреза и, потянув в разные стороны, «разрывают» ее по надрезу. Выпускаются плоскогубцы и с иным принципом действия.

Качество острия ножа определяют, исследуя его в отраженном свете с помощью бинокулярной стереоскопической насадки к ультрамикротому. Манипулируя источником освещения, добиваются такого его положения, при котором острие ножа выглядит в виде тонкой ярко освещенной линии на общем темном фоне (используют объектив не менее  $\times 7$ ). Пригодный к эксплуатации нож имеет тонкое прямое острие, большая часть которого, начиная с левого края, без зазубрин и шероховатостей. С правого края острие ножа, как правило, заканчивается шипом, образующимся при разломе, и всегда имеет зазубрины.

На подобранном таким образом ноже укрепляют ванночку для срезов, как показано на рис. 60. Ванночку изготавливают из клейкой ленты или алюминиевой фольги и снизу укрепляют расплавленным парафином или воском.

IX. Нанесение формваровых пленок-подложек на сеточки. Срезы, которые изготавливают на ультрамикротоме, собирают на сеточки с нанесенной на них пленкой-подложкой. Сеточки представляют собой тонкие перфорированные медные диски диаметром около 3 мм. Диаметр каждой ячейки сеточки не превышает 0,1 мм. Роль пленки-подложки заключается в удерживании на себе срезов.

Для приготовления пленок заранее готовят обезвоженный дихлорэтан, если его нет, то хлороформ. Их обезвоживания добиваются хранением в присутствии прокаленного  $\text{CaCl}_2$ . Готовят раствор в высокой бюксе с широким горлом. Достаточно приготовить 20—30 мл раствора, причем бюксу подбирают таким образом, чтобы данное количество раствора занимало не более  $\frac{1}{3}$  ее высоты.

Формвар (поливинилформальдегид) добавляют в дихлорэтан до концентрации 0,15—0,20%.

После постепенного его растворения раствор перемешивают. Пленку получают осаждением формвара на предметном стекле, для чего стекло достаточно тщательно протереть кусочком чистой марли (с очень чистых стекол пленку часто снять невозможно). Обработанное таким образом стекло опускают на несколько секунд в сосуд с раствором формвара, после чего медленно, чтобы раствор успевал стекать, вынимают его и подсушивают, не извлекая из сосуда, в парах растворителя. В случае быстрого извлечения стекла из сосуда с раствором происходит его охлаждение в результате быстрого испарения дихлорэтана, которое при-

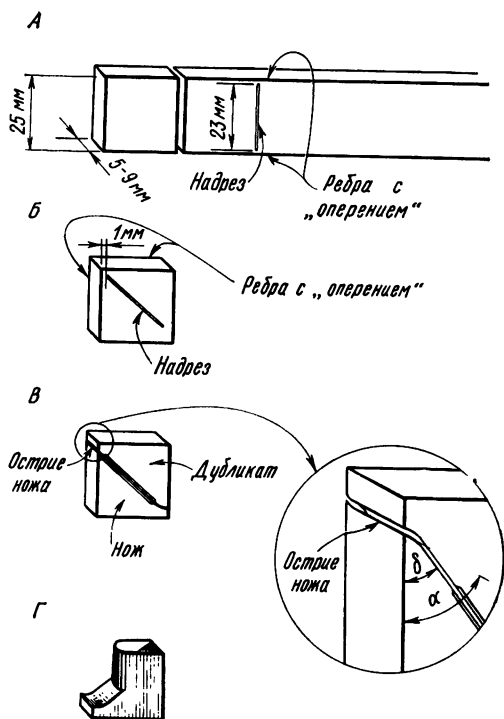


Рис. 60. Порядок изготовления стеклянного ножа:

А — стеклянная полоса; Б — квадратная заготовка; В — стеклянный нож; Г — нож с укрепленной на нем ванночкой для сбора срезов;  $\alpha$  — истинный угол ножа;  $\delta$  — угол ножа

водит к конденсации на стекле влаги и образованию вследствие этого дыр в пленке.

Пленку, образовавшуюся на одной из поверхностей стекла, подрезают, обводя лезвием бритвы с нижней и обеих боковых сторон. Стекло с подрезанной пленкой на верхней его стороне под углом примерно  $45^\circ$  медленно погружают в стакан с дистиллированной водой. В результате этого пленка отделяется от стекла и постепенно сползает на поверхность воды

(рис. 61). Пленка высокого качества имеет равномерную серосеребристую окраску при рассматривании ее на воде в отраженном свете. Пленки радужной окраски слишком толсты.

На плавающую на поверхности воды пленку накладывают сеточки матовой стороной вниз, слегка придавливая их пинцетом к пленке. После того как положат необходимое число сеточек сверху, пленку с сеточками накрывают круглым мембранным фильтром, к которому пленка тут же прилипает. Пинцетом фильтр снимают с поверхности воды и, перевернув сеточками вверх, помещают в чашку Петри с кружком фильтровальной бумаги, где сеточки с укрепленной на них пленкой подсушают.

Ультрамикротом (знакомство с его устройством и эксплуатацией). Изготовление ультратонких срезов с залитых блоков тканей производят с помощью ультрамикротомата.

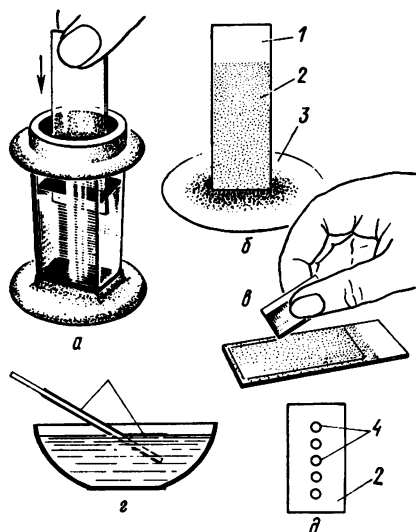


Рис. 61. Приготовление пленки на стеклянной пластинке (из Уикли, 1975):

*a* — погружение стекла в раствор формвара; *б* — сушка в вертикальном положении; *в* — нанесение разрезов параллельно краям стекла; *г* — снятие пленки на поверхность воды; *д* — размещение сеток на плавающей пленке; 1 — предметное стекло; 2 — формваровая пленка; 3 — фильтровальная бумага; 4 — сетки

Ультрамикротомом является прибором, позволяющим получать серийные ультратонкие срезы (т. е. ленточку следующих друг за другом ультратонких срезов) (рис. 62). Он состоит из двух основных рабочих элементов: подвижного коромысла, на конце которого крепится держатель образца, и держателя ножа, в котором фиксируется приготовленный к работе нож (рис. 63).

Принцип работы ультрамикротомата заключается в следующем. После закрепления в держателе образца заточенного блока с залитым в нем объектом исследования, настройки и запуска прибора вершина пирамидки блока начинает совершать движения по эллиптической траектории, вытянутой в вертикальном направлении. Каждый раз при движении пирамидки вниз вершина ее опус-

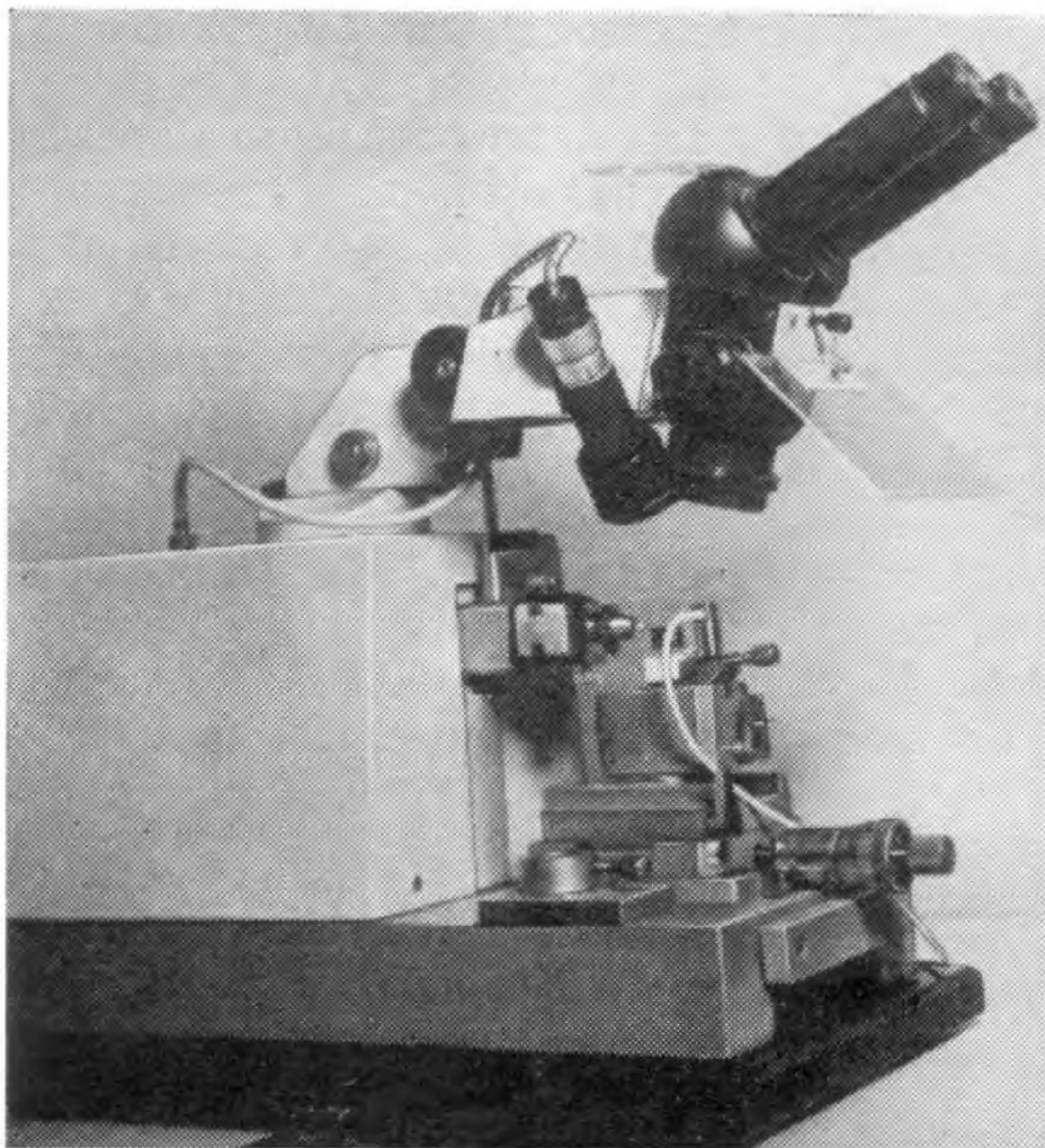


Рис. 62. Ультрамикроном УМП-3М

кается на острие ножа, которое производит срез. При движении ее вверх она несколько удаляется от ножа. Получающиеся срезы сползают в виде ленточки на поверхность жидкости, налитой в ванночку ножа.

Принципиально важным моментом в работе ультрамикронома является подача образца вперед (на нож) для производства очередного среза. Величина этой подачи фактически почти равна толщине изготавливаемых срезов, т. е. составляет несколько сотен ангстрем. Такой подачи невозможно добиться механическим перемещением образца. В выпускаемых в настоящее время моделях она осуществляется двумя различными способами. При термической подаче (в ультрамикрономах австрийской фирмы «Reichert» и шведской ЛКВ) образец подается вперед вследствие линейного расширения материала коромысла при его электрическом разогреве. В отечественных микрономах использован эффект пьезострикции керамики, т. е. линейного удлинения ке-

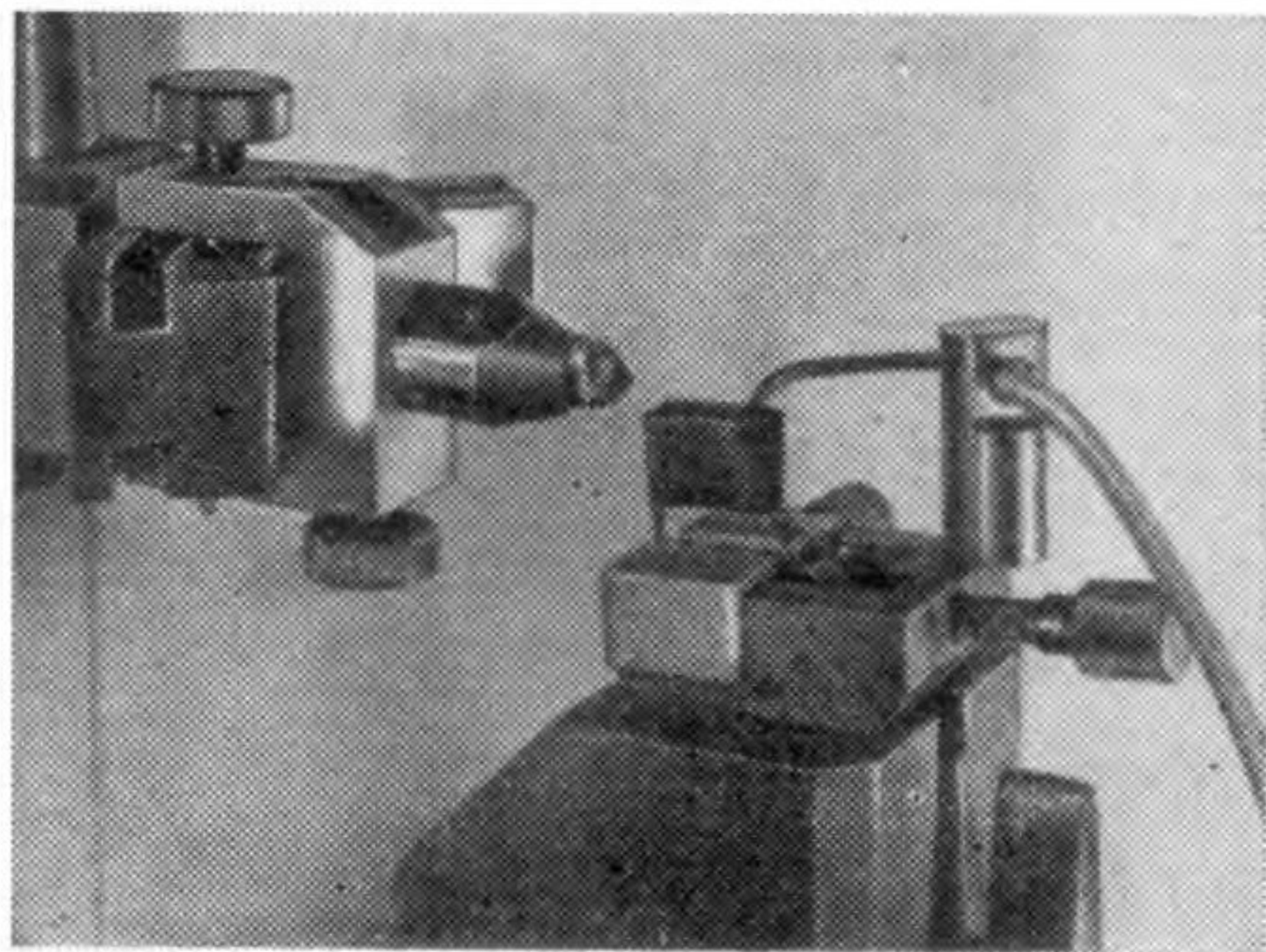


Рис. 63. Рабочая часть ультрамикронома.

рамки пропорционально приложенному к ней электрическому напряжению.

Прежде чем приступить к изготовлению срезов, необходимо, освободив блок от капсулы, заточить верхушку его с залитым объектом в виде усеченной пирамиды. При этом лицевую сторону пирамидки затачивают в виде трапеции с площадью не более 0,1 мм<sup>2</sup>. Столь маленькая площадь позволяет избежать некоторых артефактов, которые могут возникнуть при резке.

Толщину срезов определяют по их цвету, рассматривая срезы, плавающие на поверхности воды в ванночке ножа, через бинокулярную насадку к ультрамикротому. Это наиболее простой и распространенный способ. Серебристо-серые срезы имеют толщину 500—600 Å, серебристые — 600—900 Å, золотистые — 900—1200 Å, темно-золотистые, пурпурные, синие или зеленые срезы слишком толсты.

Качество получаемых срезов определяют с помощью четырех основных параметров: качество ножа, угол ножа, угол наклона ножа, скорость резания. Варьируя эти параметры, подбирают оптимальное соотношение, позволяющее изготовить хорошие срезы с исследуемого блока.

Плавающие в ванночке ножа срезы собирают на сеточку. Для этого, осторожно взяв сеточку пинцетом, прикладывают ее к срезам той стороной, которая покрыта пленкой-подложкой. Этого достаточно для прилипания срезов к пленке, после чего сеточку помещают в чашку Петри на кружок фильтровальной бумаги для подсыхания.

Изготовленные срезы контрастируют насыщенным водным раствором уранилцетата. Для этого сеточки помещают срезами вниз на поверхность нагретого до 60°C раствора на 15—20 мин. После ополаскивания в дистиллированной воде и подсушивания сеточки готовы к просмотру в электронном микроскопе.

Вакуумная напылительная установка. В некоторых электронно-микроскопических методиках применяется напыление на препарат тонких пленок тяжелых металлов и углерода. Напыляют углерод и на пленки-подложки. Тонкий слой углерода придает пленке большую прочность и увеличивает ее гидрофильность. Сеточки с такими пленками применяют, в частности, при изучении строения вирионов методом негативного контрастирования.

Для проведения работ по напылению используют вакуумную напылительную установку (рис. 64). Такая установка состоит из трех основных элементов: вакуумной системы, напылительного поста со стеклянным колпаком и питающей электрической цепи.

В качестве источника углерода применяют специальные графитовые стержни. Два таких стержня фиксируют под колпаком в токопроводящих держателях, причем заточенный в виде конуса конец одного из них прижимают пружиной к торцу второго. Под стержнями (не ближе 10—12 см от них) размещают предметное стекло с сеточками, покрытыми пленками из формвара. После это-

го напылительный пост закрывают колпаком и откачивают изпод него воздух. При достижении необходимого вакуума ( $10^{-5}$ — $10^{-6}$  мм рт. ст.) через графитовые стержни пропускают электрический ток, постепенно увеличивая его до 35—50 А. В результате сильного разогрева места контакта двух стержней начинается испарение углерода. Образующиеся атомы углерода с большой скоростью разлетаются в радиальных направлениях.

Толщину пленки определяют по цвету. Достаточно тонкие пленки (толщиной 100—150 Å) имеют слабо-коричневую окраску. Для получения таких пленок необходимо проводить напыление углеродом в течение 5—10 с.

Х. Изготовление препаратов вируса по методу негативного контрастирования. Свежеприготовленный раствор 3%-ной фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК) нейтрализуют, прибавляя

по каплям концентрированный раствор NaOH и доводя pH до 6,5—6,8. Приготовленный раствор наливают в одну из ячеек пластиковой панели. В соседнюю, крайнюю, ячейку панели наливают вируссодержащую культуральную жидкость. На поверхность налитой жидкости пинцетом накладывают 2—3 сеточки углеродными пленками вниз. Заполненные ячейки накрывают стеклянным колпаком и размещают панель сбоку от лампы накаливания средней мощности (60—100 Вт) так, чтобы ячейка с сеточками находилась со стороны лампы на расстоянии 10—20 см от нее. Включают лампу и в таком положении выдерживают панель в течение нескольких минут. При включении лампы начинается перемешивание вируссодержащей жидкости в результате конвекции, вирионы, находящиеся в жидкости, достигают пленки-подложки и прилипают к ней.

По окончании экспозиции сеточки снимают с поверхности жидкости и удаляют с них основную часть жидкости, касаясь краем сеточки кусочка фильтровальной бумаги. После этого их помещают пленкой вниз на поверхность раствора ФВК на 15—20 с. По окончании этого времени сеточки снимают с поверхности раствора, удаляют с них основную часть раствора фильтровальной бумагой и помещают на кружок фильтровальной бумаги в чашку Петри. После подсыхания препарат готов к просмотру в электронном микроскопе.

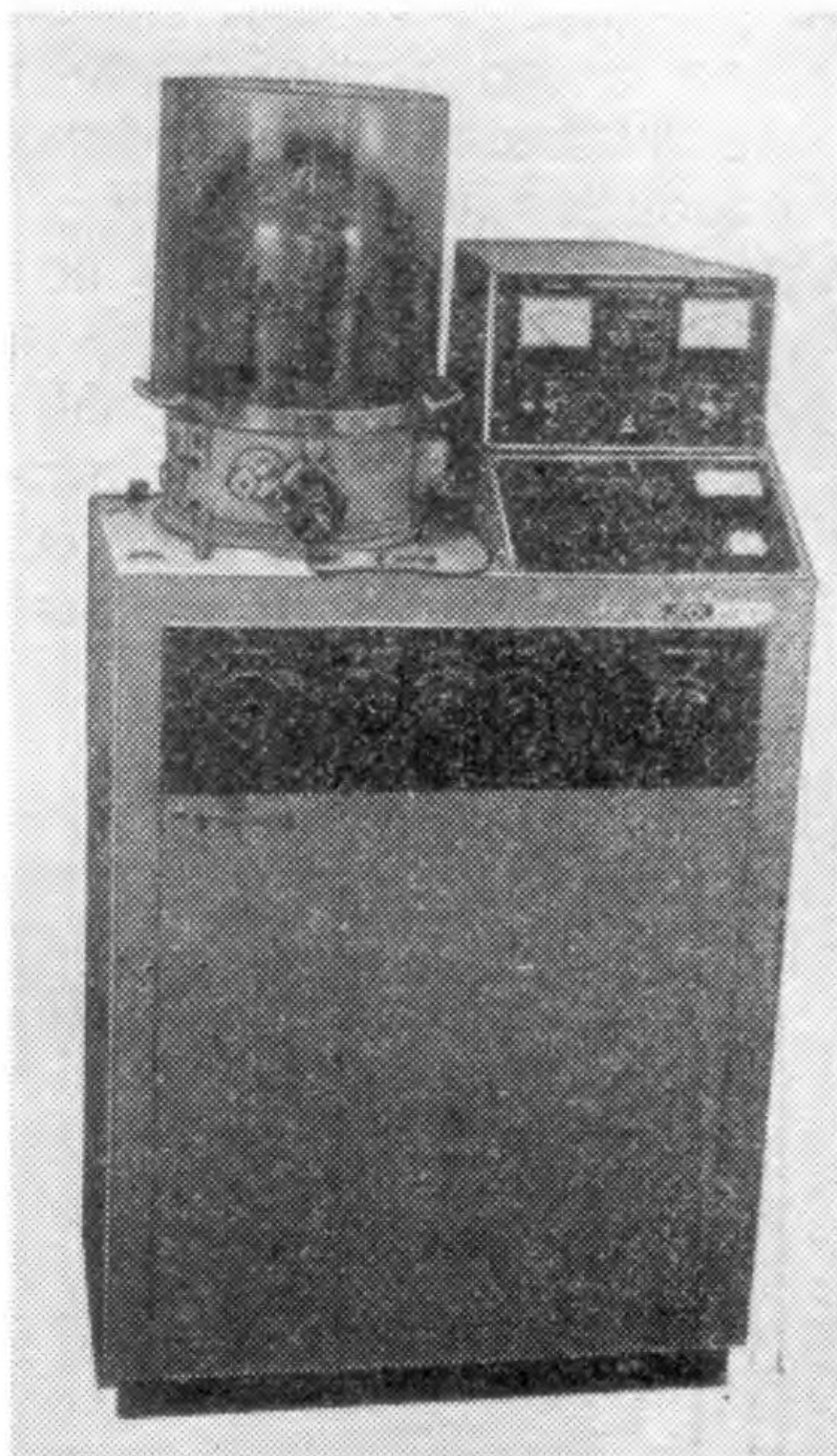


Рис. 64. Вакуумная напылительная установка

**Просвечивающий электронный микроскоп** (знакомство с его устройством и эксплуатацией). Принцип строения просвечивающего электронного микроскопа несложен. Основная его рабочая часть, колонна, представляет собой толстостенный металлический цилиндр, из которого откачивается воздух и в котором последовательно расположены вольфрамовая нить (катод), металлическая пластина с отверстием посередине (анод), несколько магнитных линз, люминесцентный экран и фотокамера (рис. 65).

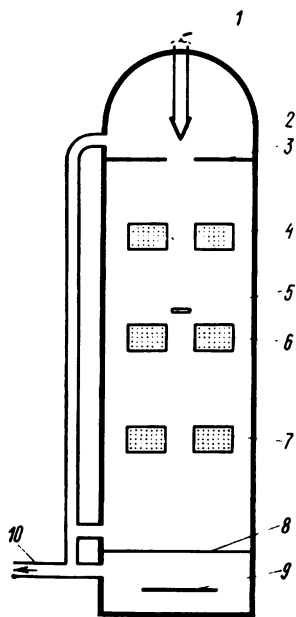


Рис. 65. Схема устройства колонны просвечивающего электронного микроскопа:

1 — к высоковольтному источнику питания катода; 2 — катод; 3 — анод; 4 — конденсорная линза; 5 — сеточка с объектом исследования; 6 — объективная линза; 7 — проекционная линза; 8 — люминесцентный экран; 9 — фотопластинка; 10 — к вакуумному насосу

В результате сильного разогрева катода при прохождении через него электрического тока возникает эмиссия («испарение») электронов с его поверхности. Высокая разность потенциалов (до 100 кВ и более) между катодом и анодом заставляет образующиеся свободные электроны с большой скоростью двигаться к аноду. Часть электронов при этом пролетает сквозь отверстие анода в середине и образует электронный луч, проходящий сквозь всю колонну микроскопа. Магнитные линзы служат для управления электронным лучом. Такая линза представляет собой катушку из нескольких тысяч витков провода. При пропускании через катушку тока в ее центральном канале, сквозь который проходит электронный луч, создается сильное магнитное поле. На электроны луча, движущиеся в этом магнитном поле, действует сила (сила Лоренца), заставляющая их отклоняться от первоначального направления движения. Изменяя величину тока в магнитной линзе, можно изменять напряженность ее магнитного поля и тем самым концентрировать или разводить электронный луч, добываясь при этом нужного увеличения изучаемого объекта.

Назначение магнитных линз в электронном микроскопе аналогично назначению оптических линз в световом. Конденсорная линза фокусирует электронный луч на размещаемом ниже нее объекте исследования. Объективная линза формирует увеличенное промежуточное изображение объекта и проекционная линза окончательно увеличивает полученное изображение, проецируя его на люминесцентный экран. В современных электронных микроскопах обычно имеется несколько конденсорных и проекционных линз.

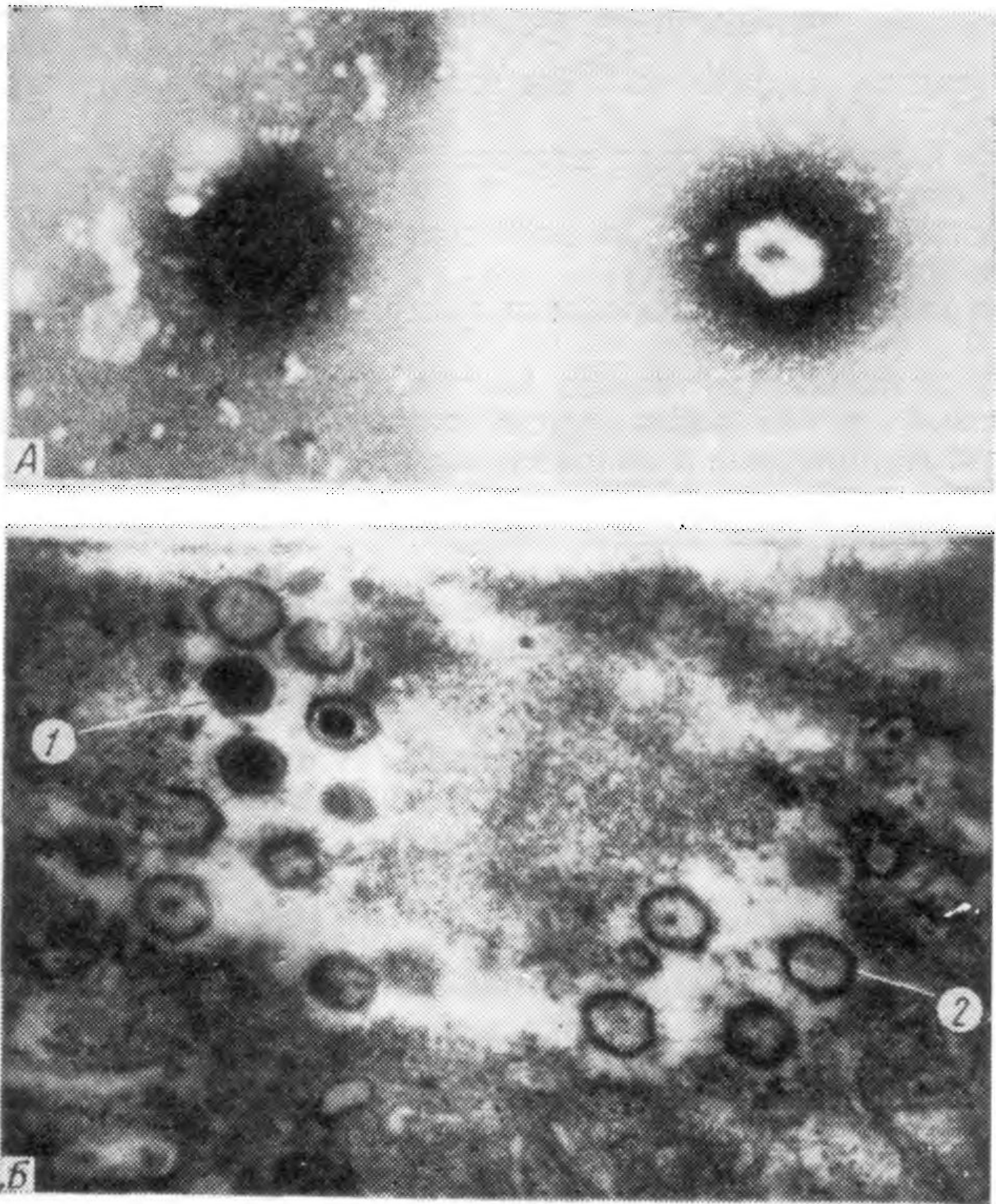


Рис. 66. Препараты вируса, приготовленные различными методами:

*А* — негативное контрастирование; *Б* — ультратонкий срез:  
 1 — содержащий нуклеиновую кислоту зрелый вирион; 2 — пустой капсид

Объект исследования (сеточку с препаратом) помещают в специальный держатель образца. Несколькими такими держателями заряжают магазин, сообщающийся с колонной микроскопа. После откачки воздуха из магазина держатель с объектом перемещают в колонну и устанавливают на пути движения электронного луча.

Под люминесцентным экраном находится магазин с фотопластинками, на которые производят съемку.

На фотографиях препаратов вируса, приготовленных различными методами, вирионы выглядят по-разному. На рис. 66, *А* показаны негативно контрастированные вирионы. Контрастирующее вещество при этом проникает внутрь не содержащих нуклеоида пустых капсидов. На ультратонких срезах (рис 66, *Б*) пустые капсиды, наоборот, выглядят прозрачными, а содержащие нуклеиновую кислоту зрелые вирионы имеют темную сердцевину вследствие интенсивного связывания контрастирующего вещества с нуклеиновыми кислотами.

1. Какие группы вирусов рыб Вы знаете и как устроены вирионы каждой группы?
2. Почему изучение строения вирусов возможно только при помощи электронного микроскопа?
3. Каковы типы существующих электронных микроскопов и принцип формирования в них изображений?
4. Какова схема взятия, обработки материала и заливки его в эпоксидные смолы?
5. Какова методика негативного контрастирования препаратов вируса?
6. Чем схожи и чем различаются позитивное контрастирование срезов и негативное контрастирование препаратов вируса?
7. Как будет выглядеть объект, если его не контрастировать?
8. Каков порядок изготовления стеклянных ножей? Как оценивается качество ножа?
9. Какова методика нанесения формваровых пленок-подложек на сеточки?
10. Каковы устройство и эксплуатация ультрамикротомы?
11. Каковы устройство и эксплуатация вакуумной напылительной установки?
12. Каков принцип устройства просвечивающего электронного микроскопа?
13. Для чего необходимо создавать вакуум в колонне электронного микроскопа?

### Занятие 34. Биологическая проба (биопроба)

**Содержание.** Воспроизведение весенней виремии (краснухи) карпа в экспериментальных условиях.

**Материальное обеспечение.** Вирусосодержащая культуральная жидкость, культуральная жидкость незараженной культуры клеток, рыба, чувствительная к данному вирусу, аквариумы или другие емкости для содержания рыбы, стерильные шприцы с иглами.

**Организация и проведение работы.** Постановка биопробы является необходимым условием для доказательства этиологической роли выделенного вируса в данном заболевании. Для успешной постановки биопробы необходимо соблюдение ряда условий.

Во-первых, используемая в биопробе рыба должна быть завезена из заведомо благополучного по инфекционным заболеваниям хозяйства, при этом отбирают рыб наиболее восприимчивого к данному заболеванию вида и возраста.

Во-вторых, вирусосодержащий материал должен отвечать следующим требованиям. В качестве него можно использовать культуральную вирусосодержащую жидкость или патологический материал, освобожденный от бактериальной микрофлоры (см. занятие 27). Способ заражения и количество вирусосодержащего материала подбирают индивидуально для каждого заболевания. Вирусосодержащий материал должен быть свежеприготовленным. При длительном пассировании вируса на культуре клеток может снизиться его патогенность для рыбы, что скажется на результате биопробы.

В-третьих, существенное значение имеет создание условий среды обитания рыбы, способствующих возникновению заболевания. Это относится в первую очередь к температуре воды, которая должна совпадать с оптимальной температурой, благоприятствующей возникновению заболевания в естественных условиях.

Наиболее часто используют следующие способы заражения рыбы: 1) контактный, при котором к больной или подозреваемой в каком-либо заболевании рыбе подсаживают здоровую (весенняя виремия карпа — SVC, вирусная геморрагическая септицемия лососевых — VHS, инфекционный некроз поджелудочной железы — IPN, инфекционный некроз гематопозитической ткани лососевых — IHN); 2) внутрибрюшинное введение (SVC, VHS, IHN и др.); 3) внутримышечное введение (SVC и др.); 4) заражение в головной мозг (SVC и др.); 5) введение в плавательный пузырь (SVC и др.); 6) орошение жабр (некроз жабр, вирусное заболевание американского пятнистого сомика — CCVD); 7) выдерживание рыбы в воде, содержащей вирус (SVC, VHS, IPN и др.).

Контролями при постановке биопробы служат: 1) незараженная рыба; 2) рыба, подвергшаяся обработке тем же способом, что и опытная, только вместо патологического материала используют либо культуральную жидкость незараженной культуры клеток, либо суспензию органов и тканей, полученную от здоровой рыбы и обработанную так же, как и патологический материал.

Для опыта и для каждого контроля берут не менее чем по 10 рыб. Наблюдения за рыбой ведут ежедневно.

Инкубационный период (время с момента заражения до появления первых признаков заболевания) зависит от вида и возраста рыбы, условий ее содержания, путей введения патологического материала и т. д., т. е. от условий постановки биопробы.

Биопроба считается положительной при появлении характерных для данного заболевания клинических признаков, а также патологоанатомических изменений у подопытной группы рыб и при отсутствии их у контрольной. Вместе с этим от подопытной группы рыб должен быть реизолирован вирус (взятие, обработка патологического материала и выделение вируса см. в занятиях 27, 28).

В настоящей работе будет рассмотрена биопроба на примере весенней вiremии (краснухи) карпа.

Порядок проведения работы следующий.

Для постановки биопробы отбирают сеголетков или годовиков карпа из благополучного по инфекционным заболеваниям хозяйства.

Заражение производят одним из приведенных ниже способов.

1. Заражение патологическим материалом. Патологический материал, взятый от больных острой формой весенней вiremии карпов, освобожденный от бактериальной микрофлоры, вводят внутрибрюшинно здоровой рыбе в дозе 0,5—1 мл в зависимости от ее массы.

2. Заражение вирусосодержащей культуральной жидкостью. Вирусосодержащую жидкость вводят внутрибрюшинно здоровой рыбе в дозе 0,5—1 мл.

3. Контактное заражение. К 10 карпам с признаками острой формы весенней вiremии подсаживают такое же количество здоровых рыб.

Параллельно на таком же количестве рыб ставят указанные выше контрольные пробы: незараженная рыба; рыба, которой внутривентриально вводят либо культуральную жидкость незараженной культуры клеток, либо суспензию органов и тканей, полученную от здоровой рыбы и обработанную так же, как и патологический материал, в дозе 0,5—1 мл.

Рыбу содержат при температуре 16—17°C, при этом инкубационный период длится 4—11 дней.

Если титр вируса во взятом для заражения рыбы материале неизвестен, то одновременно с заражением рыбы заражают культуру клеток для его определения (см. занятие 29).

За подопытной и контрольной рыбой ведут наблюдения, регулярно проводят осмотр рыбы, отмечают появляющиеся изменения.

При появлении характерных для данного заболевания клинических признаков у подопытной группы рыб берут патологический материал для выделения вируса (см. занятие 27). У контрольных рыб также берут патологический материал и пассируют на культуре клеток, чтобы доказать отсутствие у них вирусоносительства.

Биопроба считается положительной, если у зараженных рыб проявился комплекс клинических признаков болезни и патологоанатомических изменений при отсутствии их у контрольной группы рыб, а также при выделении от заболевших рыб вируса.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 54]

1. Что такое биопроба и для чего она проводится?
2. Какие требования предъявляются к рыбе, используемой для биопробы?
3. Каковы требования, предъявляемые к условиям содержания рыбы при постановке биопробы?
4. Что используют в качестве патологического материала для заражения рыбы?
5. Что такое инкубационный период и от чего он зависит?
6. Каковы пути введения патологического материала и для воспроизведения каких заболеваний они применяются?
7. На чем основан выбор путей введения патологического материала при каждом конкретном заболевании?
8. Какие контроли ставят в биопробе и для чего?
9. В каком случае биопроба считается положительной?

#### МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МИКОЗОВ РЫБ

Среди микроскопических грибов имеется немало видов, являющихся паразитами рыб, икры и водных беспозвоночных животных. Заболевания, вызываемые грибами, называются микозами. К наиболее изученным микозам рыб относятся сапролегниоз, бронхиомикоз, ихтиофноз. Возбудителями сапролегниоза могут быть грибы из родов *Achlya*, *Aphanomyces*, *Dictyuchus*, *Isoachlya*, *Saprolegnia* и некоторые другие. Гриб *Branchiomyces sanguinis* выделяют от пораженных бронхиомикозом карпов, а у линей и щук отмечают другой вид *B. demigrans*. Многие виды рыб поражает гриб *Ichthyosporidium (Ichthyophonus) hoferi*. По родовому названию гриба названа и болезнь, вызываемая им, — ихтиоспоридиоз (ихтиофо-

ноз). В настоящее время описаны новые виды грибов, патогенных для рыб: *Candida sake*, *Cryptococcus* sp., *Exophiala salmonis*, *E. pisciphila*, *Fusarium culmorum*, *Ochroconis tshawytschae*, *Phoma herbarum* и др. Заболевания, вызываемые ими, наносят значительный ущерб рыбоводным хозяйствам. Увеличение количества регистраций микозов рыб связано с загрязнением внешней среды, благоприятствующим развитию грибов, а также улучшением методов диагностики этих болезней. При установлении причин гибели рыб необходимо исключить или подтвердить грибковую природу заболевания, что позволит избежать ошибок при выборе мер борьбы.

### Занятие 35. Основные понятия в микологии

**Содержание.** Ознакомление с морфологией, способами размножения и основами систематики патогенных для рыб грибов.

**Материальное обеспечение.** Микроскопы, предметные и покровные стекла, флаконы с 1%-ным раствором метиленового синего, пипетки, препаровальные иглы, микологические крючки, лезвия безопасной бритвы, спиртовки, банки с притертой крышкой с 5%-ным раствором карболовой кислоты для обеззараживания использованных стекол, культуры сапролегниевых грибов, обыкновенных дрожжей, *Rhizopus nigricans*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phoma herbarum*, *Penicillium* sp.

**Организация и проведение работы.** Строение грибов, их свойства, распространение, роль и значение в хозяйственной деятельности человека изучает микология. Современная микология объединяет несколько взаимосвязанных отраслей: общую, медицинскую, ветеринарную микологию, фитопатологию и др.

Ранее грибы относили к бесхлорофилльным растениям. Большинство современных ученых склонны считать их самостоятельной группой организмов.

1. Мицелий и его видоизменения. Тело грибов (таллом) может быть одноклеточным, но большая их часть имеет многоклеточную структуру, состоящую из разветвленных нитей, называемых гифами. Совокупность гиф, составляющая тело одного гриба, называется мицелием, или грибницей. Грифы низших грибов обычно лишены поперечных перегородок, и образованный ими мицелий называется несептированным (рис. 67, б). У всех высших, а также некоторых низших грибов гифы имеют перегородки и делятся ими на фрагменты. Такой мицелий носит название септированного (рис. 68, а). Мицелий может быть погруженным в субстрат и воздушным. Окраска его различна и обычно белые молодые гифы с возрастом темнеют, приобретая ту или иную окраску. При ветвлении гифы могут срастаться друг с другом, образуя анастомозы (рис. 68, б). Для поглощения питательных веществ, а также прикрепления к субстрату грибы имеют различные приспособления. Из них наиболее часто встречаются мицелиальные тяжи, которые образуются из нескольких более или менее однородных, параллельно расположенных, сплетенных и соединенных анастомозами гиф (рис. 69).

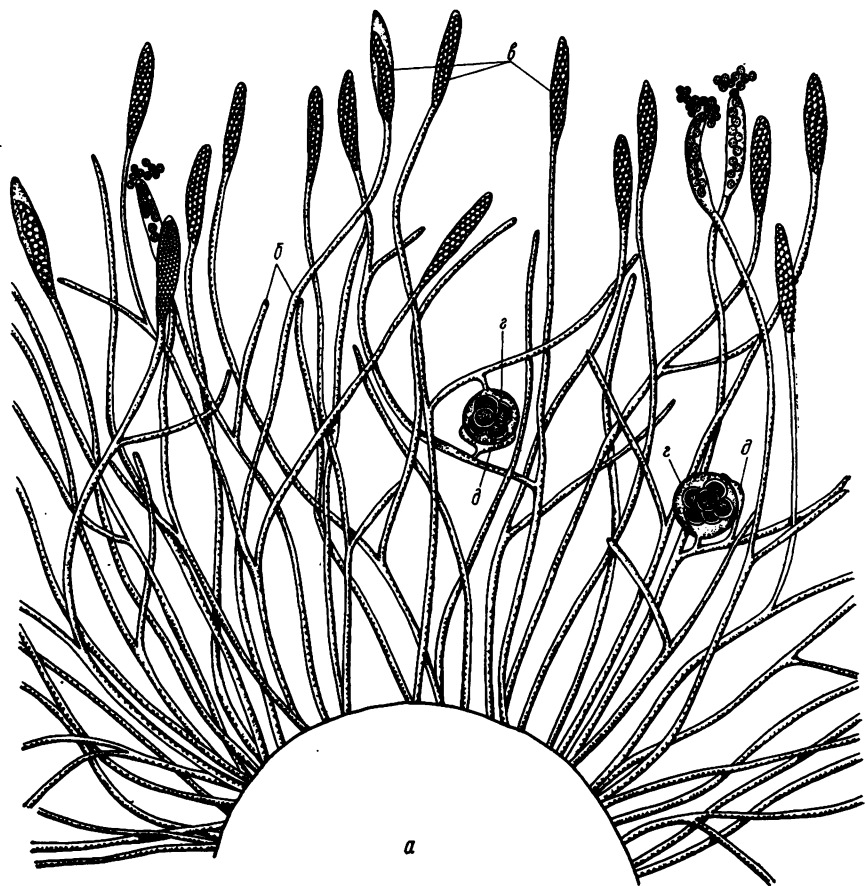


Рис. 67. Икринка, пораженная сапролегниевым грибом:

а — икринка; б — несептированные гифы; в — зооспорангий; г — оогоний; д — антеридий

Мукоровые грибы имеют ризоиды, представляющие собой участки мицелия, похожие на корни растений (рис. 70). Такие видоизменения мицелия, как хламидоспоры, склероции, служат для сохранения вида при неблагоприятных условиях. Их наличие и морфология являются важными признаками при определении грибов. Хламидоспоры имеют утолщенную оболочку, диаметр клетки больший, чем диаметр образующей их гифы, и обычно содержат большое количество включений жира и гликогена. Если они образуются в середине гифы, то называются интеркалярными, а на концах — терминальными (рис. 71). У некоторых грибов септированные гифы, сплетаясь, образуют округлые тела, называемые склероциями. Клетки гиф и их оболочки в наружном слое склероция утолщены, часто имеют темную окраску. Внутренний слой содержит более тонкостенные обычно неокрашенные клетки (рис. 72).

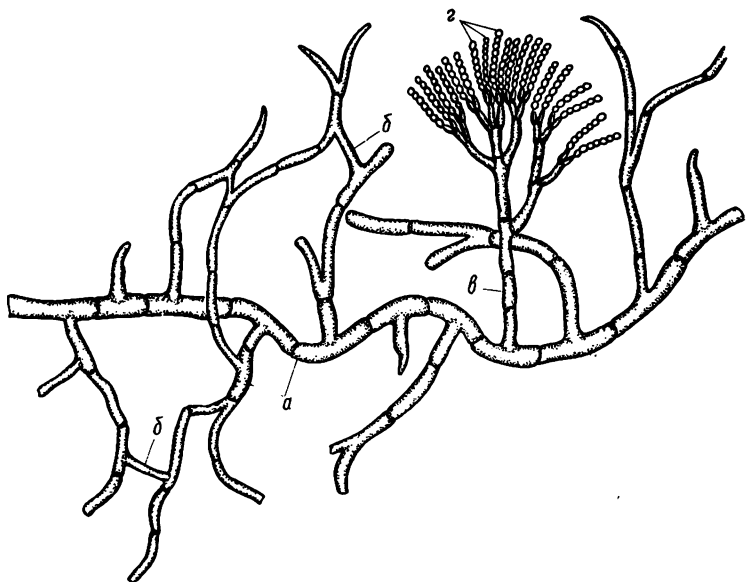


Рис. 68. Мицелий *Penicillium* sp:

*a* — септированные гифы; *б* — анастомозы; *в* — конидиеносец; *г* — конидии



Рис. 69. Мицелиальный тязг гриба «черни» (из Курсапова, 1940)

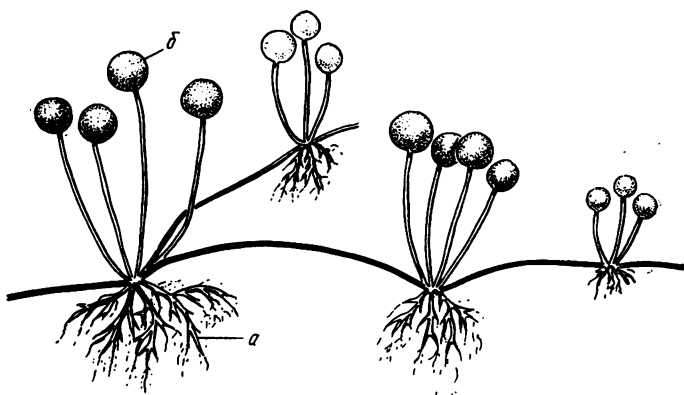


Рис. 70. Гриб *Rhizopus nigricans*:

*a* — ризоиды; *б* — спорангии (из Фробишера, 1962)

2. Способы размножения грибов. Размножение грибов весьма разнообразно. Различают вегетативное, бесполое и половое размножение. Выяснение способа размножения и морфологии его органов дает возможность определить систематическое положение грибов. Вегетативное размножение осуществляется неспециализированными или малоспециализированными частями гриба. Простейшим является размножение гриба с помощью кусочка гифы,

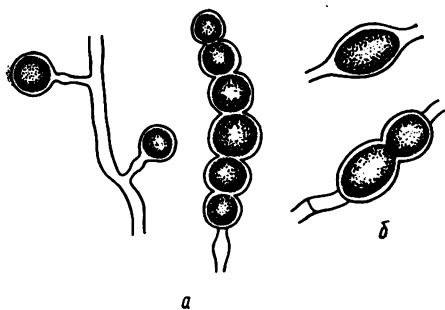


Рис. 71. Хламидоспоры фузариев: а — терминальные; б — интеркалярные (из Билай, 1980)

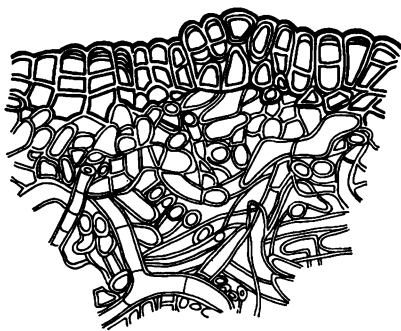


Рис. 72. Разрез через склероций (из Курсанова, 1940)

регенерирующего при попадании в благоприятные условия. Вегетативное размножение может происходить путем распада всей или верхушки растущей гифы на отдельные клетки большей частью овальной формы с тонкой оболочкой. Эти клетки называются оидиями (рис. 73).

Вегетативное размножение осуществляется также хламидоспорами и склероциями. В основном распространение грибов в природе осуществляется спорами, которые образуются при бесполом и половом способах размножения.

При бесполом размножении от вегетативных гиф отходят резко отличающиеся по строению ветви, на концах которых образуются шаровидной, овальной или цилиндрической формы вместилища спор — спорангии (см. рис. 70, б). Внутри их формируется большое количество спор, называемых соответственно спорангиоспорами. После созревания оболочка спорангия лопается и спорангиоспоры



Рис. 73. Распадение на оидии мицелия Collybia (из Курсанова, 1940)

выходят во внешнюю среду. У многих водных грибов (сапролегниевые) спорангиоспоры имеют жгутики, что позволяет им активно плавать в воде наподобие жгутиковых простейших. Это сходство с животными позволило назвать их зооспорами, а орган, в котором они развиваются, — зооспорангием. Зооспорангий, часто веретеновидной или цилиндрической формы, расположен на конце несептированной гифы, отделенной от него поперечной перегородкой (см. рис. 67, в).

Описанные выше споры относятся к спорам эндогенного происхождения, так как образуются внутри спорангиев. Существуют и экзогенные споры — конидии, которые формируются на поверхности образующего их органа — конидиеносца.

Конидиеносец представляет собой особые ветви мицелия, отличающиеся по строению и характеру ветвления от остальных гиф (см. рис. 68, в). Для некоторых видов грибов характерно тесное сплетение нескольких конидиеносцев в пучок. Такое образование называется коремией (рис. 74). Есть грибы, конидиеносцы у которых заключены в округлое тело — пикниду.

Она имеет твердую оболочку темного цвета и узкое отверстие наверху для выхода конидий (рис. 75). Пикнида защищает конидиеносцы и конидии от неблагоприятных воздействий внешней среды.

У многих низших грибов наряду с бесполом наблюдается и половое размножение. Например, сапролегниевые грибы имеют зооспорангии, а также женские и мужские половые клетки. Женская половая клетка крупная, округлая называется оогонием (см. рис. 67, з). Мужская половая клетка, меньшая по величине и несколько вытянутая, называется антеридием (см. рис. 67, д). Эти клетки образуются на концах одной или разных несептированных гиф. Половой процесс у грибов данной группы заключается в оплодотворении яйцеклеток, находящихся в оогонии, содержимым антеридия. После оплодотворения яйцеклетка образует толстую оболочку, превращаясь в ооспору. Такой половой процесс носит название оогамии. Другие низшие грибы не имеют четко дифференцированных половых органов. Они представлены двумя внешне одинаковыми клетками. При соприкосновении содержимое клеток сливается и образуется зигоспора. Процесс образования зигоспоры называется зигогамией (рис. 76). Ооспора и зигоспора после стадии покоя способны давать начало новой особи гриба.

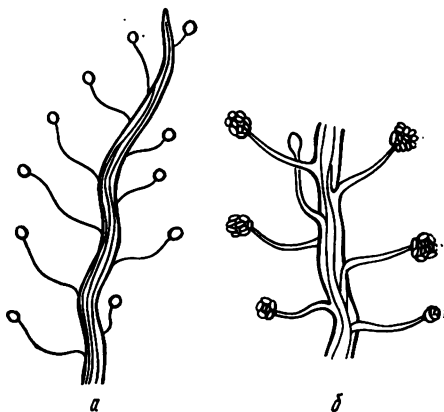


Рис. 74. Коремия гриба *Tilachlidium*: а — при малом увеличении; б — при большом увеличении (из Литвинова, 1967)

У высших грибов половой процесс протекает более сложно и заканчивается образованием различных плодовых тел. Здесь он рассматриваться не будет, так как среди высших грибов не обнаружено патогенных для рыб видов. Исключение составляют грибы рода *Penicillium*, но большинство из них утратило способность давать сумчатые плодовые тела и размножается бесполом способом с образованием конидий.

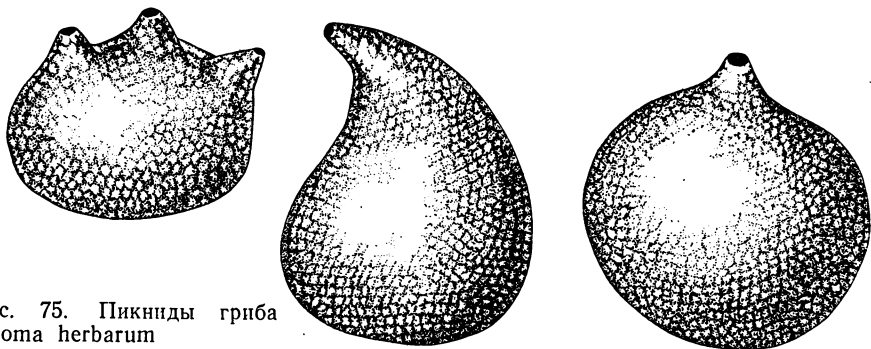


Рис. 75. Пикниды гриба *Phoma herbarum*

3. Краткая характеристика систематического положения грибов, паразитирующих у рыб. Классификация грибов дается по схеме, изложенной в 6-м издании микологического словаря Эйнсуорта, так как она отражает новейшие достижения мировой микологии.

Грибы (*Fungi*) подразделяют на два отдела. В один отдел входят слизевики, среди которых паразиты рыб не зарегистрированы. Настоящие грибы (*Eu-Mycota*) составляют второй отдел и делятся на 5 подотделов с 21 классом. Рассмотрим те подотделы и классы, в которых отмечены патогенные для рыб грибы.

Подотдел мастигомикеты (*Mastigomycotina*) включает 3 класса. Наибольший интерес представляют грибы класса оомицетов (*Oomycetes*). Они имеют хорошо развитый, несептированный мицелий, на концах которого формируются зооспорангии или хорошо дифференцированные спорангии. Зооспоры у них с двумя жгутиками. Половой процесс проходит по типу оогамии с участием оогония и антеридия, при этом образуются ооспоры. Представители этого класса преимущественно сапрофиты, но многие виды из родов *Achlya*, *Aphanomyces*, *Dictyuchus*, *Isoachlya*, *Saprolegnia*, *Leptomitis*, *Pythium* являются возбудителями сапролегниоза рыб и икры.

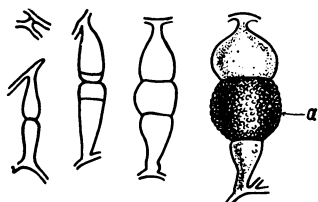


Рис. 76. Зигогамия у гриба *Rhizopus nigricans*

*a* — зигоспора (из Курсанова, 1940)

Подотдел зигомикеты (*Zygomycotina*) подразделяется на класс зигомикеты (*Zygomycetes*) и класс трихомикеты (*Trichomycetes*). Зигомикеты имеют хорошо развитый несептированный или

септированный мицелий. Бесполое размножение происходит с помощью спорангиоспор. Спорангии многоспоровые. Половой процесс осуществляется по типу зигогамии. Сюда относятся в основном сапрофиты, но имеются и паразиты рыб, такие, как *Basidiobolus intestinalis*, *Ichthyosporidium hoferi*.

Подотдел сумчатых грибов (*Ascomycotina*) включает 6 классов. В класс плектомицеты (*Plectomycetes*) входит вид *Penicillium piscium*, поражающий почки рыб. Однако он и некоторые другие виды семейства *Aspergillaceae* формально отнесены к несовершенным грибам, так как утратили способность размножаться половым способом и развиваются только в конидиальной форме.

В подотделе базидиальных грибов паразитов рыб нет. Наиболее изобилует патогенными для рыб грибами подотдел несовершенных грибов — дейтеромицетов (*Deuteromycotina*). Подотдел объединяет грибы, у которых не обнаружено половое размножение. Основной тип спороношения — конидиеносец с конидиями экзогенного происхождения. Грибы класса бластомицетов (*Blastomycetes*), как правило, не образуют мицелия, размножаются исключительно бесполом путем (почкованием или делением). К ним относятся аспорогенные дрожжи. Для ихтиопатологии из этого класса имеют значение следующие виды: *Candida albicans*, *C. sake*, *C. salmonicola*, *Cryptococcus* sp. и др. Обширный класс гифомицеты (*Hyphomycetes*) включает представителей, которые образуют конидии на простых и сложных конидиеносцах, в коремиях или растут стерильным мицелием, т. е. не образуют органов плодоношения. Могут иметь хламидоспоры. Различными авторами описаны возбудители микозов рыб, относящиеся к следующим родам: *Aureobasidium*, *Eophiala*, *Fusarium*, *Ochroconis*. В класс целомицеты (*Coelomycetes*) входят пикнидиальные грибы, которые образуют конидии в полости особых тел — пикнид. Поражение плавательного пузыря пикнидиальным грибом *Phoma herbarum* отмечается у многих видов лососевых рыб.

Порядок проведения работы следующий.

Готовят нативный препарат сапролегниевое гриба. Для этого микологическим крючком берут из пробирки кусочек мицелия водной культуры сапролегнии, помещают на предметное стекло в каплю 1%-ного водного раствора метиленовой сини, накрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом. Находят не-септированный мицелий, спорангии, зооспорангии, органы полового размножения — антеридии и оогонии.

Под малым увеличением микроскопа рассматривают культуру гриба *Phoma herbarum*. Находят мицелиальные воздушные тяжи и пикниды. Готовят нативный препарат этой культуры так, чтобы наряду с гифами в него попали пикниды. Находят поперечные перегородки на гифах, анастомозы, хламидоспоры. Изучают строение стенки пикниды и выходящие из нее конидии.

Из агаровой культуры гриба *Rhizopus nigricans* вырезают лезвием безопасной бритвы тонкий кусочек культуры вместе с агаром. Готовят препарат и рассматривают его под микроскопом. На-

ходят возвышающиеся спорангиеносцы со спорангиями, внутри которых видны спорангиоспоры. Под спорангиеносцами в слое агар рассматривают ризоиды, напоминающие корни растений.

В культуре гриба *Sclerotinia sclerotiorum* находят склероции и готовят с помощью лезвия его тонкий поперечный срез. Готовят препарат и рассматривают его под микроскопом. При малом увеличении виден наружный темный слой клеток различной формы. Внутренняя часть состоит из рыхлого сплетения бесцветных гиф.

Готовят препарат из воздушного мицелия культуры *Penicillium* sp. Находят и рассматривают под средним увеличением микроскопа сложные конидиеносцы, конидии и их расположение.

При просмотре препаратов зарисовывают характерные детали строения грибов. Берут чашку Петри с незнакомой культурой гриба и пытаются определить, к какому отделу, подотделу и классу он относится.

### Контрольные вопросы [6, 23]

1. Что такое мицелий и какие видоизменения его известны?
2. Что такое хламидоспора и какие виды ее известны?
3. Что такое склероций и каково его строение?
4. Что такое оидии и для какого способа размножения они характерны?
5. Какие споры имеют эндогенное происхождение?
6. Какие споры имеют экзогенное происхождение?
7. Что такое коремия?
8. При каком способе размножения образуется пикнида и у грибов какого класса?
9. К какому подотделу относятся грибы из рода *Penicillium*?
10. Какие способы размножения характерны для грибов — возбудителей сапролегниоза рыб?

## Занятие 36. Микологические исследования при диагностике болезней рыб

**Содержание.** Ознакомление с порядком и правилами проведения микологических исследований. Освоение некоторых методов исследования.

**Материальное обеспечение.** Микроскопы, предметные и покровные стекла, липетки, препаровальные иглы, микологические крючки, лезвия безопасной бритвы, пинцеты, скальпели, спиртовки, тампонницы с ватно-спиртовыми тампонами, флаконы с 1%-ным водным раствором метиленового синего, 0,9%-ным раствором хлористого натрия, глицерином, содержащим 10% едкого кали, стерильным раствором пенициллина и стрептомицина по 500 ЕД на 1 мл, фильтровальная бумага, спички, столики для вскрытия рыбы, пробирки со скошенным агаром Чапека, чашки Петри с агаром Чапека, зрелые культуры *Phoma herbarum*, *Penicillium* sp. и др., зараженная патогенными грибами рыба.

**Организация и проведение работы.** При постановке диагноза заболевания необходимо исключить или подтвердить его грибковую природу.

Микологические исследования проводят в бактериологической лаборатории или в лаборатории, устроенной по такому же типу. Применяемые инструменты, посуда, приборы аналогичны применяемым при бактериологических исследованиях. Подготовка посуды и приготовление питательных сред для культивирования гри-

бов основываются на правилах таких же, как при культивировании споровых форм бактерий.

Пробы для микологических исследований берут от только что погибших или погибающих рыб. Если пробы сразу обработать невозможно, то в холодильнике в замороженном виде их можно хранить в течение не более 3 сут. С целью предохранения проб от загрязнения бактериями их можно консервировать на короткий срок (до 1 сут) в растворе антибиотиков (пенициллина и стрептомицина по 100 ЕД. на 1 мл раствора). Пробы необходимо брать асептически и помещать в стерильную посуду.

В лаборатории патологический материал исследуют микроскопически, выделяют чистую культуру возбудителя, определяют его видовую принадлежность и, если он ранее не был зарегистрирован как патоген для рыб, проводят биологическую пробу.

1. Микроскопическое исследование. Самый простой, быстро осуществляемый и поэтому наиболее распространенный метод. Материал берут из различных очагов поражения и исследуют его без окрашивания в капле 0,9%-ного раствора хлористого натрия или 50%-ного водного раствора глицерина;

без окрашивания в разрушенном препарате;  
с окрашиванием препарата.

При микроскопии нативного препарата из патологического материала иногда трудно обнаружить грибы, особенно дрожжеподобные. Кроме того, по тканевым формам гриба не всегда возможно определить его видовую принадлежность. Поэтому одновременно с отбором материала для микроскопии асептически проводят отбор материала для выделения грибов на питательных средах. В зависимости от видов грибов, а также патологического материала различают несколько методов выделения.

Например, при микозе плавательного пузыря посев проводят маленькими кусочками мицелия гриба из полости плавательного пузыря.

При бронхиомикозе для выделения гриба И. И. Беспалый рекомендует ряд последовательных промываний и центрифугирований патологического материала.

При выделении патогенных грибов из одной пробы патологического материала делают не менее 5 посевов. Первичный посев лучше проводить на плотные агаровые среды. При этом очень важен состав среды, так как некоторые возбудители микозов растут только на средах с определенными ингредиентами. По клиническим признакам и данным микроскопии можно предположить вид возбудителя и применить для его выделения соответствующую питательную среду. Например, по наличию на теле рыбы в жаркий период года опухолей, превращающихся в дальнейшем в глубокие язвы ярко-красной окраски, а также по имеющимся в патологическом материале несептированным, волнообразным гифам диаметром 15—25 мкм можно предположить, что рыба поражена грибом микотического грануломатоза. Этот гриб растет только на агаре с рыбным экстрактом.

При выделении грибов в исследуемый материал, а также в колонии растущих патогенных грибов часто могут попадать загрязнители в виде бактерий и плесени. Для получения культур, свободных от загрязнителей, применяют методы разделения. Они основаны на следующих принципах:

неспособности различных организмов расти на одной и той же среде определенного состава и рН, т. е. на применении селективных сред. Например, добавление 0,5 мг/мл плотной среды 2%-ного раствора актидиона задерживает рост плесневых грибов и практически не мешает развитию патогенных грибов. Снижение рН питательной среды до 3—4 не прекращает роста грибов, в то время как бактерии, особенно сапрофитные, могут развиваться только при рН 7,0—8,5;

неспособности большинства бактерий в отличие от грибов расти при температуре 5—10°C;

возможности получения тонких суспензий из поликультур или патологического материала с дальнейшим равномерным распределением их по поверхности плотной среды. При этом каждый зачаток микроорганизма дает начало колонии. Интересующую колонию осторожно переносят на новую питательную среду и получают рост одного вида микроорганизма.

А. А. Флоринская при выделении грибов, вызывающих сапролегниоз рыб, применяла метод механической очистки. Для этого выделенный с больных рыб или их икры кусочек грибного мицелия помещали в чашки Петри со стерильной дистиллированной водой, куда добавляли стерильные половинки семян конопли. Через 2—3 дня на конопле появлялись гифы гриба. Путем многократных отмываний и пересевов в стерильной дистиллированной воде получали более или менее свободную от бактерий «гросскультуру», часто содержащую несколько видов водных грибов. Затем из «гросскультур» выделяли чистые культуры гриба путем посева одной гифы или зооспор из одного зооспорангия в капле воды на плотные агаровые среды.

Чашки Петри, пробирки с посевами материала помещают в термостат или выдерживают при комнатной температуре в течение нескольких суток, пока не сформируются характерные колонии.

Первичную колонию описывают редко, чаще делают пересев на специальные для данного вида грибов среды и после получения характерной колонии приступают к ее описанию. Пересев осуществляют также с целью сохранения грибов. Его производят несколькими способами в зависимости от того, какие элементы грибов переносят. Переносимый материал называется инокулюмом. Им могут быть частицы мицелия, конидии, зооспоры и т. д. Фиксацию инокулюма на новой среде нельзя осуществлять штрихом, как это делается в бактериологии. Рекомендуется легкое касание среды в одном месте. При переносе мицелия можно неглубоко погружать его в среду, но при этом нельзя допускать его скручивания.

При выделении, пересевах и других операциях с культурами грибов и средами должно быть исключено их загрязнение, поэтому следует избегать движения воздуха в помещении, где производятся работы. Чашки Петри ставят на стерильную поверхность, по возможности не раскрывают их полностью, а только приоткрывают для введения инструментов. Пробки из пробирок извлекают плавными круговыми движениями (предварительно наружную часть их обжигают). Пробирки с плотными средами при пересевах необходимо держать вертикально отверстиями вниз, с жидкими средами — почти горизонтально.

Полученные после посева культуры тщательно изучают и описывают их макро- и микроскопическое строение, а затем переходят к определению с помощью существующих определителей.

Порядок проведения работы следующий.

Больную рыбу обездвиживают, осматривают, протирают спиртовым тампоном и кладут на стерильную поверхность столика для вскрытия рыб. Вскрывают рыбу стерильными инструментами и обследуют внутренние органы. Для культурального выделения возбудителя стерильными ножницами вырезают маленькие кусочки ткани в области очага поражения и аккуратно переносят их во флаконы со стерильным раствором стрептомицина и пенициллина (по 500 ЕД в 1 мл) на 15—20 мин. Затем микологическим крючком, прокаленным в пламени спиртовки, извлекают кусочки материала и раскладывают их по поверхности агара Чапека в чашках Петри или пробирках.

Микроскопические исследования патологического материала проводят несколькими способами. На предметное стекло в каплю 0,9%-ного раствора хлористого натрия кладут маленький кусочек исследуемого материала, тщательно расщепляют его препаровальными иглами, накрывают покровным стеклом, слегка придавливают и исследуют под средним и большим увеличением микроскопа. Элементы грибов часто не имеют окраски, и их трудно увидеть, поэтому препарат нужно рассматривать при опущенном конденсоре или с прикрытой диафрагмой. Другой маленький кусочек материала помещают на предметное стекло в каплю глицерина, содержащего 10% едкого кали, накрывают покровным стеклом, осторожно придавливают. Через 5—6 мин изучают препарат под микроскопом. Все клеточки и ткани рыбы превращаются в однородную прозрачную массу, и на ее фоне хорошо видны элементы грибов. Между двумя предметными стеклами раздавливают кусочек исследуемого материала. На одном из стекол делают тонкий ровный мазок, фиксируют его нагреванием в пламени горелки, а затем покрывают 1%-ным водным раствором метиленового синего. Через 30 с краску сливают, ополаскивают водой, просушивают между листами фильтровальной бумаги и исследуют под микроскопом.

Берут чашку Петри с хорошо сформировавшейся колонией гриба и производят пересевы на скошенный агар в пробирках:

инокулюм — погруженный мицелий; микологическим крючком вырезают маленький кусочек агара в непосредственной близости от края колонии и переносят на скошенный агар;

инокулюм — воздушные гифы; очень осторожно, чтобы не повредить гифы, захватывают кусочек мицелия и переносят на поверхность питательной среды;

инокулюм — конидии гриба; острием крючка касаются конидиеносцев, а затем поверхности агаровой среды.

По имеющейся колонии гриба описывают его культуральные признаки. Обращают внимание на размеры колонии, форму, строение края и центра, характер поверхности (гладкая, войлочная, бархатистая, паутинистая, хлопьевидная и т. д.), цвет колонии, мицелия, репродуктивных органов, окраску обратной стороны колонии и среды. Затем ставят чашку под микроскоп и при среднем увеличении изучают мицелий и его видоизменения, характер ветвления конидиеносцев и расположение спор. Для детального изучения элементов гриба готовят нативный препарат. С этой целью осторожно лезвием безопасной бритвы вырезают радиально тонкий диаметром до 1 мм ломтик колонии, кладут его на стекло в каплю воды, ждут, пока мицелий смочится, и накрывают покровным стеклом. Рассматривают под большим увеличением, измеряют и зарисовывают характерные видоизменения мицелия, репродуктивные органы, споры. Описывают их форму, строение и окраску.

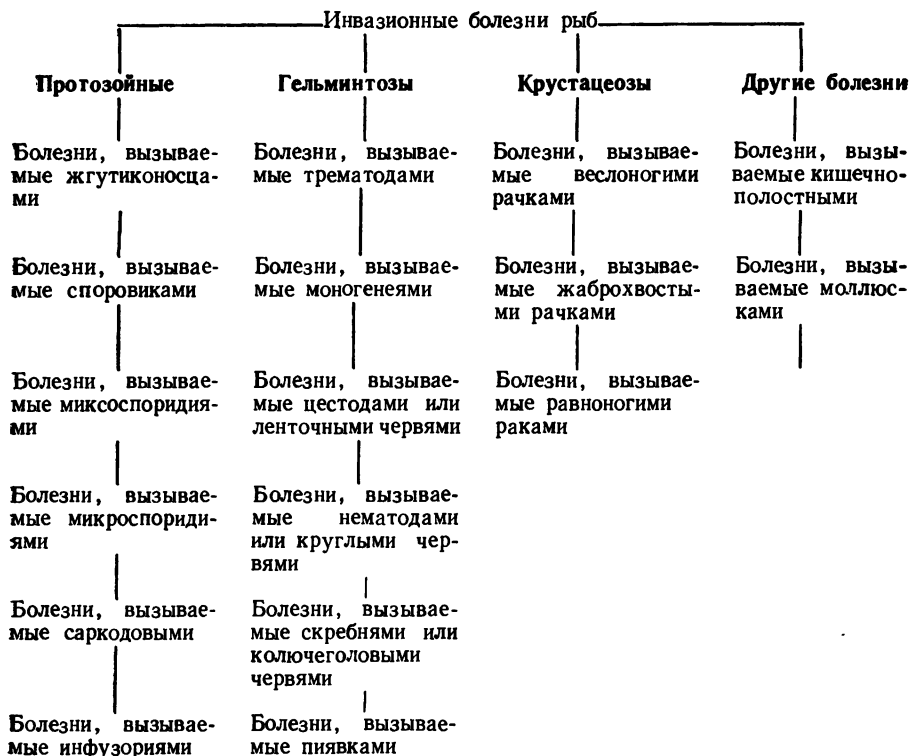
#### Контрольные вопросы [23, 26]

1. Какова последовательность работ при микологических исследованиях?
2. Какими способами проводят микроскопические исследования?
3. В чем сущность метода разделения и на каких принципах он основан?
4. Когда и как применяют метод выделения?
5. Какими способами проводят пересевы грибов?
6. С помощью каких признаков описывают морфологию колонии гриба?
7. Что нужно знать при определении грибов?

### Глава III. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНВАЗИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ РЫБ

Инвазионными (или паразитарными) называют болезни, возбудителями которых являются животные-паразиты: простейшие, гельминты, ракообразные, кишечнополостные, моллюски. Наиболее распространены протозойные болезни (возбудители — простейшие Protozoa), гельминтозы (возбудители — паразитические черви классов Monogenea, Trematoda, Cestoda и др.) и крустацеозы, возбудителями которых являются ракообразные Crustacea.

## Схема классификации инвазионных болезней рыб



### МЕТОДИКА ПОЛНОГО ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА РЫБ

Для постановки диагноза и правильной организации лечебных и профилактических мероприятий необходимо выяснить причину болезни, т. е. обнаружить возбудителя и определить его видовую принадлежность. Лабораторным исследованиям должен предшествовать осмотр заболевшей рыбы непосредственно в хозяйстве, на водоеме, где ихтиопатолог отбирает необходимую для исследования пробу.

Помимо других методов диагностики (вирусологического, бактериологического, микологического) в обязательном порядке проводят полное паразитологическое вскрытие рыб. Метод полного паразитологического вскрытия рыб разработан В. А. Догелем, Э. М. Ляйманом, А. П. Маркевичем, позднее усовершенствован многими другими исследователями и является основным в ихтиопаразитологии.

### З а н я т и е 37. Паразитологическое вскрытие рыб

**Содержание.** Освоение общих положений и порядка полного паразитологического вскрытия рыб.



Рис. 77. Основные инструменты для паразитологического вскрытия рыб

**Материальное обеспечение.** Микроскоп\* с объективами  $\times 8-9$ ,  $\times 40$ ,  $\times 90$ , окулярами  $\times 7$ ,  $\times 10$ ,  $\times 15$ , фазово-контрастное устройство, биноклярный стереоскопический микроскоп типа МБС\*\* с окулярами  $\times 6$ ,  $\times 8$ ,  $\times 12,5$  или препаровальная лупа с окулярами  $\times 10$ ,  $\times 20$ , стекла для вскрытия размером  $6 \times 9$  и  $9 \times 12$  см, предметные и покровные стекла со шлифовальным краем для изготовления мазков крови, препаровальные иглы разной толщины и заточки (2—3), пинцеты с толстыми и тонкими концами (рис. 77), ножницы хирургические и глазные, скальпели разных размеров и формы, пипетки разные (с грушевидным баллоном, глазные, пастеровские), эмалированные кюветы (1—2), чашки Петри (10), лабораторные солонки (3—4),

материальные банки для хранения мазков с простейшими, часовые стекла, иммерсионное или вазелиновое масло, вата, марля, фильтровальная бумага, тушь, пергаментная бумага, кисточки, карандаши, весы, измерительная доска, принятая в ихтиологии, сантиметровая линейка, штангенциркуль, лимоннокислый натрий 5%-ный, метиловый спирт, этиловый спирт 70°-ный, формалин 4%-ный, жидкость Шаудина.

**Организация и проведение работы.** Пользуясь методом полного паразитологического вскрытия, можно наиболее полно выяснить фауну паразитов рыб, что совершенно необходимо для объективной оценки паразитологической ситуации в конкретном хозяйстве, водоеме.

Полному паразитологическому исследованию в изучаемом водоеме подвергают не менее 15 рыб каждого вида и возраста, личинок исследуют не менее 25 экз. в каждом случае. Для исследования необходимо брать живую или только что уснувшую рыбу и лишь в исключительных случаях зафиксированную.

Паразитологическое вскрытие ведут в принятом порядке и определенной последовательности, с тем чтобы тщательно и обстоятельно обследовать все органы и ткани рыбы, не упустить каких-либо паразитов. При вскрытии рыбы нужно соблюдать аккуратность, следить за тем, чтобы поверхность внутренних органов не была повреждена при выделении из полости тела, так как при небрежном вскрытии и повреждении органов паразиты могут быть утеряны или, попав в другой орган, могут ввести исследователя в заблуждение.

\* Для микроскопии можно использовать биологические микроскопы различных марок: МББ (большой биологический), МБИ (биологический исследовательский), МБД (биологический дорожный) и др.

\*\* Микроскопы биологические стереоскопические (МБС-1 или МБС-2) используют для изучения крупных объектов. Далее они будут именоваться МБС. При необходимости они могут быть заменены штативными лупами.

В паразитологическом исследовании используют компрессионный способ, т. е. исследуемую ткань или орган помещают между двумя стеклами, сдавливают между ними до прозрачности и исследуют в проходящем свете микроскопа или лупы.

Очень важно провести тщательный количественный учет найденных паразитов, ибо только таким образом можно оценить эпизоотологическую ситуацию и патогенное воздействие паразитов на рыб. Гельминтов и ракообразных учитывают в абсолютных величинах, а простейших принято подсчитывать в 25 полях зрения микроскопа при увеличении  $7 \times 10$ ,  $7 \times 40$  в зависимости от величины паразита и выражать в средней на одно поле зрения микроскопа.

Если количество паразитов так велико, что собрать всех не представляется возможным, то собирают часть их (например, моногеней с одной половины жаберных дуг). Собранных паразитов отмывают в чистой воде и в дальнейшем изготавливают окрашенные препараты, по которым определяют видовую принадлежность. Для каждой группы паразитов существуют специфические способы фиксации и окраски, описанные в соответствующих лабораторных работах.

Порядок проведения работы следующий.

1. Осмотр, внешнее обследование рыбы и взятие крови. Для обследования берут живую или только что уснувшую рыбу, обездвигивают ее и осматривают. Прежде всего обращают внимание на окраску, форму тела, наличие на нем повреждений, опухолей, черных пятен, язв (при краснухе и других болезнях), белого налета на коже и жабрах, а также крупных паразитов — рачков, пиявок и др. После внешнего осмотра делают скальпелем соскоб с поверхности тела. Собранный слизь помещают в каплю воды на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и рассматривают сначала под малым, а затем под большим увеличением микроскопа. Здесь могут быть обнаружены простейшие: хилодонеллы, ихтиофтириусы, апиозомы, триходины, миксоспоридии, моногеней. После взятия соскоба рыбу следует быстро (чтобы не слишком подсушить) взвесить и измерить. Обычно определяют длину тела рыбы от переднего конца головы до конца чешуйчатого покрова, т. е. промысловую длину ( $l$ ) и до конца хвостового плавника, т. е. зоологическую длину ( $L$ ), у сиговых рыб измеряют длину от конца головы до развилки хвостового плавника. Позднее, пользуясь этими данными, определяют темп роста и коэффициент упитанности по формуле

$$K = P \cdot 100/l^3,$$

где  $K$  — коэффициент упитанности;  $P$  — масса рыбы, г;  $l$  — длина тела до конца чешуйчатого покрова, см.

Если возраст исследуемой рыбы не известен, то для его определения берут чешуйки под спинным плавником, у бесчешуйчатых рыб берут жесткий луч спинного или грудного плавников, по

спилам которых определяют возраст. Иногда используют слуховые камешки (отолиты), определяя возраст по их шлифам. Далее у рыбы отрезают ножницами плавники и помещают их на стекла для вскрытия, смочив хорошо водой, прикрывают чашками Петри. Кровь для приготовления мазков и обнаружения кровепаразитов удобно брать либо из сердца, либо из хвостовой артерии (см. занятие 6).

Для приготовления мазка каплю крови из пастеровской пипетки выпускают на правый конец чистого предметного стекла. Другое стекло со шлифованным краем подводят к капле слева под острым углом. Когда капля растечется по краю стекла, его быстро двигают влево и кровь равномерно распределяется по стеклу. Мазок подсушивают на воздухе, фиксируют метиловым спиртом в течение 5 мин или смесью равных частей этилового спирта и эфира в течение 20—30 мин. Позднее мазок окрашивают и просматривают под микроскопом ( $\times 90$ ) для обнаружения кровепаразитов (см. с. 198).

После взятия крови вырезают сердце, разрезают его небольшими ножницами, выпускают кровь на большое стекло и просматривают под лупой и бинокляром. В крови могут быть трематоды из рода *Sanguinicola*. Мышцы сердца просматривают компрессионным способом.

Далее осматривают плавники, отрезанные ранее и хранящиеся увлажненными. На плавниках могут быть обнаружены простейшие (хилодонеллы, триходины, моногенеи, гиродактилюсы, дактилогиреусы, рачки и др.).

После плавников обследуют жабры. Ножницами отрезают жаберные крышки, а затем осторожно перерезают с двух концов жаберные дуги. Вынимают их пинцетом и переносят на стекло для вскрытия, покрывают чашкой Петри, смочив водой. Сначала обследуют жаберную артерию, в которой могут быть трематоды рода *Sanguinicola* и их яйца, затем под лупой обследуют дуги целиком, раздвигая жаберные лепестки препаровальными иглами, осматривая и жаберные тычинки на наличие крупных паразитов (*Ergasilus*, *Sinergasilus*, *Achteres*, *Lernaecocera*), цисты микроспоридии. Затем делают соскоб и просматривают его под микроскопом компрессионным способом, с помощью которого обнаруживают таких мелких паразитов, как хилодонеллы, триходины, апиозомы, ихтиофтириусы, микроспоридии, моногенеи, личинки трематод и др.

Далее обследуют носовые полости. Сначала с помощью пипетки капают в них чистую воду и тут же вместе со слизью оттягивают ее обратно. Такую процедуру делают 2—3 раза до полного извлечения слизи. Слизь просматривают под микроскопом компрессионным способом. Потом разрезают носовую полость и делают соскоб с ее внутренней стороны, который просматривают так же, как предыдущий. В носовых полостях могут быть обнаружены инфузории, микроспоридии, моногенеи и представители других групп паразитов.

2. Вскрытие полости тела и обследование внутренних органов. Вскрытие делают очень осторожно, чтобы не повредить внутренних органов. Для вскрытия полости тела делают поперечный разрез несколько впереди анального отверстия, не повредив кишечника. В этот разрез вводят ножницы и делают продольный разрез вдоль брюшка, вплоть до жаберной полости, и отсекают левую стенку полости тела (см. рис. 17). Осматривают внутренние органы снаружи и приступают к вскрытию. Сначала выделяют кишечник и связанные с ним внутренние органы: печень, желчный пузырь, селезенку. Для этого тонкими ножницами аккуратно отсекают кишечник у ротовой полости и у самого анального отверстия, после чего осторожно вынимают весь комплекс внутренних органов, связанный с кишечником. Все это помещают в отдельную чашку Петри или кювету, где проводят дальнейшее вскрытие. Осторожно выделяют желчный пузырь, так как при его повреждении и излитии желчи могут быть потеряны находившиеся в нем паразиты. Далее из полости тела выделяют оставшиеся там внутренние органы: гонады, плавательный пузырь, почки, мочевой пузырь. Мочевой пузырь выделяют также очень осторожно, ибо он мал (особенно у карповых рыб) и легко может быть потерян. Чтобы его обнаружить, подводят конец небольшого пинцета под мочеточники и, слегка оттягивая их вверх, ведут пинцет по направлению к анальному отверстию: слияние мочеточников будет местоположением мочевого пузыря. Отпрепарированные органы помещают на стекла для вскрытия, в чашки Петри, кюветы, следя за тем, чтобы они постоянно были смочены водой и не соприкасались друг с другом. После препарирования всех внутренних органов осматривают брюшную полость, где могут встретиться личинки ленточных, круглых червей, трематоды и другие паразиты.

Далее исследуют все внутренние органы. Желчный и мочевой пузыри помещают на часовые стекла (каждый на отдельное стекло), разрезают острыми ножницами и их содержимое рассматривают под лупой и микроскопом (при малом и большом увеличении). С внутренней стороны стенки пузырей делают соскоб, который также просматривают под микроскопом. В желчном и мочевом пузырях могут быть обнаружены амебиды микроспоридий, трематоды, инфузории, личинки ленточных червей. Затем обследуют печень, селезенку, гонады, почки, жировую ткань. Сначала каждый орган осматривают невооруженным глазом, обращая внимание на его цвет, размер и форму. Затем отделяют по небольшому кусочку от каждого органа и просматривают под микроскопом (при малом и большом увеличении) для обнаружения спор микроспоридий, не собранных в цисту и потому невидимых невооруженным глазом. Остальную часть органа просматривают компрессионным способом под МБС или лупой.

Кишечник разделяют на небольшие части и каждую часть разрезают вдоль. Крупные куски непереваренной пищи удаляют,

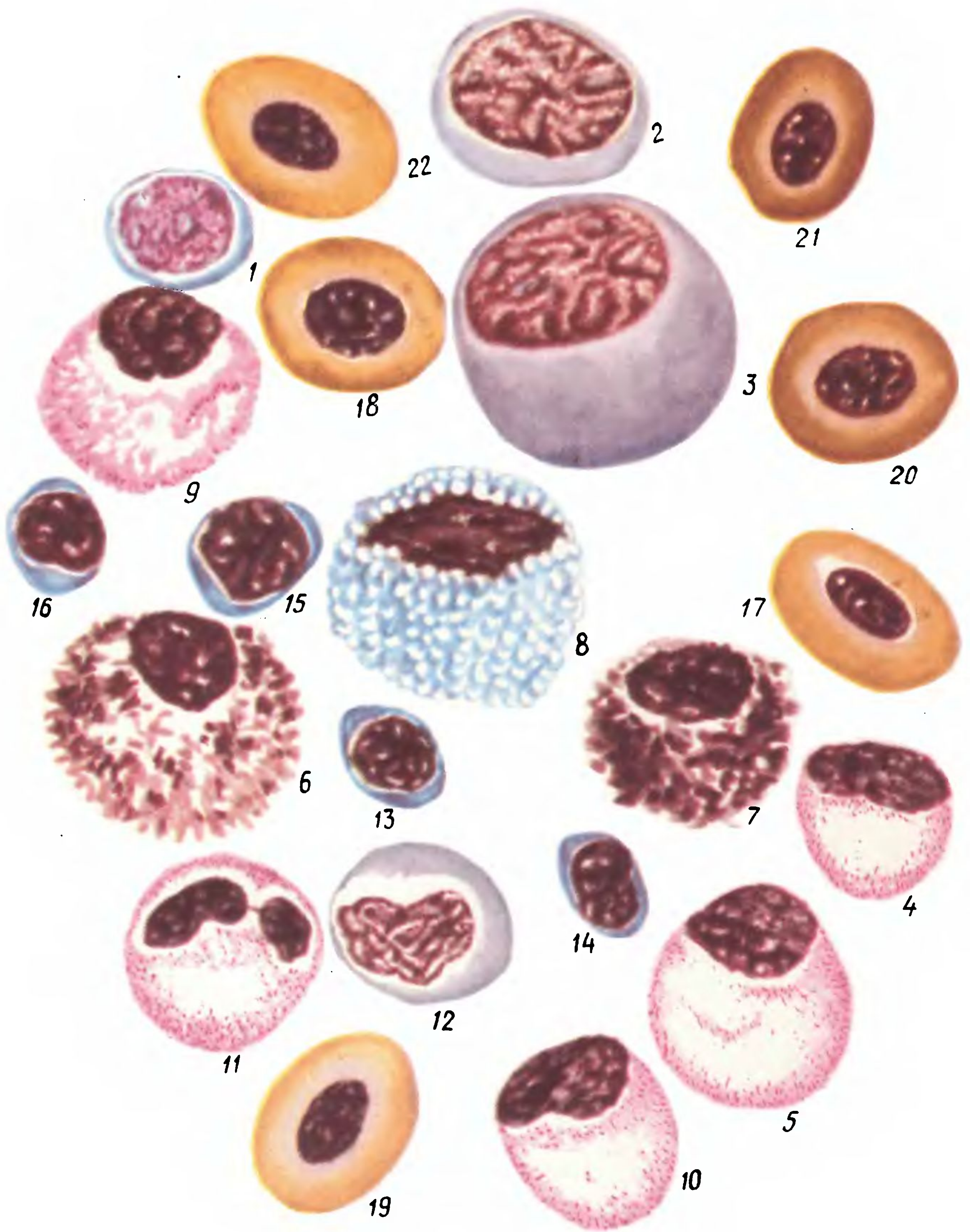
внимательно осмотрев их, затем делают соскоб содержимого, а также соскоб со стенки кишечника, просматривают то и другое компрессионным способом под МБС при малом и большом увеличении микроскопа. В кишечнике могут быть найдены ооцисты кокцидий, жгутиконосцы, микроспоридии, трематоды, цестоды и их личинки, круглые черви и их личинки, скребни.

Плавательный пузырь сначала осматривают внешне, а затем разрезают вдоль и делают соскоб с его внутренней поверхности и между оболочками, просматривая их под малым и большим увеличением микроскопа. Стенку пузыря просматривают компрессионным способом. В плавательном пузыре могут быть обнаружены ооцисты кокцидий, круглые черви, микроспоридии, грибы и др.

Глазное яблоко аккуратно выделяют из глазницы, подрезая его снизу тонкими ножницами, и делают соскоб с дна глазного яблока. Вынутый глаз осторожно разрезают и выделяют хрусталик и стекловидное тело. Хрусталик просматривают под лупой или МБС, поворачивая его с помощью препаровальных игл. Если паразитов обнаруживают, хрусталик аккуратно сдавливают между двумя предметными стеклами: в отслоившейся оболочке четко видны метацеркарии трематод рода *Diplostomum*, микроспоридии, круглые черви. Стекловидное тело просматривают компрессионным способом.

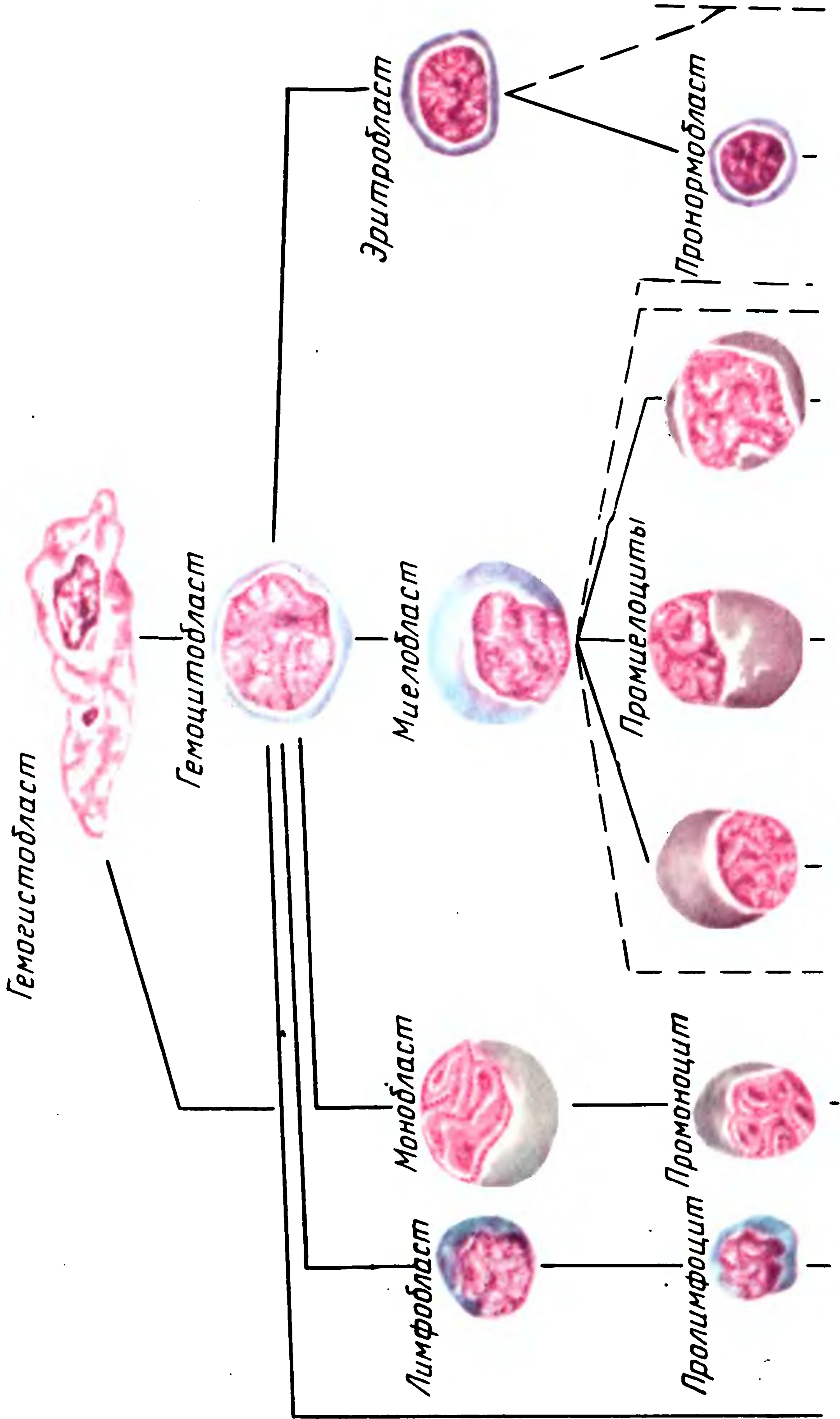
Далее обследуют головной и спинной мозг. Для этого вскрывают черепную коробку рыбы с помощью больших ножниц, скальпеля или другого инструмента в зависимости от величины рыбы. Вынутый мозг просматривают компрессионным способом под МБС при малом и большом увеличении микроскопа. Для выделения спинного мозга перерезают ножницами позвоночник возле хвостового плавника и небольшим пинцетом вытягивают спинной мозг из спинномозгового канала. Можно разрезать позвоночник на части и выделять спинной мозг по частям. В мозгу могут быть обнаружены цисты микроспоридий, личинки трематод.

Чешую (100 шт.) для исследования снимают с разных частей тела и просматривают под лупой или МБС в капле воды. На поверхности чешуи, а также под ней могут быть обнаружены личинки трематод рода *Metagonimus*, некоторые нематоды и другие паразиты, опасные для человека. Мускулатуру просматривают после снятия кожи с обеих сторон тела рыбы. Кожу также обследуют: на внутренней стороне ее могут встретиться личинки различных трематод. На мускулатуре, освобожденной от кожи, острым скальпелем делают надрезы поперек тела так, чтобы разрезать всю ее на тонкие лепестки. Раздвигая лепестки иглой, просматривают их невооруженным глазом. Часть мускулатуры (1 см<sup>3</sup>) исследуют компрессионным способом. Кроме того, небольшие участки мускулатуры, взятые в разных частях тела, предварительно измельчив скальпелем, просматривают под микроскопом. В мускулатуре можно заметить цисты трематод, цестод и других паразитов.



**Табл. I. Морфологическая картина клеток крови карпа в норме:**

*1* — гемоцитобласт; *2* — миелобласт; *3* — промиелоцит; *4* — нейтрофильный миелоцит; *5–9* — нейтрофильный, базофильный, псевдобазофильный, вакуолизированный и псевдозозинофильный метамиелоциты; *10, 11* — палочкоядерный и сегментоядерный нейтрофилы; *12* — моноцит; *13–16* — лимфоциты, *17–22* — эритроциты.



----- Мегакариоциты

Нормобласт  
базофильный



Нормобласт  
полихромато-  
фильный



Нормобласт,  
оксифильный



Эритроциты

----- Эозинофилы



Псевдоэозинофилы

Миелоциты



Метамиелоциты



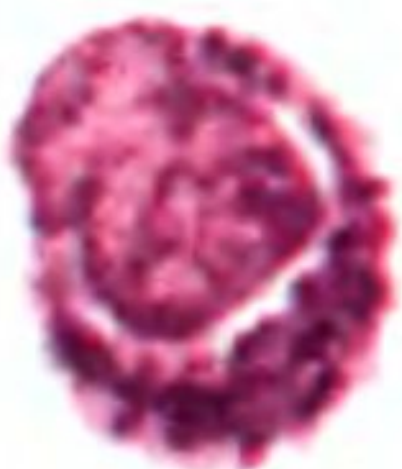
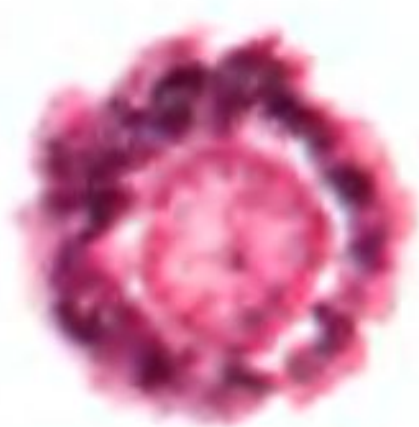
Палочкоядерные



Сегментоядерные



Нейтрофилы



Псевдобазофилы

----- базофилы

Моноциты

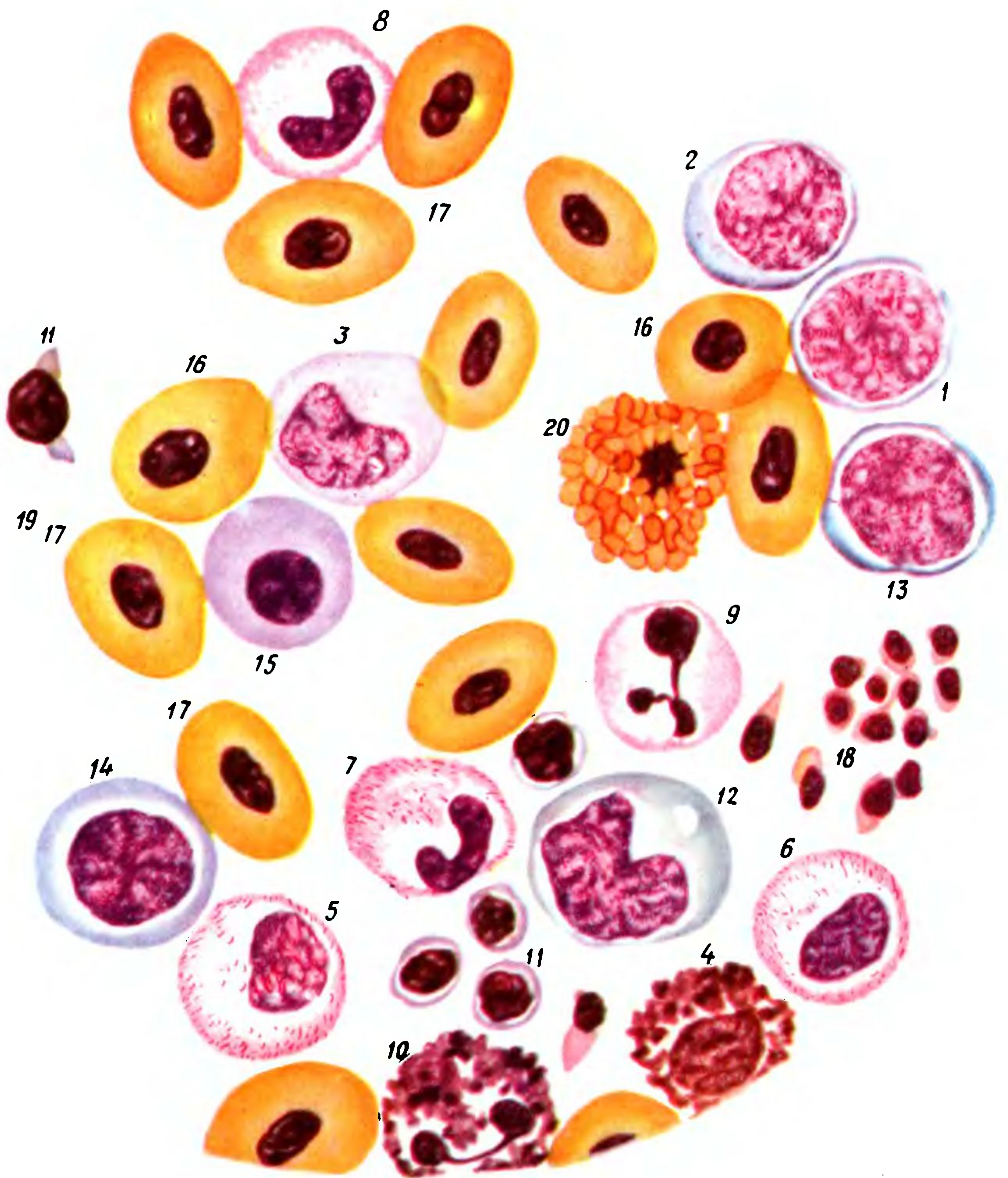


Лимфоциты



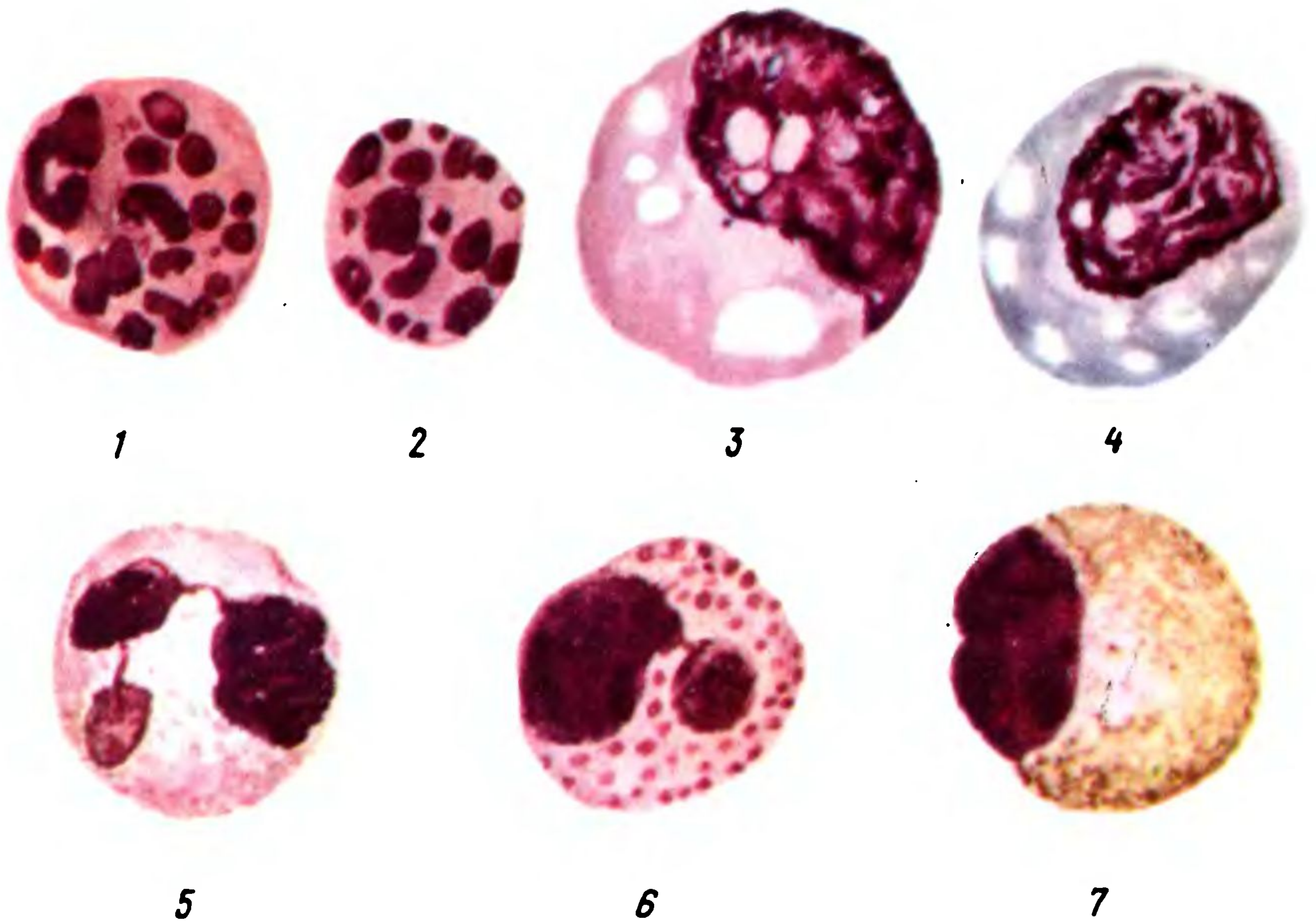
Тромбоциты





**Табл. III. Картина крови толстолобика:**

1 — гемоцитобласт; 2 — миелобласт; 3 — промиелоцит; 4 — миелоцит псевдобазофильный; 5 — миелоцит нейтрофильный; 6 — метамиелоцит нейтрофильный; 7 — палочкоядерный псевдозозинофил; 8 — палочкоядерный нейтрофил; 9 — сегментоядерный нейтрофил; 10 — сегментоядерный псевдобазофил; 11 — лимфоциты; 12 — моноцит; 13 — эритробласт; 14 — нормобласт базофильный; 15 — нормобласт полихроматофильный; 16 — нормобласт оксифильный; 17 — эритроциты; 18 — тромбоциты; 19 — клетка с вакуолизированной цитоплазмой; 20 — эозинофил

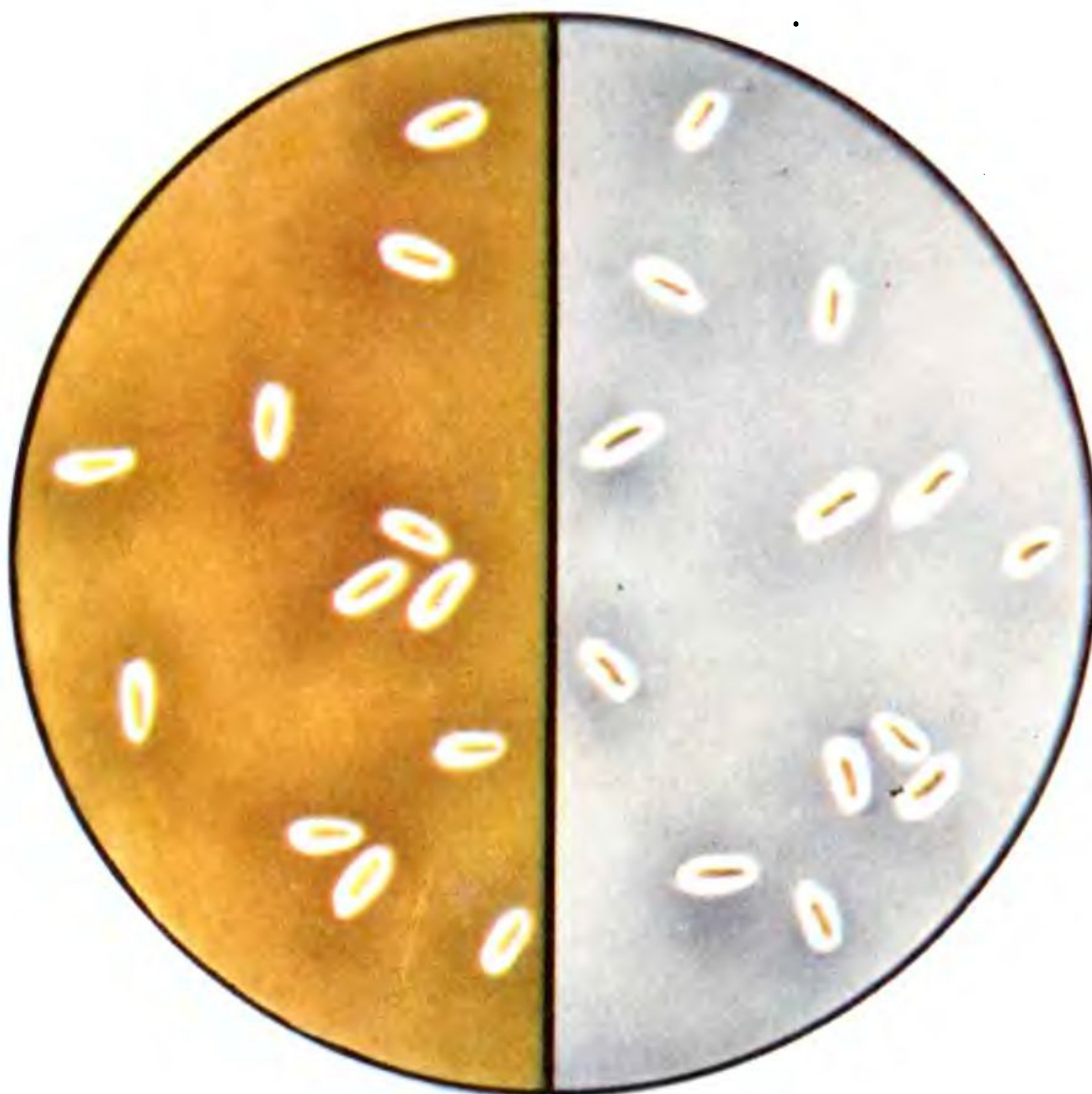


**Табл. IV. Патологические структурные изменения в клетках крови карпа:**

1, 2 — кариорексис ядра; 3, 4 — вакуолизация ядра и цитоплазмы промиелоцита и моноцита; 5 — гиперсегментация ядра нейтрофила; 6 — гиперсегментация ядра базофила; 7 — изменение цвета зернистости у нейтрофила



**Табл. V. Фагоцитоз бактерий *Aeromonas punctata* клетками экссудата из брюшной полости карпа**



**Табл. VI. Окраска капсул бактерий:**  
слева — по Боголепову; справа — по Бурри—Гинсу



**Табл. VII. Стадии развития клеток крови сазана:**

1, 2 — гемоцитобласты; 3 — эритробласт; 4 — базофильный нормобласт; 5 — полихроматофильный нормобласт; 6, 7 — эритроциты.

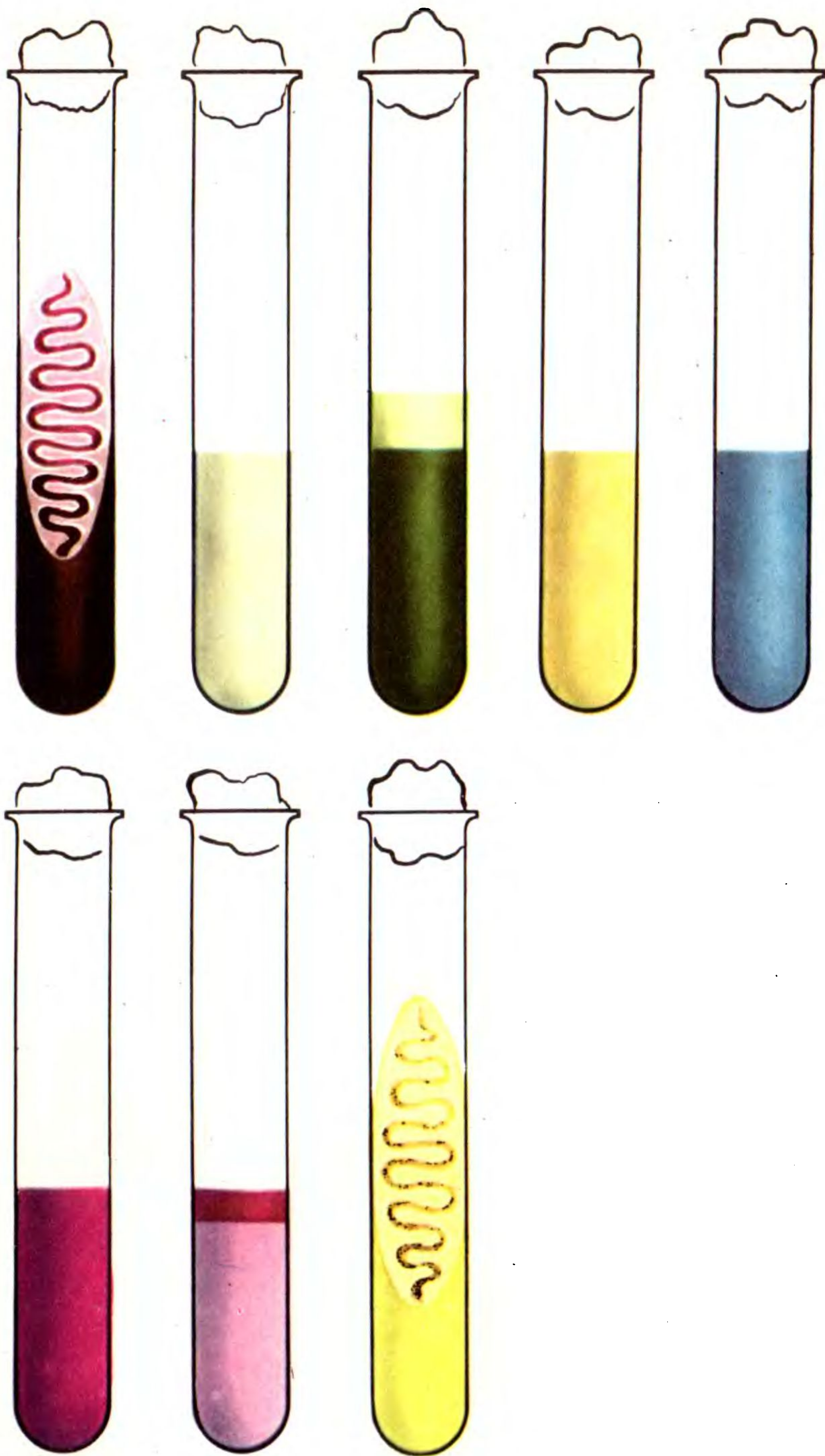
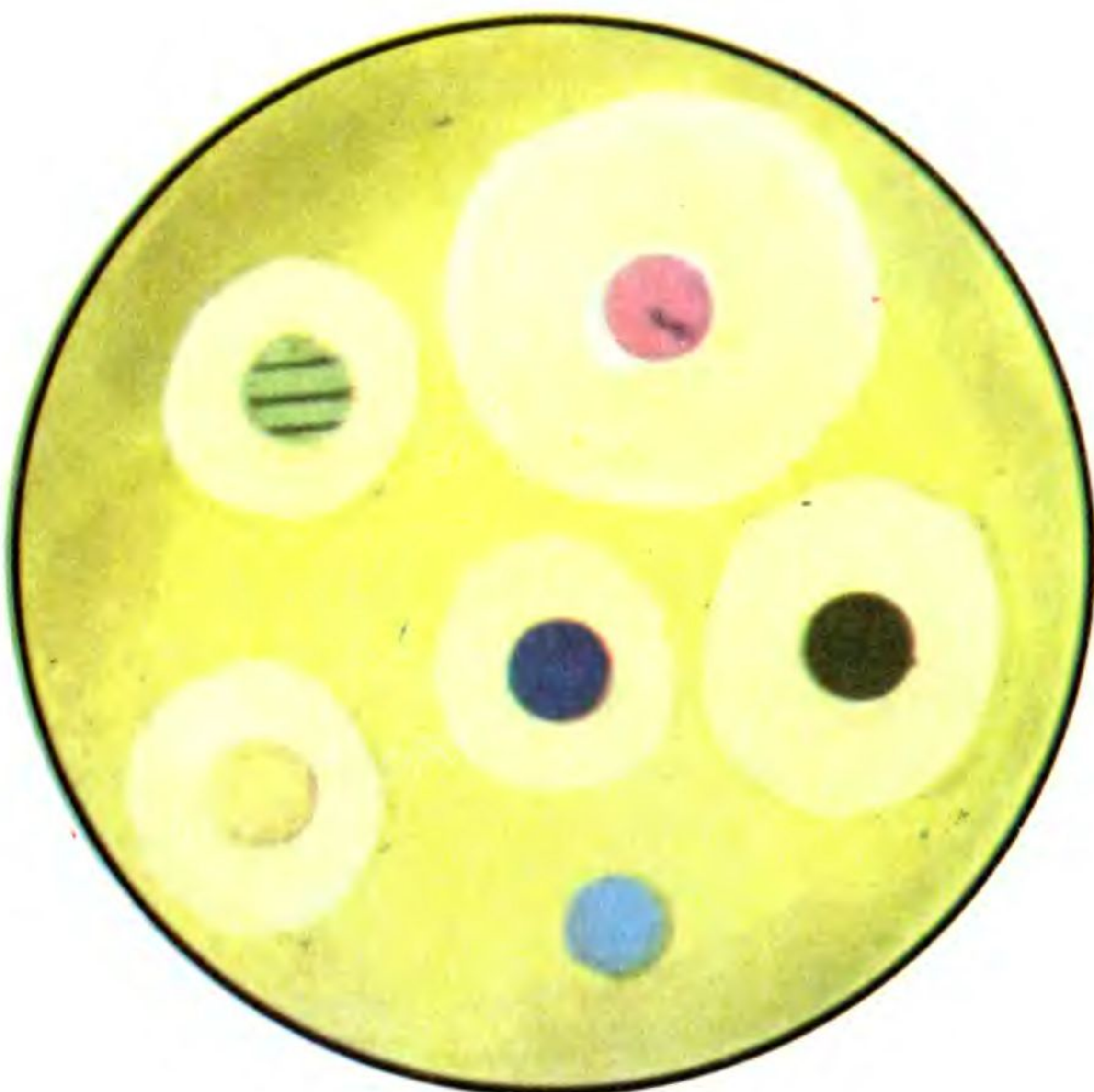


Табл. VIII. «Пестрый ряд» Гисса для определения ферментативной активности бактерий



**Табл. IX. Изменение цвета колоний цитохромоксидазоположительных бактерий**



**Табл. X. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам методом диффузии в агар**

Если обследуют форель или других лососевых рыб, то специально обследуют головы для выявления микроспоридий *Mucosoma cerebralis* — возбудителя вертежа, который локализуется в хряще слуховых капсул. Для обнаружения этого паразита голову рыбы измельчают ножницами, растирают в ступке, образовавшуюся массу хорошо смачивают водой и просматривают под большим увеличением микроскопа, помещая частями на предметное стекло.

Существуют и другие способы обнаружения и выделения возбудителей вертежа. Так, в США измельченную скелетную массу обрабатывают раствором ферментов (трипсина, пепсина и др.), которые способствуют освобождению спор, а затем центрифугируют. В полученной надосадочной жидкости, исследуя ее под микроскопом, легко обнаруживают споры миксосом.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 7, 17, 30, 36, 37, 43, 46, 48]

1. Какие болезни рыб называют инвазионными и как их классифицируют?
2. В чем сущность полного паразитологического вскрытия рыбы?
3. Какое количество рыб обследуют для выяснения паразитологической ситуации в хозяйстве?
4. Как учитывают количество найденных паразитов?
5. В каком порядке проводят внешнее обследование рыбы?
6. Как берут кровь и фиксируют мазок?
7. Что такое компрессионный метод исследования?
8. В какой последовательности исследуют внутренние органы?
9. Как исследуют кишечник, почки и печень?
10. Как обследуют глаза и каких паразитов там часто находят?
11. Как обнаруживают возбудителя вертежа лососевых?
12. Какие паразиты локализируются в плавательном пузыре и как их обнаруживают?

#### МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПРОТОЗОЙНЫХ БОЛЕЗНЕЙ РЫБ

Протозойные болезни рыб вызываются паразитами, относящимися к подцарству простейших — преимущественно одноклеточных организмов.

Клетка простейшего состоит из цитоплазмы, а также одного или нескольких ядер. Цитоплазма включает поверхностный слой — эктоплазму и более жидкую часть — эндоплазму, в которой располагаются ядро, вакуоли и другие органоиды. Эктоплазма может быть плотной, благодаря чему поддерживается постоянство формы тела простейших. Пищеварение осуществляется с помощью пищеварительной вакуоли. У большинства простейших имеется цитостом (ротовое отверстие), у некоторых — сосательные шупальца. Имеются выделительные и дыхательные вакуоли. Передвижение простейших осуществляется с помощью жгутиков, ресничек и псевдоподий. В определенных условиях некоторые простейшие способны образовывать цисту покоя и переживать неблагоприятные условия.

Размножение у большинства простейших происходит бесполом путем: делением надвое или множественным делением; встречается и половое размножение.

Подцарство простейших включает типы жгутиковых, споровиков, ресничных инфузорий, книдоспоридий, микроспоридий, саркодовых.

Среди инвазионных болезней рыб протозойные занимают значительное место. Это объясняется тем, что они, как правило, размножаются прямым путем и потому в условиях аквакультуры (плотные посадки, неразнообразный видовой состав рыб и др.) создаются условия, благоприятные для распространения и накопления возбудителей. Чаще среди протозойных регистрируются болезни, вызываемые представителями типов инфузорий (хилодонеллез, ихтиофтириоз, триходиниозы и др., миксоспоридий (вертеж форели, хлоромикоз и др.), споровиков (кокцидиоз) и жгутиковых (ихтиободоз, криптобиоз и др.).

Лабораторные занятия в настоящей главе расположены в порядке систематического положения возбудителей.

### Занятие 38. Жгутиконосцы, паразитирующие у рыб

**Содержание.** Освоение методов сбора, фиксации жгутиконосцев, изготовления временных и постоянных микропрепаратов. Изучение морфологических особенностей жгутиконосцев, определение паразитов.

**Материальное обеспечение.** См. занятие 37, кроме покровного стекла со шлифованным краем, материальной банки для хранения мазков, лимоннокислого натрия, формалина, и дополнительно этиловый спирт (50°-ный, 70°-ный, 90°-ный,

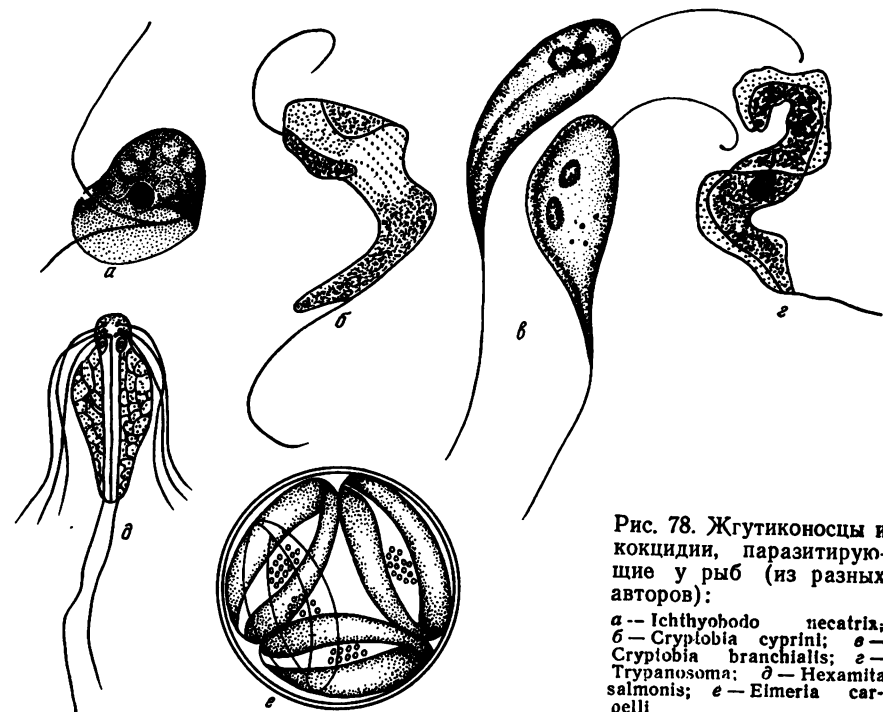


Рис. 78. Жгутиконосцы и кокцидии, паразитирующие у рыб (из разных авторов):

а — *Ichthyobodo necatrix*;  
 б — *Cryptobia cyprini*; в — *Cryptobia branchialis*; г — *Trypanosoma*; д — *Hexamita salmonis*; е — *Eimeria carpelli*

96°-ный, абсолютный, йодированный 70°-ный), метиловый спирт или смесь равных частей этилового спирта и эфира (смесь Никифорова), ксилол, 3%-ный раствор железоаммонийных квасцов, насыщенный раствор пикриновой кислоты, раствор азур-эозин по Романовскому, канадский бальзам, дистиллированная вода, рисовальный аппарат, столик к аппарату, листы белой бумаги, фиксированные мазки, лабораторная коллекция микропрепаратов жгутиконосцев, живая рыба, определители паразитов рыб.

**Организация и проведение работы.** Из типа жгутиковых (*Mastigophora*) у рыб паразитируют представители нескольких родов: *Ichthyobodo*, *Cryptobia*, *Trypanosoma*. *Hexamita* (рис. 78). Это мелкие паразиты длиной от 5 до 70 мкм, передвигающиеся с помощью 1, 2, 4, 8 и более жгутиков. Форма тела удлинённая овальная, благодаря наличию пелликулы (уплотнённая эктоплазма) постоянная. В цитоплазме расположены отдельные органеллы (ядро, вакуоли, блефаропласт, центросома и др.), выполняющие различные функции. Питаются жгутиконосцы всей поверхностью тела, пища переваривается в пищеварительных вакуолях.

Размножение у большинства жгутиконосцев бесполое путем продольного деления надвое (*Ichthyobodo*, *Hexamita*, эктопаразитические *Cryptobia*), иногда почкованием; у отдельных видов отмечается и половой процесс. С наступлением неблагоприятных условий паразиты образуют цисты покоя, в течение длительного времени сохраняющиеся в воде. Развитие кровяных жгутиконосцев (роды *Cryptobia*, *Trypanosoma*) происходит со сменой хозяев — рыб и пиявок, причем в кишечнике пиявок жгутиконосцы размножаются и проходят определенные стадии развития.

У рыб жгутиконосцы паразитируют на поверхности тела и жабр, в крови и кишечнике, мочевом и желчном пузырях, полости тела. Распространены паразиты повсеместно.

Порядок проведения работы следующий.

1. Сбор материала (см. занятие 37). Делают соскобы с поверхности тела, ротовой полости и носовых ямок, помещают их на отдельные покровные стекла, добавляют 1—2 капли воды. Готовят мазок крови, как указано в занятии 6. Мазок подсушивают, накрыв чашкой Петри. Каплю крови помещают на предметное стекло и накрывают его покровным стеклом.

Выделяют жаберные дуги, делают соскоб на стекле для вскрытия и добавляют несколько капель воды. Вскрывают рыбу с соблюдением требований, изложенных в занятии 37. Извлекают и вскрывают кишечник. Делают клячпрепараты и соскобы с внутренней стенки кишечника. Соскобы помещают на предметное стекло, добавляют одну-две капли воды. Извлекают желчный и мочевой пузыри, вскрывают их и содержимое помещают на предметное стекло, пипеткой берут каплю жидкости из брюшной полости, помещают на предметное стекло и накрывают покровным. Готовят мазок крови, как указано в занятии 6.

2. Изучение живых паразитов. Соскоб с поверхности тела просматривают под увеличением микроскопа 7×40. При обнаружении паразитов соскоб покрывают покровным стеклом. Подсчиты-

вают количество жгутиконосцев в 25 полях зрения микроскопа с определением средней величины, указав минимальное и максимальное количество паразитов в поле зрения. Данные подсчета записывают в тетрадь. Рассматривают отдельных паразитов, зарисовывают их общий вид. Таким же образом изучают соскобы с ротовой полости, носовых ямок, жабр, кишечника, мочевого и желчного пузырей, брюшной полости, а также каплю крови.

На поверхности тела можно обнаружить представителей рода *Ichthyobodo*. Отличительной особенностью ихтиободо являются небольшие размеры тела по сравнению с инфузориями и другими эктопаразитами. Цитоплазма у этих паразитов светлая, мало отличается от слизистых и эпителиальных клеток. В центре тела заметно маленькое ядро, форма тела овальная с небольшой выемкой. Паразиты передвигаются, переваливаясь с боку на бок, или вращаясь вокруг продольной оси. У слабодвигающихся паразитов заметны два длинных жгутика.

На жабрах кроме ихтиободо можно обнаружить криптобий, паразитов удлинённой формы, с несколько расширенным на переднем и заостренным на заднем конце телом, с двумя жгутиками на противоположных концах.

В переднем отделе кишечника, желчном пузыре лососевых рыб часто паразитирует *Hexamita salmonis* — очень подвижный паразит (см. рис. 78) с характерным телом грушевидной формы и жгутиками.

В крови встречаются жгутиконосцы (роды *Cryptobia*, *Tytrapa-soma*), имеющие удлинённую форму тела с одним или двумя жгутиками, расположенными на противоположных концах тела, паразиты подвижные в отличие от форменных элементов крови.

3. Приготовление постоянных препаратов. Готовят мазки из соскобов с поверхности тела, жабр, носовых ямок, ротовой полости, для чего покровное стекло слегка прижимают к предметному и сдвигают с него. Полученные мазки слегка подсушивают на воздухе, опускают слизью вниз в бюксу с жидкостью Шаудина и выдерживают в течение 15—20 мин. Мазки с помощью пинцета промывают в 70°-ном спирте, вынимая и опуская по несколько раз, затем помещают в йодированный спирт на 20—30 мин для удаления остатков сулемы. После йодирования мазки снова промывают в 70°-ном спирте. Приготовленные таким способом мазки могут сохраняться в течение длительного времени в 70°-ном спирте в стеклянных цилиндрах с притертыми пробками. Диаметр таких цилиндров должен быть несколько больше диаметра покровного стекла. Стекла кладут мазком вниз и отделяют друг от друга вырезанными из плотной бумаги кружочками. Стекла каждой пробы отделяют кружочками, на которых тушью или карандашом (простым) пишут этикетку.

Для приготовления препаратов мазки из 70°-ного спирта вынимают и промывают в дистиллированной воде в течение 3—5 мин. Промытые мазки помещают для протравливания в 3%-ный раствор железоаммонийных квасцов на 12—24 ч. Затем промывают водой в

течение нескольких минут и помещают на 12 ч для окраски в железный гематоксилин, после окраски споласкивают мазки проточной водопроводной водой.

Хорошо окрашенные мазки имеют темно-синюю или почти черную окраску (рыжеватый цвет свидетельствует о плохом качестве красителя). Отмытые мазки помещают на дифференцировку в 1,5%-ный раствор железоаммонийных квасцов, контролируя процесс под микроскопом. На хорошо отдифференцированных препаратах ядра жгутиконосцев светло-синего цвета, цитоплазма прозрачная. Если препарат передифференцирован, цвет его бледно-коричневый. Для удаления рыжей окраски мазки помещают в аммиачную воду на 3—5 мин. Дифференцировку можно проводить и раствором пикриновой кислоты, для чего перед употреблением насыщенный раствор пикриновой кислоты следует развести дистиллированной водой в соотношении 1:1. Следует отметить, что в пикриновой кислоте мазки дифференцируются значительно медленнее, чем в железоаммонийных квасцах, однако получаются более четкие очертания ядерного аппарата. Дифференцировка длится от нескольких минут до нескольких часов. Этот процесс можно прервать, поместив мазок в дистиллированную воду, а затем снова продолжить. Хорошо отдифференцированные мазки промывают в проточной водопроводной воде в течение 2 ч. Затем мазки обезживают, поочередно выдерживая по 3—5 мин в спиртах возрастающей концентрации: 50°-ном, 70°-ном, 90°-ном, 96°-ном, абсолютном и в ксилоле.

На чистое обезжиренное предметное стекло препаративной иглой наносят 1—2 капли канадского бальзама. К краю бальзама осторожно приближают покровное стекло с мазком и, придерживая один конец иглой, медленно опускают его на бальзам. Тыльной стороной препаративной иглы придают мазок к стеклу так, чтобы слой бальзама был небольшим. Бальзама должно быть достаточно, чтобы между покровными и предметными стеклами не было пузырьков воздуха, и не так много, чтобы он растекался по предметному стеклу вокруг покровного. Если бальзама мало и между стеклами большое воздушное пространство, дополнительно наносят каплю бальзама на предметное стекло у того края покровного стекла, где имеется воздух: бальзам вытеснит его. Выступивший за край покровного стекла бальзам осторожно убирают кусочком свернутой марли, смоченной в ксилоле. Покровное стекло с мазком следует придерживать, чтобы оно не сдвинулось с места.

Готовый препарат просматривают под микроскопом для того, чтобы выявить ошибки, допущенные при его изготовлении. Наличие в препарате мелких пузырьков воздуха свидетельствует о том, что покровное стекло опускали недостаточно медленно и осторожно. При обнаружении в препарате каких-либо волокон следует проверить чистоту стекол. Установив причину загрязнения препарата, ее необходимо устранить и лишь после этого обрабатывать следующие мазки.

На свободный конец предметного стекла наклеить этикетку с указанием вида и возраста рыбы, органа, места вылова и другими данными. Таким же способом изготавливают постоянные микропрепараты из жгутиконосцев, снятых с ротовой полости, обонятельных ямок, жабр, кишечника и других органов.

С кровепаразитами поступают следующим образом. Подсушенный на воздухе мазок крови фиксируют в метиловом спирте в течение 4—5 мин или в смеси Никифорова в течение 20—25 мин. Фиксированные мазки можно сохранять неокрашенными в течение 1 мес, предохраняя их от загрязнения. Мазки, зафиксированные одним из этих способов, окрашивают краской Романовского в течение 20—30 мин. При использовании готовой краски Романовского необходимо проверить ее качество, окрасив несколько препаратов и проверив их под микроскопом. Если препараты плохо окрашены, их докрасивают в течение 5—10 мин. После окрашивания мазки промывают в воде, а затем высушивают, поместив на фильтровальную бумагу. Хорошо покрашенный и отмытый мазок имеет красноватый оттенок. Окрашенные препараты рассматривают под большим увеличением микроскопа (7×40). Жгутиконосцев следует искать в местах наименьшего скопления форменных элементов. На окрашенных препаратах жгутиконосцы имеют вид удлиненных телец несколько большего размера, чем эритроциты. У *Tyranosoma* хорошо заметен один жгутик, расположенный на одном из концов тела, у *Spirytobia* их два — по одному на каждом конце.

4. Определение паразитов. Изготовленные или уже готовые препараты помещают под микроскоп и изучают под масляной иммерсией (7÷10×90). Рассматривают и зарисовывают расположение ядерного аппарата, жгутиков и других органелл. Измеряют длину и ширину паразитов, ядерного аппарата. С помощью определителя выясняют видовую принадлежность жгутиконосцев и делают надпись на этикетке препарата. Результаты работы оформляют в тетради для лабораторных занятий.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 7, 9, 36, 37]

1. Какие роды жгутиконосцев паразитируют у рыб?
2. На каких участках тела паразитируют жгутиконосцы?
3. Как размножаются жгутиконосцы?
4. Как устроены жгутиконосцы?
5. По каким признакам различают жгутиконосцев?
6. Как зафиксировать мазки для изучения ядерного аппарата?
7. Как зафиксировать кровяных жгутиконосцев?
8. Каким способом окрашивают кровяных жгутиконосцев? Какие необходимо иметь для этого реактивы?
9. Какие реактивы необходимы для изготовления гематоксилиновых микропрепаратов?
10. В какой очередности обрабатывают мазки для изучения ядерного аппарата?
11. В чем проводится дифференцировка препаратов?
12. С какой целью мазки проводят поочередно через спирты различной концентрации? Почему в таком порядке, а не наоборот?
13. Что свидетельствует о хорошем качестве изготовленных препаратов?

## Занятие 39. Кокцидии и гемогрегарины, паразитирующие у рыб

**Содержание.** Освоение методов сбора и фиксации паразитов, изготовления временных и постоянных микропрепаратов. Изучение морфологических особенностей и систематического состава кокцидий, паразитирующих у рыб.

**Материальное обеспечение.** См. занятие 37, кроме покровного стекла со шлифованным краем, материальной банки для хранения мазков, лимоннокислого натрия, метилового спирта, формалина, жидкости Шаудина, и дополнительно окуляр- и объективмикротметры, готовый раствор Май-Грюнвальда, краска Романовского, забуференный раствор дистиллированной воды; рисовальный аппарат, столик к рисовальному аппарату, листы белой бумаги, живая рыба, определители паразитов.

**Организация и проведение работы.** Из типа споровиков у рыб паразитируют кокцидии (рода *Eimeria*) и гемогрегарины (рода *Haemogregarina*). Эпизоотологическое значение имеют внутриклеточные паразиты — кокцидии. Взрослые вегетативные стадии (трофозоиты) имеют овальную форму, одно ядро. Ооцисты кокцидий рода *Eimeria* имеют округлую форму, окружены оболочкой, диаметр около 10—15 мкм у пресноводных видов и несколько больше у морских. Внутри ооцисты насчитывают 4 споры, в каждой из которых находится по два спорозоида (см. рис. 78). Кокцидии паразитируют внутри эпителиальных клеток кишечника, печени, почек, половых желез, плавательного пузыря и других органов. Систематика кокцидий основана на размерах и строении ооцисты.

Жизненный цикл кокцидий протекает без смены хозяев, но с чередованием поколений: бесполого (шизогония) и полового (гаметогония). Из заглоченной рыбой ооцисты выходят спорозоиты, которые внедряются в клетки эпителия кишечника, растут в них, превращаясь в шизонта. Ядро шизонта делится, он становится многоядерным и распадается на мелкие продолговатые клетки — мерозоиты. Мерозоиты внедряются в новые эпителиальные клетки, давая начало второму поколению шизонтов. Процесс бесполого размножения неоднократно повторяется. Некоторая часть мерозонтов, внедрившись в клетки, не образует шизонта, а дает начало половым клеткам: женским — макрогаметам и мужским — микрогаметам (удлиненным клеткам с двумя жгутиками на переднем конце). Микрогаметы подвижны: они отыскивают макрогамету, сливаются с ней и образуют зиготу, которая обрастает плотной оболочкой и превращается в ооцисту. Ядро ооцисты делится на четыре части, из которых образуются споры и спорозоиты. Процесс спорогонии кокцидий рыб в отличие от паразитов наземных животных происходит в хозяине. Из кишечника рыбы вместе с экскрементами ооцисты выводятся наружу и длительное время находятся в состоянии покоя во внешней среде, пока не будут заглочены рыбой.

У рыб паразитируют кокцидии только одного рода — *Eimeria*.

Заболевания вызывают у прудовых рыб (карпа и растительноядных) виды *E. cyprini*, *E. cheni*, *E. sinensis*. Описан кокцидиоз семенников морских рыб — сельдей, салаки и др.

Гемогрегарины паразитируют в крови пресноводных, реже морских рыб. Их строение и систематика изучены слабо. Развитие в отличие от кокцидий происходит со сменой хозяев — рыб и пиявок.

Порядок проведения работы следующий.

Рыбу обездвиживают (см. занятие 3). Одним из описанных способов (см. занятие 6) берут кровь и на обезжиренном предметном стекле готовят мазок (во избежание загрязнения его накрывают чашкой Петри). Вскрывают рыбу. С помощью пинцета отделяют селезенку и почки. Скальпелем разрезают селезенку на кусочки. Один из них берут пинцетом, прикасаются к чистой фильтровальной бумаге для удаления излишней крови и делают отпечатки, касаясь кусочком селезенки предметного стекла. Аналогичным способом делают отпечатки из почек для обнаружения гемогрегарин (во избежание загрязнения отпечатки накрывают чашкой Петри). Извлекают кишечник, отделяют от остальных внутренних органов, затем вскрывают его и содержимое помещают на предметное стекло или стекло для вскрытия, добавляют несколько капель воды. Далее делают соскоб с внутренней стенки кишечника, помещают его на предметное стекло, добавляют 1—2 капли воды и накрывают покровным стеклом. Подсушенные мазки крови и отпечатки внутренних органов окрашивают по Паппенгейму (см. занятие 3). Окрашенные мазки и отпечатки просматривают под масляной иммерсией микроскопа. Зарисовывают гемогрегарин. Содержимое кишечника накрывают покровным стеклом и просматривают под малым увеличением микроскопа. При обнаружении цист кокцидий их выделяют с помощью препаровальных игл и пипетки, помещают на предметное стекло. Препаровальными иглами разрушают оболочку, накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом. Зарисовывают строение ооцисты и спор.

Ооцисты кокцидий не окрашивают, так как способ приготовления постоянных микропрепаратов не разработан. Поэтому изучение и зарисовку ооцист проводят на нативном материале. При необходимости изучения патогенного воздействия кокцидий готовят гистологические препараты.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 7, 9, 36, 37]

1. В каких органах паразитируют споровики?
2. Как устроены кокцидии?
3. Какие роды споровиков паразитируют у рыб?
4. В чем состоит видовое различие кокцидий?
5. Как размножаются кокцидии? Какая стадия развития наиболее опасна для рыб?
6. Чем различаются жизненные циклы кокцидий и гемогрегарин?
7. Как готовятся постоянные препараты из гемогрегарин?
8. Какие необходимы фиксаторы и красители для изготовления препаратов гемогрегарин?

### Занятие 40. Микоспоридии, паразитирующие у рыб

**Содержание.** Освоение методов сбора микоспоридий, приготовления временных и постоянных микропрепаратов. Изучение морфологических особенностей и систематического состава микоспоридий.

**Материальное обеспечение.** См. занятие 37, кроме покровного стекла со шлифованным краем, лимоннокислого натрия, этилового и метилового спирта, формалина, жидкости Шаудина, и дополнительно окуляр- и объективометры, рисовальный аппарат, столик к рисовальному аппарату, листы белой бумаги, глицерин-желатин, микропрепараты различных видов микоспоридий, живая рыба, определители паразитов.

**Организация и проведение работы.** Класс микоспоридий (*Mycosporidia*), или слизистых споровиков, относится к типу книдоспоридий. Они чрезвычайно широко распространены среди пресноводных и морских рыб, локализуются в любых органах и тканях. Некоторые микоспоридии патогенны и при определенных условиях вызывают заболевания рыб (миксосомоз, сфероспороз и др.). У рыб встречаются вегетативные стадии и споры микоспоридий. Вегетативные формы полостных микоспоридий представляют собой разнообразной величины и формы подвижные амебиды. Тканевые микоспоридии чаще встречаются в виде овальных неподвижных образований, окруженных оболочкой, — цист, достигающих величины горошины или даже ореха, хотя обычный их размер 1—2 мм.

Размножаются микоспоридии чаще всего бесполом путем. Сначала увеличивается число ядер, затем происходит деление цитоплазмы и ее отпочкование, в дальнейшем формируются споры. У мелких полостных микоспоридий образуются 2—4 споры. В крупных тканевых плазмодиях число спор достигает сотен и даже тысяч.

Зрелые споры микоспоридий построены по единому плану, но каждый вид имеет отличающие его особенности (рис. 79). Снаружи они имеют плотную оболочку, состоящую из двух или нескольких створок, соединенных друг с другом швом и шовным валиком. Форма створок различна. Кроме того, створки снаружи могут иметь отростки разной длины и конфигурации. Внутри створок в задней части споры расположены амебидный зародыш с ядрами и йодофильная вакуоль. В переднем или противоположных концах споры помещены две и более полярные капсулы, в которых расположена скрученная спиральная стрекательная нить, впереди полярных капсул находится интеркапсулярный отросток. Споры попадают в воду после разрыва цист, находящихся на коже, жабрах, через кишечник, желчный и мочевой пузыри, а в некоторых случаях только после смерти хозяина, например споры *Mycosoma cerebralis* — возбудителя вертежа, локализующегося в хрящевой ткани рыб. После заглатывания споры рыбой стрекательные нити с силой выбрасываются и внедряются в стенки кишечника, где спора закрепляется. Затем створки споры раскрываются по линии шва. Амебидный зародыш выходит из споры и внедряется в ткань хозяина, далее он попадает в кровеносную или лимфатическую

системы и заносится током крови или лимфы в тот орган, в котором данный вид микоспоридий паразитирует.

Микоспоридии с двустворчатыми спорами объединены в отряд Bivalvulea, с многостворчатыми спорами — в отряд Multivalvulea.

У пресноводных рыб, как правило, паразитируют двустворчатые, среди которых наиболее распространены роды Muxidium, Sphaerospora, Chloromuxum, Muxobolus, Muxosoma, Henneguaya и др. У морских рыб часто отмечают многостворчатых микоспоридий рода Kudoa. Строение спор и их размеры являются систематическим признаком при определении вида микоспоридий.

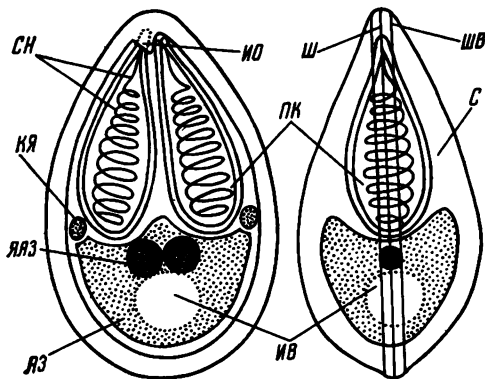


Рис. 79. Схема строения спор Muxosporidia (из Шульмана, 1966):

АЗ — амебидный зародыш; ИВ — йодофильная вакуоль; ИО — интеркапсулярный отросток; КЯ — капсулогенные ядра; ПК — полярные капсулы; С — створки; СН — стрекательная нить; Ш — шов; ШВ — шовный валик; ЯАЗ — ядра амебидного зародыша

Порядок проведения работы следующий.

1. Сбор материала. Живую рыбу обездвиживают и помещают в кювету с небольшим количеством воды. Внимательно осматривают поверхность тела и плавников. В некоторых случаях на поверхности тела заметны светлые бугорки — цисты, содержащие споры слизистых споровиков. При обнаружении цист их осторожно снимают с помощью препаровальных игл. Выделенные цисты помещают на чистое покровное стекло. Во избежание высыхания цист к ним добавляют 1—2 капли воды. Для предотвращения загрязнения цист их накрывают чашкой Петри, причем под нее помещают временную этикетку, чтобы избежать путаницы и недоразумений во время обработки патологического материала. Измеряют длину рыбы, определяют ее массу, берут материал для определения возраста рыбы, если он заранее не известен.

Выделяют жаберные дуги, помещают на предметное стекло и внимательно рассматривают визуально, а затем под МБС. При обнаружении цист их выделяют и помещают на покровное стекло, добавив воды и выполнив те же требования, какие указаны в начале п. 1. На жаберных лепестках карповых рыб встречаются цисты микоспоридий из рода Muxobolus, у щуки — из рода Henneguaya. Рыбу вскрывают (см. занятие 37), внимательно осматривают поверхность внутренних органов и стенок брюшной полости.

Затем осматривают и исследуют все внутренние органы. При обнаружении цист их выделяют, помещают на отдельные покровные стекла из каждого внутреннего органа. Особенно осторожно

обращаются с мочевым и желчным пузырями. В этих органах паразитируют соответственно микроспоридии из родов *Muxidium* и *Chloromuxum*.

2. Изучение живых паразитов. Желчный и мочевой пузыри помещают каждый отдельно на стекла для вскрытия (можно предметные), разрезают ножницами. Вылившееся из пузырей содержимое покрывают покровным стеклом и рассматривают под малым, а затем под большим увеличением микроскопа. С внутренней стороны пузырей делают соскоб, накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом. В содержимом пузырей и соскобах можно обнаружить амебоидные зародыши и споры микроспоридий. При исследовании желчного пузыря обращают внимание на желчный проток, где можно обнаружить споры и вегетативные стадии паразитов. Остальные внутренние органы и мышцы исследуют компрессионным способом, взяв для этого небольшой кусочек.

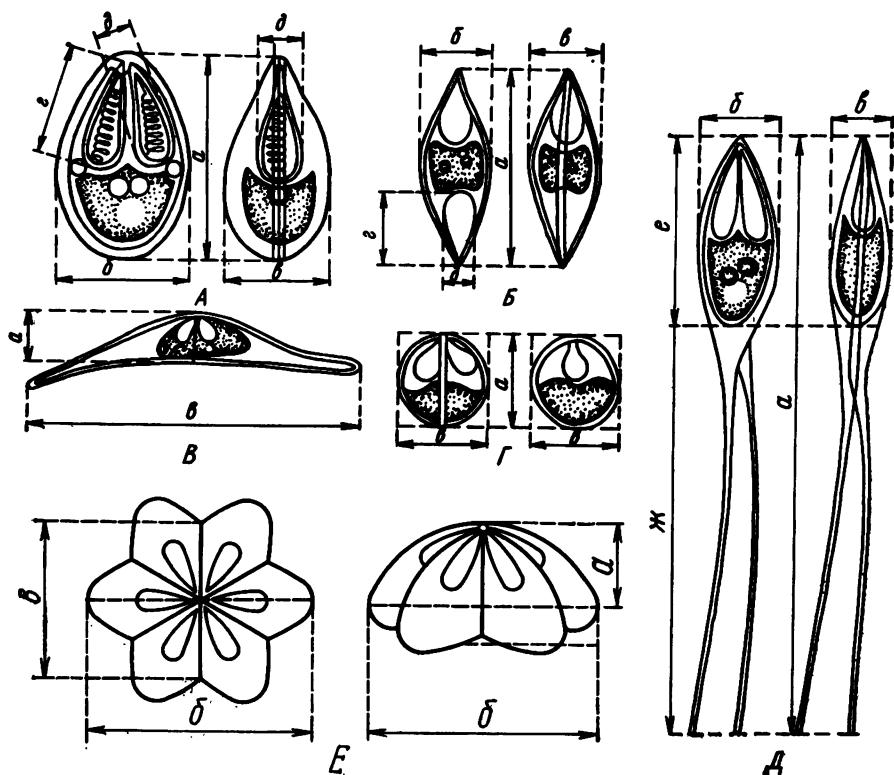


Рис. 80. Схема измерения спор микроспоридий родов:

*Muxobolus*, *Muxosoma*, *Hofferellus*, *Thelohanellus* (A); *Muxidium*, *Sphaeromyxa*, *Zschokkella*, *Neomuxobolus*; *Muxosoma* (B); B — *Ceratomyxa*, *Leptotheca* (B); *Sphaerospora*, *Chloromuxum* (Г); *Hennequya*, *Phlogospora*, *Agarella*, *Neogennequya*, отчасти *Muxobolatus* (Д); *Kudoa*; *Hexacarsula* (E); (из Шульмана, 1966); а — длина споры; б — ширина споры; в — толщина споры; г — длина полярной капсулы; д — диаметр полярной капсулы; е — расстояние от переднего конца споры до конца ее полости; ж — длина хвостовых отростков

Споры микоспоридий очень мелкие, поэтому их можно рассмотреть только с помощью иммерсионного объектива. При обнаружении спор зарисовывают их строение, измеряют длину, ширину, толщину и другие параметры (рис. 80). Данные измерений оформляют в тетради. Обращают внимание на наличие отростков или исчерченности поверхности створок спор.

3. Изготовление постоянных препаратов. Наиболее часто в последние годы практикуется изготовление глицерин-желатиновых препаратов из микоспоридий. Из ткани исследуемого органа делают мазок на предметном стекле и при обнаружении вегетативных стадий или спор паразитов мазки заключают в глицерин-желатин. Для этого с предметного стекла аккуратно снимают покровное стекло и откладывают в сторону мазком вверх. Когда мазки подсохнут, на кончике скальпеля берут кусочек глицерин-желатина и нагревают над пламенем спиртовки до расплавления. На слегка подсушенный мазок наносят 1—2 капли глицерин-желатина. К краю капли осторожно приближают снятое ранее покровное стекло и медленно, придерживая его препаровальной иглой, опускают на глицерин-желатин. Следят за тем, чтобы под стеклом не оставалось пузырьков воздуха. Чтобы уменьшить слой глицерин-желатина, тыльной стороной препаровальной иглы придавливают покровное стекло к предметному. Для длительного хранения препарата во избежание его высыхания по краям покровного стек-

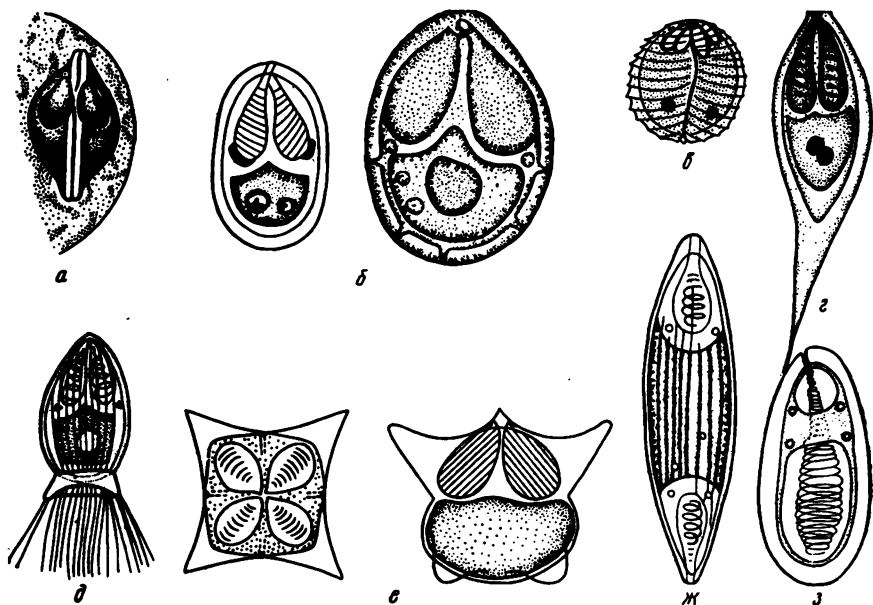


Рис. 81. Миксо- и микроспоридии, паразитирующие у рыб (из разных авторов):

а — Myxosoma; б — Myxobolus; в — Chloromyxum; г — Henneguya; д — Hofferellus; е — Kudoa; ж — Myxidium; з — Glugea

ла с помощью деревянной палочки наносят слой асфальтового лака или воска с канифолью (можно использовать кедровый или канадский бальзам).

4. Определение паразитов. Изготовленные (имеющиеся в наличии) препараты изучают под масляной иммерсией микроскопа, лучше в фазово-контрастном свете. Рассматривают, измеряют и зарисовывают строение спор отдельных микроспоридий (рис. 81). С помощью определителя выясняют видовую принадлежность микроспоридий и делают надпись на этикетке препарата. Обращают внимание на строение спор, створок, взаимное расположение стрекательных капсул, особенно их концов. Существенное значение в видовом определении микроспоридий имеет строение интеркапсулярного отростка.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 7, 9, 36, 37, 47]

1. В каких органах рыб паразитируют микроспоридии?
2. В чем состоит отличие тканевых и полостных микроспоридий?
3. Как размножаются слизистые споровики?
4. Каким образом происходит расселение микроспоридий?
5. Чем отличаются различные виды микроспоридий?
6. Как устроена спора микроспоридий?
7. Для какой цели существуют стрекательные капсулы?
8. В каком порядке следует начинать исследование внутренних органов? Почему?
9. Какими способами готовят постоянные микропрепараты из микроспоридий?

### З а н я т и е 41. Микроспоридии, паразитирующие у рыб

**Содержание.** Освоение методов сбора микроспоридий, приготовление временных и постоянных микропрепаратов. Изучение морфологических особенностей и систематического состава микроспоридий.

**Материальное обеспечение.** См. занятие 37, кроме покровного стекла со шлифованным краем, лимоннокислого натрия, формалина, жидкости Шаудина, и дополнительно окуляр- и объектмикрометры, глицерин-желатин, спирт абсолютный метиловый, азур-эозин по Романовскому, дистиллированная вода, микропрепараты различных видов микроспоридий, живая рыба, определителя паразитов.

**Организация и проведение работы.** Микроспоридии по своему строению и развитию значительно отличаются от микроспоридий и выделены в самостоятельный тип *Microsporidia*. Споры одноклеточного происхождения, со сплошной оболочкой и 1—2 ядерными зародышами, выбрасываемыми через полость полярной трубки в клетку хозяина. Вегетативные стадии с однопипными ядрами. Митохондрии отсутствуют. Микроспоридии — внутриклеточные облигатные паразиты с чрезвычайно широким кругом хозяев — от простейших до позвоночных, включая млекопитающих. Микроспоридии наиболее часто встречаются у членистоногих.

Микроспоридии — одни из самых мелких паразитических простейших. Длина спор большинства видов от 3 до 8 мкм. Споры микроспоридий, паразитирующих у рыб, морфологически однородны: овальной, удлинненно-овальной или грушевидной формы, с гладкой оболочкой (рис. 82). У живых спор обычно хорошо видна толь-

ко задняя вакуоль. В кишечнике хозяина под воздействием пищеварительного сока спора выбрасывает полярную трубку, через просвет которой амебидный зародыш попадает непосредственно в клетку или межклеточное пространство кишечника, минуя контакт с содержимым кишечника. Размножение паразитов происходит по типу шизогонии, на заключительном этапе которой формируются споры. Инвазированные клетки хозяина значительно увеличиваются в размерах и часто видны невооруженным глазом в виде белых цисточек на жабрах, плавниках, под кожей, на слизистой кишечника и в других органах.

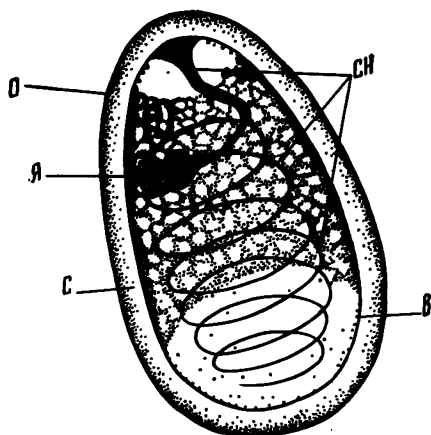


Рис. 82. Схема строения спор *Myxosporidia* (из Быховского, 1962):

В — вакуоль; О — оболочка; С — спороплазма; СН — стрекательная нить; Я — ядро

Особенности спорогонии, размер и форма живых спор, длина полярной нити являются систематическими признаками. Они существенно изменяются в фиксирующих жидкостях, поэтому для полного изучения микроспоридий необходимо проводить изучение как живого, так и фиксированного материала. У пресноводных и морских рыб паразитируют в основном представители родов *Glugea*, *Nosema*, *Pleistophora*, *Cocconeia*.

Порядок проведения работы следующий.

Изучение микроспоридий состоит из двух этапов: сбора материала в полевых условиях и изучения его в лабораторных условиях. При изготовлении мазков и фиксации материала используют в основном живых зараженных животных. В погибших особях стадии развития микроспоридий разрушаются и остаются неизменными только споры.

В полевых условиях готовят водные препараты и мазки. Водные препараты служат для сохранения живых спор паразитов в течение длительного времени. Готовят их следующим образом. Кусочки исследуемой ткани любого органа тщательно измельчают и смешивают с водой. Крупные остатки ткани удаляют, а суспензию спор помещают во флакончик с водой или физиологическим раствором. Затем каплю суспензии спор помещают на предметное стекло и осторожно накрывают покровным. После испарения излишков воды, не допуская появления пузырьков воздуха, края покровного стекла обводят расплавленным глицерин-желатином. Хранят такие препараты в зависимости от качества замазки от нескольких месяцев до одного года. Приготовленные водные препараты

изучают под микроскопом: измеряют не менее 25 спор и зарисовывают их.

Чтобы избежать неточностей при зарисовке спор и надолго сохранить их изображение, споры фотографируют. Для этого на предметное стекло наносят слой 1,5%-ного агар-агара, на него помещают каплю водной суспензии спор и накрывают покровным стеклом. Споры микроспоридий прикрепляются к агар-агару, чем устраняется броуновское движение, которое служит серьезным препятствием при фотографировании. Чтобы предохранить препарат от высыхания, края покровного стекла обмазывают расплавленным парафином.

Для фотографирования можно использовать и водные препараты, однако следует помнить, что броуновское движение спор прекращается спустя 5—10 дней после приготовления препарата.

Для выявления слизистых капсул следует приготовить тушевые препараты. Тушь обладает фиксирующими свойствами для спор микроспоридий, и препараты могут сохраняться в течение длительного времени. На чистое предметное стекло наносят каплю суспензии спор и рядом помещают такую же каплю черной туши. Обе капли перемешивают и накрывают покровным стеклом. Через 1—2 ч препарат можно исследовать под микроскопом. Слизистые капсулы имеют вид светлого ореола вокруг споры или их групп.

Чтобы вызвать выброс полярной нити, к водной суспензии спор следует добавить 4—10%-ную перекись водорода или надавить на покровное стекло тыльной стороной препаровальной иглы. В водных и тушевых препаратах споры большинства видов микроспоридий выбрасывают нить самопроизвольно. В пузырьках воздуха нити очень контрастны, и их легко можно измерить. Нити хорошо видны в темном поле и при фазово-контрастной микроскопии.

Для изучения жизненного цикла необходимо изготовить мазки. После приготовления мазков и подсыхания крупных капель воды влажные мазки фиксируют в абсолютном метиловом спирте (метаноле) в течение 1—2 мин. Затем мазки окрашивают краской Романовского. Чем быстрее после фиксации будут окрашены мазки, тем контрастнее они получаются. Зафиксированные мазки помещают в 2%-ный раствор красителя на 2 ч или в 0,5%-ный раствор на 12 ч и более. Если мазки окрасились плохо или обесцветились после длительного хранения, их можно покрасить снова. Такие мазки предельно выдерживают до полного обесцвечивания в 70°-ном подкисленном соляной кислотой спирте, промывают в проточной воде и затем снова окрашивают вышеописанным методом.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 7, 9, 36, 37, 47]

1. В чем заключается отличие микроспоридий от миксоспоридий?
2. Как изучают живые споры микроспоридий?
3. Как окрасить споры микроспоридий?
4. Для чего нужно выявлять слизистые капсулы и как это делается?
5. Как готовят мазки из микроспоридий?
6. Как приготовить водные препараты?
7. Каким образом приготовить препараты для фотографирования?

## Занятие 42. Инфузории, паразитирующие у рыб

**Содержание.** Изучение морфологических особенностей и систематического состава паразитических инфузорий. Методы приготовления временных и постоянных микропрепаратов. Определение паразитов.

**Материальное обеспечение.** См. занятие 37, кроме стекла со шлифованным краем, лимоннокислого натрия, метилового спирта, формалина, и дополнительного окуляр- и объектмикрометры, ртутно-кварцевая лампа, жидкость Шаудина, 2%-ный раствор азотнокислого серебра, спирты этиловый 50°-ный, 70°-ный, 90°-ный, 96°-ный, абсолютный, йодированный 70°-ный, ксилол, 3%-ный раствор железосамонийных квасцов, насыщенный раствор пикриновой кислоты, 2%-ный раствор уксусной кислоты, дистиллированная вода, рисовальный аппарат, столик для аппарата, листы белой бумаги, фиксированные мазки, лабораторная коллекция микропрепаратов инфузорий, живая рыба, определители паразитов рыб.

**Организация и проведение работы.** Из типа ресничных инфузорий (Ciliophora) у рыб паразитируют представители классов Peritricha, Spirotricha, Rimostomata, Curtostomata, Suctoria. Размеры инфузорий обычно 20—80 мкм, и только ихтиофтириус достигает 1—2 мм. Форма тела инфузорий постоянна благодаря наличию оболочки — уплотненного слоя эктоплазмы. В эндоплазме инфузорий находится два (редко больше) ядра — крупное соматическое (макронуклеус) и генеративное (микронуклеус), а также пищеварительные и сократительные вакуоли. У большинства инфузорий есть ротовое отверстие — цистостом, ведущий в глотку, выстланную ресничками или снабженную палочковым аппаратом (хилодонеллы). Органеллами движения служат реснички, покрывающие целиком или частично поверхность тела. Размножение инфузорий происходит на теле рыбы, реже в воде делением пополам или многократно повторяющимся делением надвое (палитомия). У некоторых видов инфузорий отмечается половой процесс. Многие инфузории при наступлении неблагоприятных условий образуют цисты покоя, сохраняющиеся длительное время в водоеме. Цисты образуются и для размножения или перестройки ядерного аппарата. Инфузории паразитируют на поверхности тела рыб, в жабрах, часто встречаются в ротовой полости и обонятельных ямках, мочевом пузыре и очень редко — в пищеварительном тракте. Наиболее распространенными являются инфузории из рода *Chilodonella*, *Trichodina*, *Apiosoma*, *Ichthyophthirius*, *Ambiphrya* (рис. 83). Реже встречаются *Tetrachymena* и *Balantidium*.

1. Сбор материала. Живую рыбу обезвреживают и помещают в кювету. Тыльной стороной остроконечного или глазного скальпеля независимо от размера рыбы делают соскоб с поверхности тела и помещают на покровное или предметное стекло, добавив 1—2 капли воды. Измеряют длину рыбы, определяют ее массу.

Делают соскоб с ротовой полости и носовых ямок, помещают на отдельные покровные или предметные стекла, (если мало слизи, добавляют 1—2 капли воды).

Выделяют жаберные дуги, делают соскоб и добавляют несколько капель воды.

Просматривают все соскобы под МБС: при обнаружении ихтиофтириуса отбирают крупные трофонты, с помощью пипетки поме-

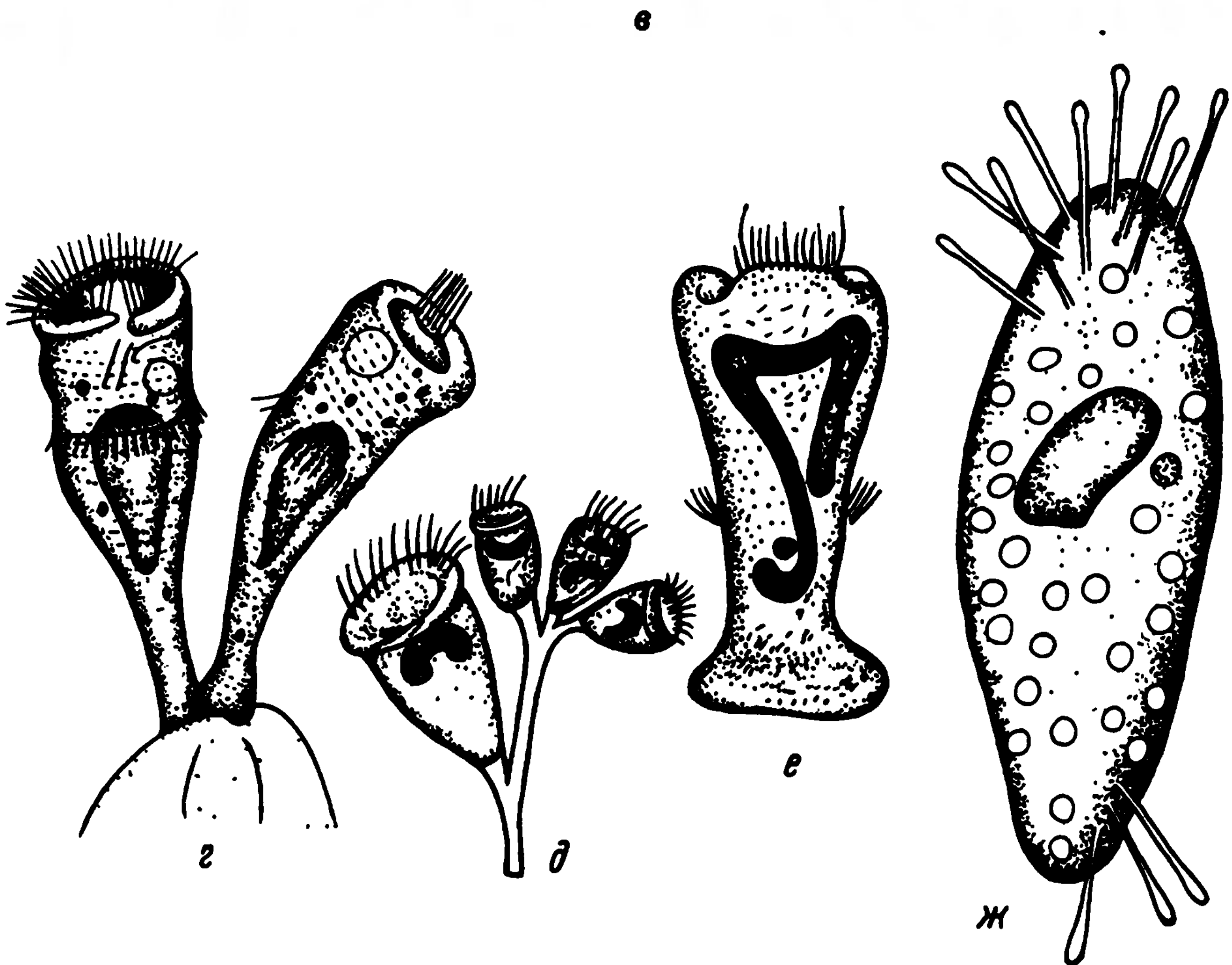
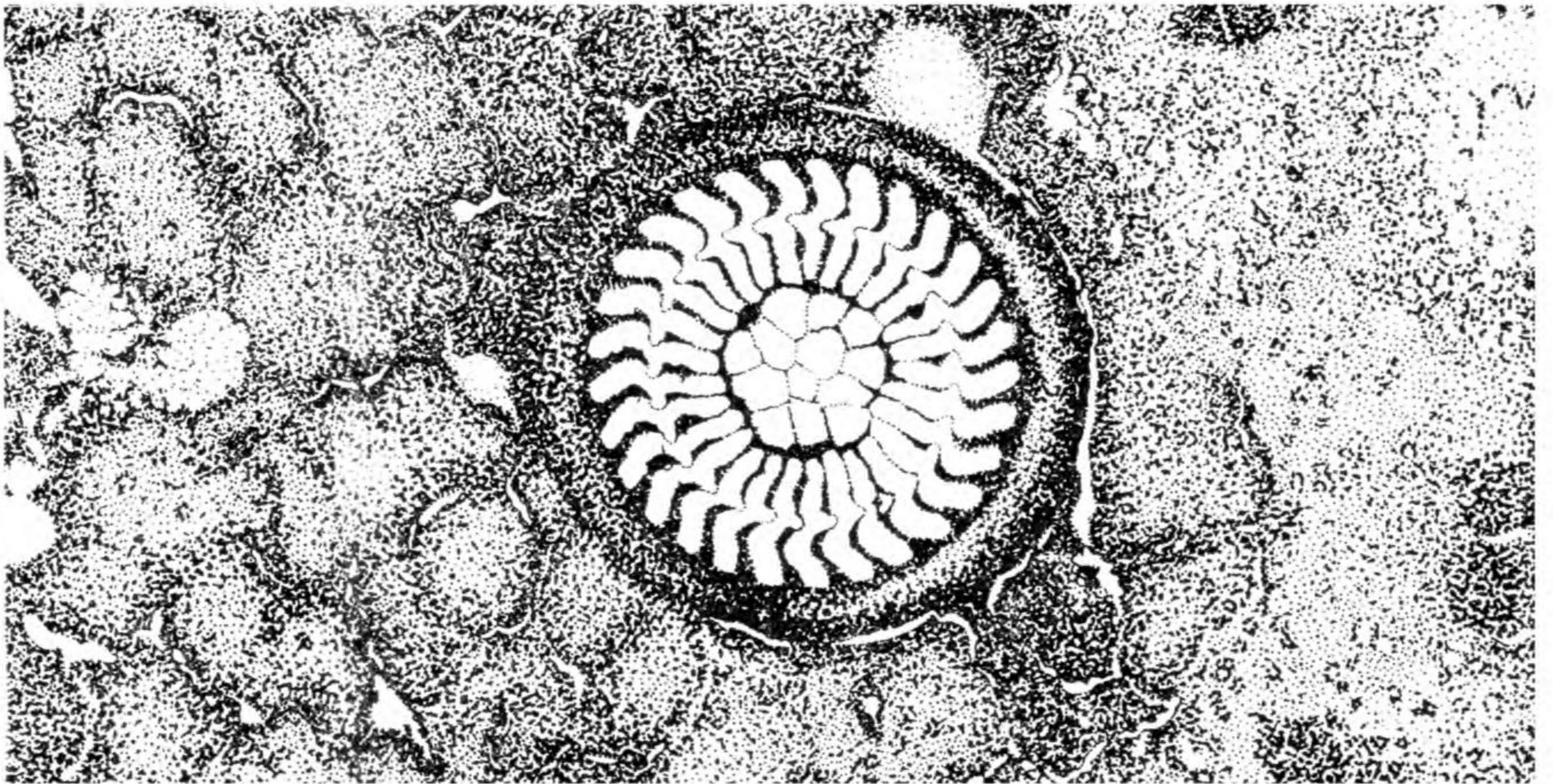
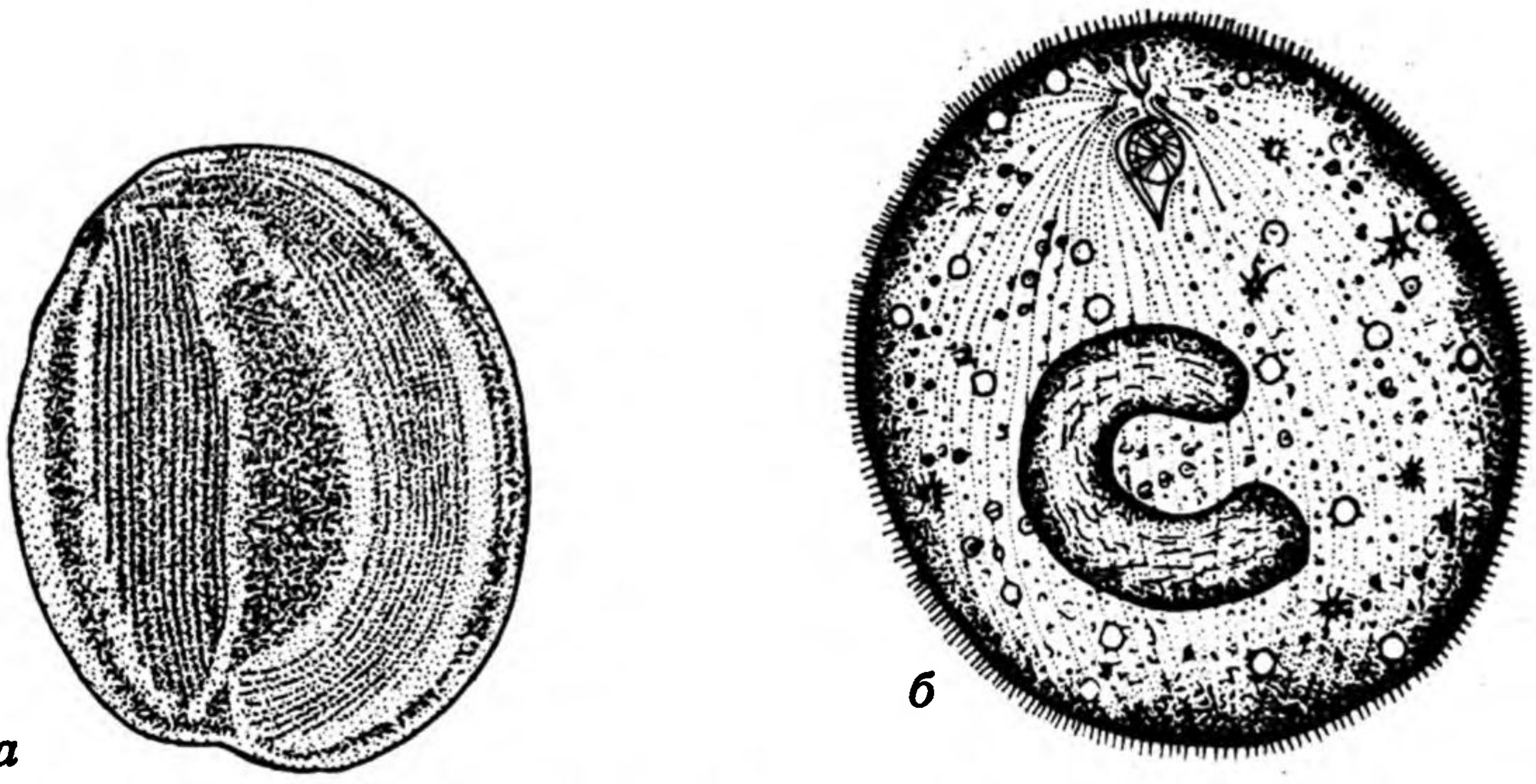


Рис. 83. Инфузории, паразитирующие у рыб (из разных авторов):  
*a* — *Chilodonella cyprini*; *б* — *Ichthyophthirius multifiliis*; *в* — *Trichodina reticulata*; *г* — *Apisoma piscicola*; *д* — *Epistilis lwoffi*; *е* — *Ambiphrya*; *ж* — *Trychophrya*

щают их на чистое предметное стекло, добавив несколько капель воды.

2. Изучение живых паразитов. Соскоб с поверхности тела просматривают под малым увеличением микроскопа (7×9). При обнаружении инфузорий соскоб покрывают покровным стеклом. Прочитывают количество каждого рода инфузорий в 25 полях зрения микроскопа с подсчетом средней величины, указывают минимальное и максимальное количество инфузорий в поле зрения. Данные подсчета записывают в тетрадь. Рассматривают под малым, а затем большим увеличением отдельные инфузории и зарисовывают их общий вид.

При изучении хилодонелл обращают внимание на расположение сократительных вакуолей и их количество. Обычно у хилодонелл имеются две сократительные вакуоли, расположенные наискосок друг от друга, которые наполняются и опорожняются поочередно. Возможно также, что хилодонеллы инцистируются, причем отличить этих особей от вегетативных стадий можно по поведению: вакуоли увеличиваются, края тела загибаются на вентральную сторону, инфузории постоянно вращаются. Со временем скорость вращения увеличивается, вакуоли становятся невидимыми, инфузории приобретают вид шарика с хорошо заметным ядром в центре. Образовавшуюся цисту зарисовывают.

Ихтиофтириус (рис. 83, б) отличается округлой формой тела, поверхность его равномерно покрыта ровными рядами ресничек, находящихся в постоянном движении. В центре тела расположен подковообразный или продолговатый макронуклеус. Цитоплазма инфузорий зернистая и более темная, чем окружающий ее фон, макронуклеус светлый. Цитостом в нативном материале представляет маленький круг, в сотни раз меньший, чем трофант, окруженный ресничками, которые находятся в постоянном движении.

Для триходины (рис. 83, в) характерны округлая форма тела и наличие в центре одной сократительной вакуоли. Паразиты постоянно двигаются или вращаются на одном месте. Под большим увеличением заметно мерцание ресничек, расположенных по периферии тела. Сбоку инфузории напоминают перевернутый колокол.

Апиозомы, эпистилисы, амбифрии (рис. 83, г, д, е) неподвижны, отличаются друг от друга формой тела и ядерным аппаратом. Тело апиозом удлинненное, суженное к подошве. Эпистилис имеет бокаловидную форму тела и длинный стебель, с помощью которого прикрепляется к рыбе. Это колониальные организмы. У амбифрий подошва более расширена, чем у апиозом. Для того чтобы увидеть ядро в нативном материале, под покровное стекло следует внести 1—2 капли 2%-ной уксусной кислоты.

Трихофрии (рис. 83, ж) имеют удлинненную форму тела. На одном или обоих полюсах, иногда по всей поверхности расположены сосущие щупальца.

3. Приготовление постоянных препаратов. Делают мазки с участков тела, где обнаружены инфузории, кладут их в чашку Петри слизью вверх и закрывают во избежание за-

грязнения. Сухие мазки готовят при обнаружении хилодонелл и триходин. Приготовленные мазки сушат при комнатной температуре. В другую чашку Петри наливают дистиллированную воду ( $\frac{3}{4}$  объема).

Высушенные мазки окрашивают азотнокислым серебром. На сухие мазки пипеткой наносят 2%-ный раствор серебра так, чтобы на мазке образовалась большая, но не стекающая с него капля. Закрывают чашку с мазками темной фотографической бумагой и выдерживают, не сдвигая чашку, в течение 8—15 мин в зависимости от количества слизи.

По истечении указанного времени снимают бумагу, наливают в чашку дистиллированной воды. Глазным пинцетом (лучше пластмассовым) берут за угол покровное стекло и промывают его в этой чашке, вынимая и опуская 3—4 раза.

Промытое стекло (мазок) переносят в чашку с чистой дистиллированной водой, опуская под углом к воде слизью вверх. Подкладывают под чашку белый лист бумаги и оставляют ее на свету. При ярком солнечном свете мазки окрашиваются через 1,5—2 ч, под ртутно-кварцевой лампой — через 15—20 мин.

Так как степень окраски (импрегнации) необходимо контролировать, то по истечении половины указанного времени мазки вместе с чашкой просматривают под малым увеличением микроскопа. К этому времени мазки приобретают коричневую окраску. Бледно-коричневая окраска свидетельствует о недокрашивании мазков. После того как поверхностная структура инфузорий будет четко видна, мазки промывают дистиллированной водой, стекла мазком вверх кладут на фильтровальную бумагу. Излишки воды сверху осторожно убирают фильтровальной бумагой, высушивают мазки.

На чистое обезжиренное предметное стекло препаративной иглой наносят 1—2 капли канадского бальзама (в зависимости от количества слизи в мазке). К краю бальзама осторожно приближают мазок и, поддерживая его препаративной иглой, опускают на бальзам. Тильной стороной иглы придавливают мазок к предметному стеклу, чтобы уменьшить слой бальзама. Бальзам, выступивший за край покровного стекла, убирают кусочком марли, смоченным в ксилоле, при этом мазок следует придерживать, чтобы он не сдвинулся с места.

На свободный конец предметного стекла наклеивают этикетку с указанием вида рыбы, возраста, органа или ткани, места вылова ее и других данных.

Таким же способом изготавливают постоянные микропрепараты из инфузорий, снятых с жабр, ротовой полости, носовых ямок и других участков тела.

Для изучения ядерного аппарата препараты изготавливают по методу, изложенному в занятии 38. По этому методу следует изготовить препараты ихтиофтириуса, апиозом, эпистилисов, амбифрий, трихофрий.

4. Определение паразитов. Изготовленные или имеющиеся препараты помещают под микроскоп и изучают под малым ( $7\times 9$ ) и

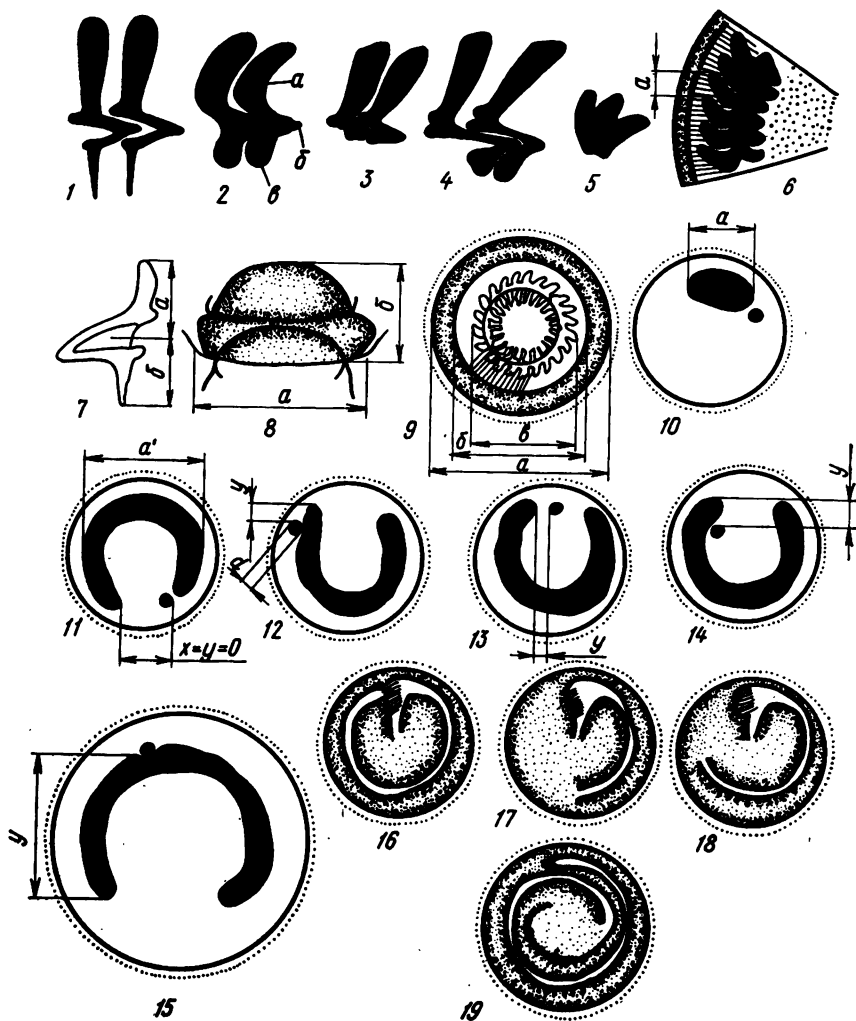


Рис. 84. Основные систематические признаки инфузорий сем. Urceolariidae (из разных авторов):

1 — форма зубов у *Tripartiella*; 2 — форма зубов у *Trichodina*: *a* — наружный, *b* — внутренний отросток, *c* — центральная конусовидная часть; 3 — форма зубов у *Trichodinella*; 4 — форма зубов у *Folliella*; 5 — форма зубов у *Dipartiella*; 6 — число полос прикрепительного диска, расположенных между двумя соседними наружными отростками (*a*); 7 — строение зуба: *a* — длина наружного, *b* — длина внутреннего отростка; 8 — основные измерения тела: *a* — диаметр тела, *b* — высота; 9 — основные измерения тела с абсорбального полюса: диаметр тела (*a*), прикрепительного диска-розетки (*b*), венчика (*c*); 10—14 — форма макронуклеуса и положение макронуклеуса: *a*, *a'* — диаметр макро- и микронуклеуса, *x* — расстояние между концами макронуклеуса, *y* — расстояние от микронуклеуса до ближайшего конца макронуклеуса; 15—19 — типы адоральной спирали

большим (7×40) увеличением. Рассматривают и зарисовывают расположение ресничного покрова, видимых органелл. У хилодонелл просчитывают количество ресничных рядов в обеих системах, отмечают количество посторально расположенных рядов ресничек, обращают внимание на расположение преорального и циркуморальных рядов, измеряют длину и ширину инфузории. Обращают внимание на расположение дистальных концов рядов ресничек обеих систем.

Измеряют зубцы прикрепительного диска у триходин с помощью окуляр-микрометра по схеме, представленной на рис. 84.

При изучении микропрепаратов, окрашенных железным гематоксилином, зарисовывают расположение ядерного аппарата, цитостома и др.

С помощью определителя выясняют видовую принадлежность инфузории и делают надпись на этикетке препарата. Вид хилодонелл и триходин устанавливают по препаратам, импрегнированным азотнокислым серебром, остальных инфузорий — по препаратам, окрашенным гематоксилином. Результаты работы оформляют в тетради.

#### Контрольные вопросы [2, 4, 5, 7, 9, 36, 37]

1. Какие роды инфузорий паразитируют у рыб?
2. На каких участках тела паразитируют инфузории?
3. Как собирают инфузорий с поверхности тела, носовых ямок, ротовой полости?
4. Как готовят сухой мазок?
5. Каким образом изучают живых инфузорий?
6. По каким признакам отличить на нативном материале триходин и ихтиофтириуса, трихофрию и апиозому, хилодонеллу и амбифрию?
7. Как можно увидеть ядро у сидячих перитрих в нативном материале?
8. Как приклеить мазок к предметному стеклу?
9. От чего зависит длительность импрегнации мазков?
10. Какие измерения проводят при видовом определении триходин?
11. Как размножаются инфузории?

#### МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГЕЛЬМИНТОЗОВ РЫБ

Гельминтозы вызывают паразитические черви, относящиеся к типам плоских (Plathelminthes), колючеголовых, или скребней (Acanthocephales), и первичнополостных, или круглых (Nemathelminthes). В качестве временных паразитов у рыб встречаются пиявки, относящиеся к типу кольчатых червей (Annelida).

Плоские черви, паразитирующие у рыб, включают три основных класса: моногеней (Monogenoidea), трематод (Trematoda) и ленточных (Cestoda) червей. В настоящее время в самостоятельные классы выделены Aspidogastriida и Amphilinida. У них вытянутое в длину тело листовидной или лентовидной формы, сплющенное в дорзовентральном направлении, покрытое кутикулой. Органы прикрепления разнообразны: в виде хитиноидных крючьев, клапанов, присосок, ботридий и др. Пищеварительная система имеется (моногенеи, трематоды) или отсутствует (цестоды). Нервная система представлена головными ганглиями и продольными стволами, сое-

диненными кольцевыми перемышками. Органы выделения — прото-нефридии. Половая система гермафродитная. Развитие — прямое у моногеней, сложное с чередованием поколений и сменой хозяев у трематод и цестод. Моногеней паразитируют в основном на жаберных лепестках и поверхности тела, трематоды и цестоды — во внутренних органах, чаще кишечнике.

Колючеголовые черви, или скребни, имеют цилиндрическое тело, покрытое тонкой кутикулой и состоящее из туловища и втяжного хоботка с хитиноподными крючьями. Пищеварительная система отсутствует, нервная — в виде ганглия, расположенного в хоботковом влагалище, и отходящих от него нервных стволов. Скребни раздельнополы. Развитие сложное с участием промежуточных хозяев, в теле которых происходит развитие личинки. Паразитируют скребни в основном в кишечнике многих видов пресноводных и морских рыб, иногда в полости тела, мускулатуре.

К первичнополостным относится большой класс круглых червей — *Nematoda*. Они имеют длинное нитевидное или веретенное тело, покрытое плотной кутикулой с шипиками, полосками, сосочками, бугорками и т. п. На головном конце расположено ротовое отверстие, окруженное губами, на которых находятся органы чувств — сосочки. Пищеварительная система имеется. Нервная система представлена окологлоточным кольцом и отходящими от него стволами. Нематоды в большинстве своем раздельнополые, яйцекладущие или живородящие. Развитие нематод в основном происходит со сменой хозяев.

Из кольчатых червей у рыб паразитируют представители класса пиявок — *Hirudinea*, для которых характерно удлиненное тело, состоящее из сегментов. На переднем и заднем концах тела расположены присоски. Пищеварительная система имеется. Нервная система в виде головных ганглиев и нервной цепочки. Пиявки — гермафродиты; развитие их осуществляется прямым путем, без участия промежуточных хозяев.

Гельминтозы довольно широко распространены среди культивируемых рыб. Не все их возбудители в равной мере патогенны, однако некоторые из них, например моногеней (развивающиеся прямым путем, без участия промежуточных хозяев), нередко накапливаются в прудах в больших количествах и вызывают вспышки болезни.

Из многочисленных гельминтов со сложным развитием болезни вызывают отдельные виды в определенных условиях. Из трематодозов, например, более распространены диплостомоз лососевых и постодиплостомоз карповых, вызываемые личиночными стадиями (метацеркариями) трематод. Некоторые цестодозы (ботриоцефалез, кавиоз, лигулез) широко распространены среди карповых рыб, а нематоды часто паразитируют у морских рыб (минтай, треска, навага и др.) и портят товарные качества рыбной продукции. Менее распространены и реже вызывают болезни скребни, или колючеголовые черви.

### Занятие 43. Трематоды рыб

**Содержание.** Сбор, фиксация и методы приготовления постоянных препаратов, определение паразитов. Изучение морфологии и систематики трематод.

**Материальное обеспечение.** См. занятие 37, кроме покровных стекол со шлифованным краем, материальной банки для хранения мазков, лимоннокислого натрия, метилового спирта, формалина, жидкости Шаудина, и дополнительно окуляр- и объектмикромтр, пробирки, поплавки, бюкса, дистиллированная вода, физиологический раствор, растворы квасцового и уксуснокислого карминов, спирты этиловый 70°-ный, 80°-ный, 90°-ный и 96°-ный, а также солянокислый, ксилол, диметилфталат, канадский бальзам, рисовальный аппарат и столик, листы тонкой белой бумаги, лоток для препаратов, коллекция трематод, живая (охлажденная рыба) или фиксированные гельминты, определители паразитов морских и пресноводных рыб.

**Организация и проведение работы.** Трематоды — большой класс плоских червей с листовидным телом, сплюснутым в дорзовентральном направлении. Размеры червей обычно от 1 до 20—30 мм. Тело покрыто кутикулой, на которой могут быть хитиноподобные шипики, иглы, чешуйки. Органы прикрепления — присоски, чаще две, реже одна, иногда группа присосок. Брюшная присоска находится в срединной части на вентральной стороне тела. Ротовая присоска находится чаще на самом переднем конце тела. В центре ротовой присоски обычно имеется ротовое отверстие. Иногда органы прикрепления могут быть представлены группой присосок или крупным диском с присасывательными ямками либо вообще отсутствовать, например у представителей семейства *Sanguinicolidae*, обитающих в кровеносной системе рыб.

Пищеварительная система трематод представлена ротовым отверстием, мускулистой глоткой (фарингсом), пищеводом (рис. 85) и кишечником. Кишечник состоит обычно из двух стволов, заканчивающихся слепо, либо (реже) мешковидный или представлен одним стволом.

Преобладающее число видов трематод, паразитирующих у рыб, — гермафродиты. Лишь редко у некоторых паразитов морских рыб отмечен неполный гермафродитизм — гонохоризм. Мужская половая система представлена двумя, реже одним или многими семенниками, от которых отходят семявыводящие каналы, сливающиеся в семяпровод. На конце семяпровода обычно находится мускулистый циррус. Женская половая система состоит из яичника, входящего от него яйцевода, открывающихся в оотип, где происходит формирование яиц, и желточников. Яйца трематод обычно удлинненно-овальной формы (у сангвиникола треугольные), с хитиноподобной скорлупой и в большинстве случаев снабжены крышечкой на одном из полюсов. Строение мужской и женской половой системы является важным систематическим признаком.

Развитие трематод обычно сложное, с чередованием поколений и сменой хозяев (двух, трех и более). Яйца гельминтов вместе с экскрементами рыбы попадают в воду, где из них вылупляются подвижные, покрытые ресничками личинки — мирацидии. Мирацидии свободно плавают и проникают в брюхоногого моллюска — первого промежуточного хозяина.

В печени или пищеварительной железе моллюска мирацидий превращается в неподвижную мешковидную спороцисту. Внутри нее партеногенетически формируются редии и церкарии. Церкарии морфологически напоминают взрослые формы, но половая система их еще не развита. Они очень подвижны, покидают моллюска и плавают в воде с помощью хвоста. Активно вбуравливаясь в покровы, церкарий попадает в следующего промежуточного хозяина — рыбу (иногда водное беспозвоночное), где, отбросив хвост, мигрирует в определенные органы и ткани и превращается в следующую личиночную стадию — метациркулий. Окончательным (дефинитивным) хозяином трематод являются позвоночные животные, рыбаобразные птицы, рыбы, амфибии, рептилии и млекопитающие. В окончательном хозяине гельминты становятся половозрелыми и называются маритой.

Локализация трематод в организме рыбы разнообразна. Половозрелые гельминты у рыб обычно поселяются в кишечнике, некоторые виды — во внутренних органах и кровеносной системе, личинки (метациркулий) — под кожей, эпителием плавников и жабр, в глазах, в полости тела, головном мозгу и мускулатуре рыб.

У пресноводных рыб это личинки трематод — метациркулий — родов *Diplostomum*, *Posnodiplostomum*, *Tetragotyle* из взрослых гельминтов — представители рода *Sanguinicola*, которые вызывают заболевание рыб (рис. 86). У морских рыб распространены метациркулий *Cryptocotyle concavum*, из половозрелых гельминтов паразитируют *Hemiurus appendiculatus*, *Targestia laticollis*.

Порядок проведения работы следующий.

1. Сбор материала. Живую рыбу обездвигивают и кладут в кювету. Тщательно осматривают рыбу, регистрируя различные отклонения в окраске и целостности жабр, покровах тела (наличие мозаичности жабр, очагов некроза, точечных кровоизлияний на светлых участках тела и темных пигментных пятен). Взвешивают и

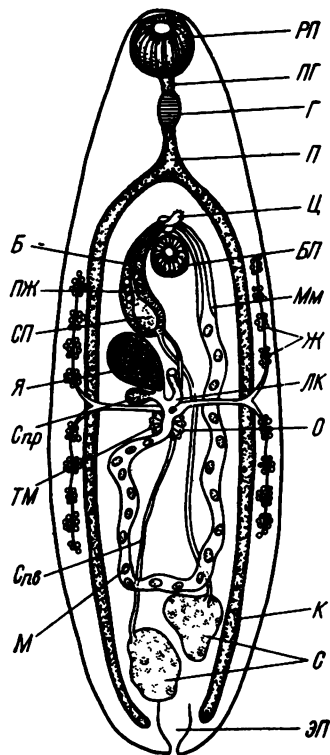


Рис. 85. Схема строения трематод:

РП — ротовая присоска; ПГ — предглотка; Г — глотка; П — пищевод; Ц — циррус; БП — брюшная присоска; ММ — желточники; ЛК — Лауреров канал; О — оотип; К — кишечник; С — семенники; ЭП — эксcretорный пузырь; М — матка; Слв — семяпровод; ТМ — тельце Мелиса; Слр — сомаприемник; Я — яичник; СП — семенной пузырь; ПЖ — простатическая железа; Б — половая бруса (из Кабле, 1966)

измеряют рыбу. Делают надрезы кожи вокруг имеющих темных пятен, отгибают. Обрезанный кусок кожи, скальпелем снимают цисту трематоды и переносят ее в каплю физиологического раствора или воды. Вырезают жаберные лепестки и компрессионным способом просматривают их под МБС или МБД на наличие яиц сангвиникола. Возможно нахождение отбросивших хвост церкариев, проникших через жабры в рыбу. Яйца и церкарии выделяют

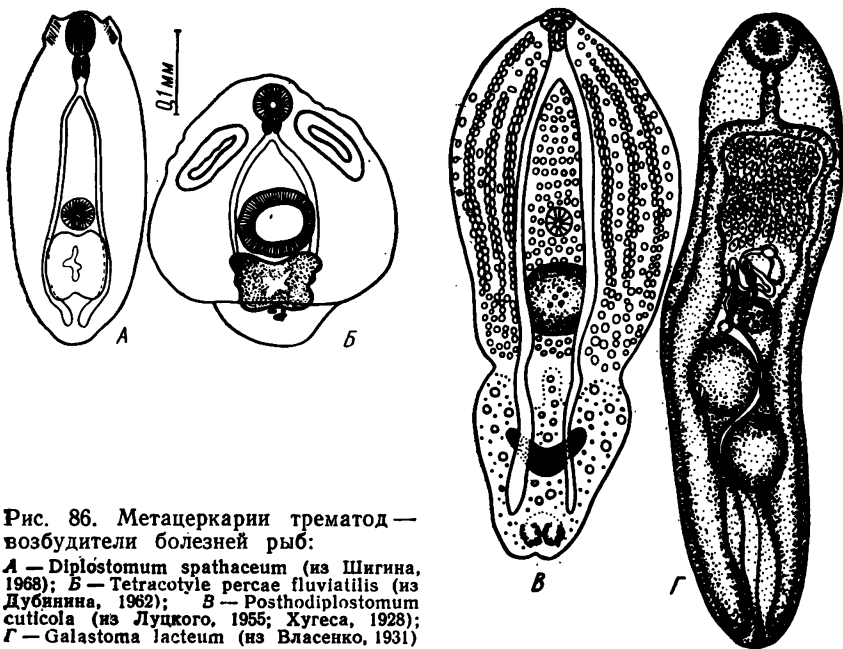


Рис. 86. Метацеркарии трематод — возбудители болезней рыб:

А — *Diplostomum spathaceum* (из Шигина, 1968); Б — *Tetracotyle percae fluviatilis* (из Дубянина, 1962); В — *Posthodiplostomum cuticola* (из Луцкого, 1955; Хуреса, 1928); Г — *Galastoma lacteum* (из Власенко, 1931)

препаровальными иглами и переносят пипеткой в каплю воды на предметное стекло (чтобы вода быстро не подсохла, закрывают стекло чашкой Петри или большим часовым стеклом).

Вскрывают рыбу и внимательно осматривают внутренние органы, брюжейку, полость тела, где возможна локализация личинок тетракодиле и других инцистированных метацеркариев трематод. Обнаруженных паразитов (отдельно с каждого органа) на кончике скальпеля переносят в солонку с водой. Выделяют внутренние органы и помещают в отдельные чашки Петри. Сердце кладут в часовое стекло и ножницами разрезают его. Кровь из сердца просматривают под МБС на наличие сангвиникола. При наличии гельминта переносят его в отдельную солонку с физиологическим раствором. Ножницами делают разрез вдоль всего кишечника рыбы (включая желудок и глотку), производят соскоб с его внутренней поверхности. Все содержимое соскоба кладут на стекло для вскрытия. Небольшую часть содержимого переносят в каплю воды на стекло для вскрытия, накрывают предметным стеклом и, сдавив

содержимое, просматривают его под МБС, считая и выделяя найденных паразитов. Таким же образом просматривают все содержимое соскоба.

Обнаруженных гельминтов переносят в отдельную солонку с дистиллированной водой. Выделяют головной мозг рыбы, обратив внимание на наличие кровоизлияний, и просматривают компрессионным способом. Обнаруженных метацеркариев выделяют и помещают в солонку с водой.

2. Сбор, фиксация и приготовление тотальных препаратов из метацеркариев сем. Diplostomidae. Извлекают глазное яблоко, подрезают его у основания тонкими ножницами, кладут на предметное стекло. Разрезают глаз ножницами и, выделив стекловидное тело и хрусталик, просматривают их под МБС. Хрусталик помещают между двумя предметными стеклами, сдавив его до появления «белого ядра» в центре, и просматривают под МБС. Стекловидное тело просматривают компрессионно. Снимают одно предметное стекло, с помощью препаровальных игл и пипетки с тонко оттянутым концом выделяют метацеркарии и помещают на 2—3 ч в солонку с профильтрованной прудовой водой. Затем отбирают из воды живых метацеркариев, переносят их в неглубокую пробирку-поплавок и заливают уксуснокислым кармином на 15—20 мин. Убирают пипеткой кармин и добавляют солянокислый спирт (70°-ный). Дифференцировку органов по окраске проводят под МБС. Обезвживают гельминтов, пропустив их (добавляя и отсасывая спирт) через спирты возрастающей крепости (70°-ный, 80°-ный, 90°-ный и 96°-ный) и выдерживая в каждом по 10 мин. Просветляют метацеркариев в диметилфталате. Для этого гельминтов осторожно помещают в бюкс, в которую предварительно наливают спирт (96°-ный) и диметилфталат. В начале просветления метацеркарии располагаются на границе спирта (верхний слой) и диметилфталата (нижний слой). После просветления (пропитки диметилфталатом), когда гельминты опускаются на дно бюксы, их тонкой пипеткой переносят на предметное стекло. На другое чистое предметное стекло наносят каплю бальзама, в которую препаровальной иглой помещают по 5—6 метацеркариев, и накрывают покровным стеклом, контролируя степень сдавливания под МБС. Оформляют на препарат этикетку.

3. Фиксация и изготовление тотальных препаратов из личинок и взрослых трематод (рис. 87). Освобожденную от тканей и слизи цисту гельминта переносят в каплю воды на предметное стекло. Стекло помещают под МБС, с помощью обычной препаровальной и специальной иглы Сударикова (конец которой представляет собой расплющенное и слегка изогнутое в виде ложки ушко швейной иглы) осторожно разрывают внешнюю и внутреннюю оболочки цисты и освобождают личинку. Фиксацию и окраску личинок и зрелых трематод в дальнейшем осуществляют одинаково. Вначале обезвживают гельминта, нагрев его на часовом или на предметном стекле с водой до 60—70°C (до появления пара). Помещают гельминтов между предметными стеклами (личинок можно прес-

овать между предметным и покровным стеклами), опускают в чашку Петри, регулируя степень сдавливания грузиками от разновесов (гельминт должен быть хорошо расправлен, но не раздавлен!). Придерживая иглой или пинцетом верхние стенки, заливают в чашку Петри 70°-ный спирт на 10—20 мин. Зафиксированных таким образом трематод можно хранить в фиксаторе в течение длительного времени. Для приготовления тотального препарата гельминтов отмывают в дистиллированной воде до полного удаления фиксатора, для чего их помещают в воду на 0,5—2 ч. Для окраски отмых гелиминтов заливают водным раствором квасцового кармина. Время окраски составляет от 10 до 30—60 мин в зависимости от размеров объекта и плотности его покровов. Хорошо окрашенных гелиминтов промывают водой и заливают солянокислым спиртом, контролируя под МБС степень дифференцировки

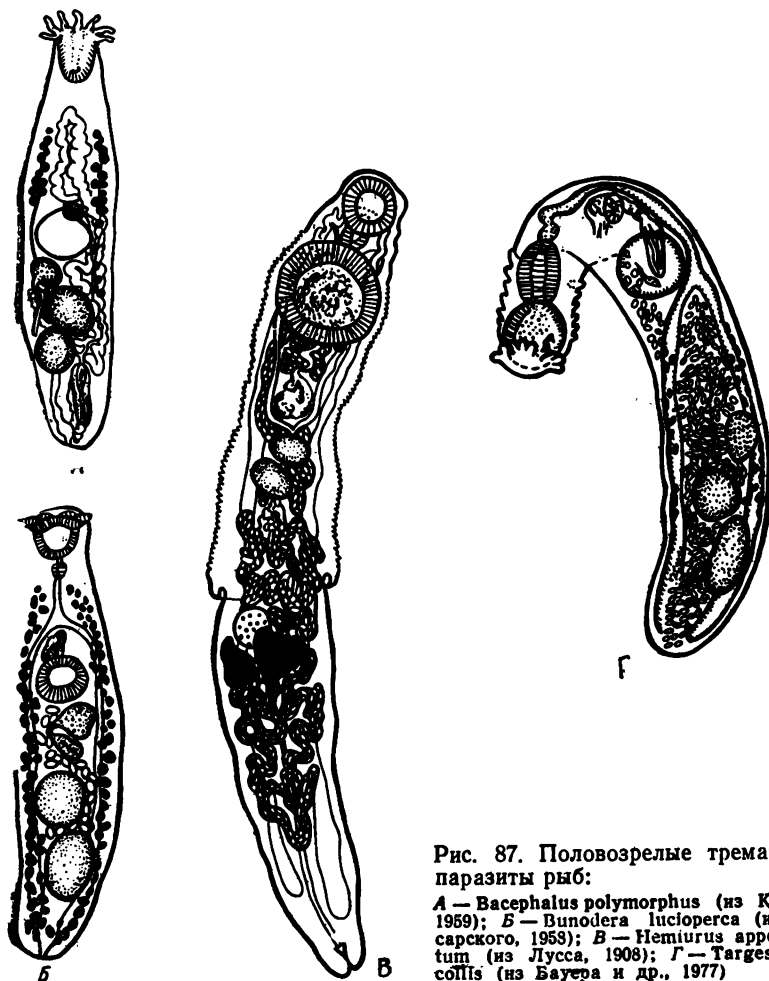


Рис. 87. Половозрелые трематоды — паразиты рыб:

А — *Vacceralus polymorphus* (из Козицкой, 1959); Б — *Bunodera luciopecta* (из Слюсарского, 1953); В — *Hemisturus appendiculatum* (из Лусса, 1908); Г — *Targestia laticoelis* (из Бауера и др., 1977)

органов и тканей по окраске. Пипеткой отсасывают солянокислый спирт и пропускают гельминтов через спирты возрастающей крепости (70°-ный, 80°-ный, 90°-ный и 96°-ный). Для просветления червей используют диметилфталат (иногда гвоздичное масло), как это описано для метацеркариев сем. Diplostomidae. После окончательного просветления гельминтов переносят в каплю канадского бальзама на предметное стекло и накрывают покровным стеклом, регулируя степень сдавливания под МБС. На приготовленный препарат наклеивают этикетку.

4. Определение паразитов. До вида трематод определяют с помощью постоянных окрашенных препаратов. Препарат из гельминта помещают под МБС или микроскоп (если объект очень мелкий) и внимательно изучают внешнее и внутреннее строение гельминта (строение пищеварительной и половой систем паразита, наличие яиц и их форма и т. д.). Отмечают в рабочей тетради и зарисовывают с помощью рисовального аппарата особенности строения гельминта. С помощью определителя выясняют видовую принадлежность трематоды, проводя с помощью окуляр-микрометра необходимые измерения (последнее особенно необходимо при определении метацеркариев диплостомид). Окончательно оформляют этикетку к препарату.

Просматривают под МБС и микроскопом постоянные препараты трематод из коллекций. Отмечают морфологические особенности червей при определении их до вида. Зарисовывают некоторые из них с помощью рисовального аппарата.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 7, 9, 11, 12, 36, 37, 43, 46]

1. Каковы систематические признаки паразитических червей класса трематод?
2. Представители каких подклассов трематод паразитируют у рыб?
3. Каково строение половой системы трематод?
4. Какова схема жизненного цикла трематод?
5. Каковы основные места паразитирования у рыб личинок и зрелых гельминтов?
6. Чем и каким образом производится фиксация трематод?
7. Каков порядок приготовления тотальных препаратов из трематод? Какой краситель используют?
8. В чем заключаются особенности сбора, фиксации и приготовления тотальных препаратов из метацеркариев диплостомид?
9. Каковы основные систематические признаки трематод, которые лежат в основе их определения до вида?

#### Занятие 44. Моногены рыб

**Содержание.** Сбор и фиксация паразитов, изучение морфологических признаков разных систематических групп, методы приготовления постоянных и временных препаратов, определение паразитов.

**Материальное обеспечение.** См. занятие 37, кроме покровного стекла со шлифованным краем, матеральной банки для хранения мазков, лимоннокислого натрия, метилового спирта, формалина, жидкости Шаудина, и дополнительно окуляр- и объектмикрометры, рисовальный аппарат, спиртовка, замазка для препаратов, глицерин-желатин, 96°-ный этиловый спирт, раствор квасцового кармина, подкисленный спирт, диметилфталат, 1%-ный раствор аммиака, канадский бальзам, лоток для препаратов, живая рыба, готовые препараты моногенов, определители паразитов пресноводных и морских рыб.

**Организация и проведение работы.** Моногенеи — класс плоских червей, паразитирующих в основном у рыб, иногда у других холоднокровных. Величина моногеней от 0,1 до 30 мм. Органы прикрепления хорошо развиты, располагаются на переднем и заднем концах тела. На переднем конце они представлены головными выростами, валиками, ямками, присосками, которые служат в основном для фиксации паразитов во время питания. Головные выросты представляют собой подвижные лопасти, парные (*Gyrodactylus*), иногда в виде двух (*Dactylogyrus*, *Ancyrocephalus*) или четырех пар. Головные валики в виде симметрично расположенных утолщений, на которых (у *Nitzschia*) имеются головные ямки. У некоторых моногеней (рода *Diplozoon* и др.) имеются парные присоски.

На заднем конце тела располагается прикрепительный диск, с помощью которого паразит закрепляется на теле хозяина. На прикрепительном диске расположены различные хитиноидные образования: срединные и краевые крючья, соединительные пластинки, клапаны, присоски, которые служат важными систематическими признаками. Иногда диск преобразуется в одну крупную присоску. Срединные крючья (обычно от 1 до 3 пар) расположены в центре прикрепительного диска, а между ними — соединительные пластинки для соединения крючьев и укрепления диска. Иногда (роды *Acolpenteron*, *Pseudocolpenteron* и др.) срединные крючья отсутствуют. Краевые крючья (в количестве от 10 до 16), располагающиеся по периферии диска, разнообразны по форме и размерам (рис. 88). Иногда на прикрепительном диске имеются присоски, снабженные крючьями (род *Nitzschia*), или прикрепительный клапан с хитиноидным образованием, с помощью которого паразит зацемялет ткань хозяина (*Diclybothrium*, *Diplozoon*).

Пищеварительная система хорошо развита, состоит из ротового отверстия, глотки, пищевода и кишечника. Кишечник чаще в виде двух стволов, идущих к заднему концу тела, иногда в виде простой трубки. Кишечные стволы могут заканчиваться слепо (*Gyrodactylus*) или сливаться у заднего конца (*Dactylogyrus*). Иногда кишечные стволы имеют боковые выросты и ветви (*Diplozoon*, *Heteraxine*).

Моногенеи — гермафродиты. Мужская половая система представлена семенниками (один, два или много), семявыводящими путями (выносящие каналы, семяпровод), дополнительными железами и копулятивным аппаратом, который у большинства низших моногеней состоит из хитиновой трубки и поддерживающей части. Строение хитиновой трубки и поддерживающего аппарата имеет важное диагностическое значение.

Женская половая система представлена яичником, яйцеводом, желточниками, дополнительными железами и протоками (рис. 89). У живородящих гиродактилюсов нет желточных желез. Большинство моногеней откладывают яйца, весьма разнообразные по форме: круглые, овальные, веретеновидные, снабженные на верхнем конце крышечкой и филаментами.

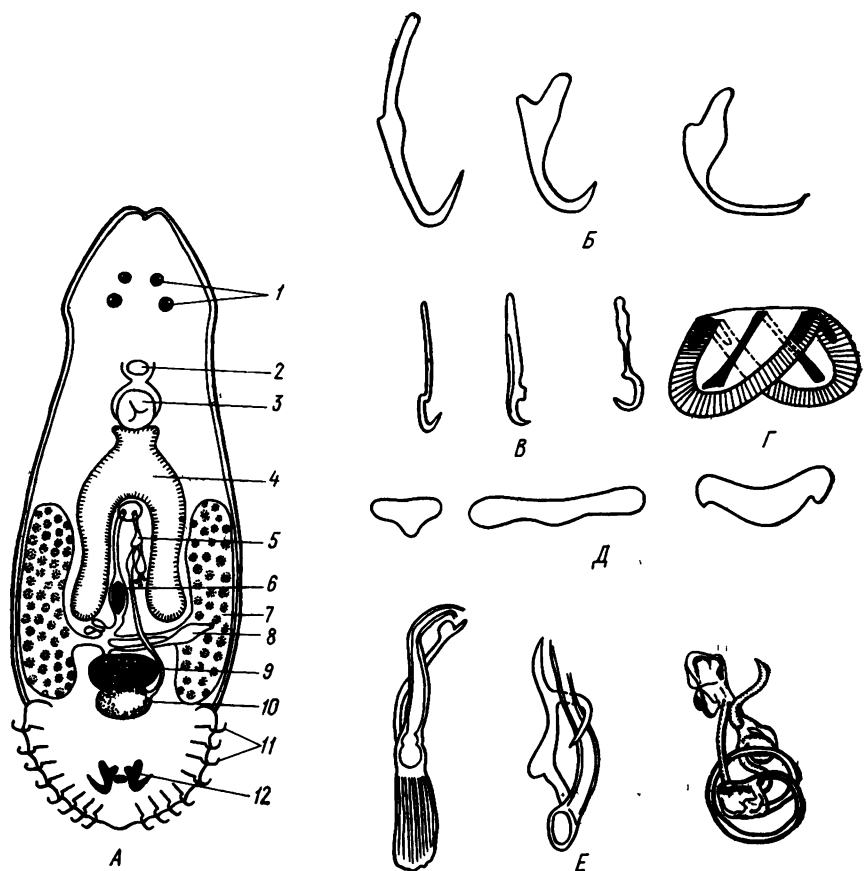


Рис. 88. План строения низших моногеней (из Гусева, 1962):

*A* — общий вид и внутреннее строение: 1 — глаза, 2 — ротовое отверстие, 3 — глотка; 4 — кишечник, 5 — копулятивный орган, 6 — матка, 7 — желточники, 8 — вагинальный проток; 9 — яичник, 10 — семенник, 11 — краевые крючья, 12 — срединные крючья; *Б* — различные типы срединных крючьей; *В* — различные типы краевых крючьей; *Г* — клапан; *Д* — различные формы соединительных пластинок; *Е* — различные типы копулятивного аппарата

Развитие моногеней происходит без участия промежуточных хозяев. Из яйца, отложенного в воду, вылупляется ресничная личинка или онкомирацидий. Она плавает в воде, активно отыскивает хозяина, прикрепляется к нему, сбрасывает реснички и переходит к паразитированию. Постепенно развивается прикрепительный аппарат, формируются внутренние органы, и вскоре червь начинает продуцировать яйца. Локализуются на поверхности тела, плавниках, жабрах, реже в носовых ямках, ротовой полости или других органах.

При изучении этого класса следует обратить внимание на строение органов прикрепления, пищеварительной и половой систем, по-

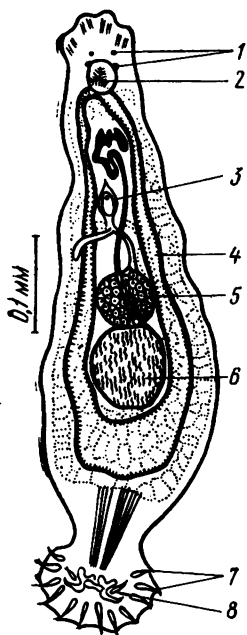


Рис. 89. Схема строения дактилогируса (из Быховского, 1933):

1 — глаза; 2 — глотка; 3 — когулятивный орган; 4 — кишечник; 5 — яичник; 6 — семенник; 7 — краевые крючья; 8 — срединные крючья

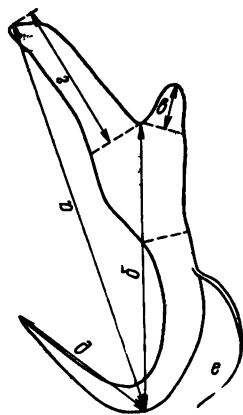


Рис. 90. Схема измерения срединного крючка:

а — общая длина; б — длина основной части; в — длина наружного отростка; г — длина внутреннего отростка; д — длина острия; е — сухожильная связка

скольку на особенностях их строения основана систематика (рис. 90, 91).

У пресноводных рыб паразитируют представители 6 семейств. Наиболее распространенными являются роды: *Dactylogytus* (насчитывающий несколько сот видов), *Ancyrocephalus*, *Ancylodiscoides*, *Nitzschia*, *Tetraonchus*, *Gyrodactylus*, *Dicylbothrium*, *Discocotyle*, *Diplozoon* (рис. 92). У морских рыб паразитируют представители других родов (*Benedenia*, *Heteraxine*, *Bivaginina*, *Mazocreas*, *Axina* и др.), общим являются гидродактилюсы.

Порядок проведения работы следующий.

1. Сбор материала. Живую рыбу обездвиживают и помещают в кювету. Отрезают плавники и помещают их в чашки Петри с чистой водой. Делают соскоб с поверхности тела, помещают его в каплю воды на предметное стекло, добавляют 2—3 капли чистой воды, выделяют жаберные дуги, помещают их на стекло для вскрытия и смачивают водой. Просматривают под МБС плавники.

Соскоб с поверхности тела просматривают под МБС (увеличение 8×12,5), подсчитывают количество паразитов. С помощью препаровальных игл и тонко натянутой пипетки отбирают обнаруженных червей, переносят их на предметное стекло в каплю чистой воды, освобождают от остатков тканей и слизи. Стекло с отобранными паразитами оставляют на столе, прикрыв его чашкой Петри. Жаберные дуги просматривают под МБС, выделяют найденных паразитов, подсчитывают их количество и помещают на предметное

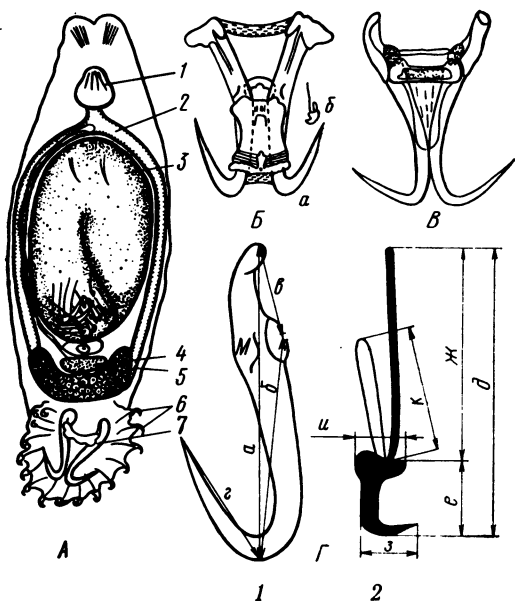


Рис. 91. Схема строения гиро-  
дактилюса (из Быховского,  
1933):

А — общий вид и внутреннее строение: 1 — глотка, 2 — кишечник, 3 — зародыш следующего поколения, 4 — семенники, 5 — яичник, 6 — краевые крючья, 7 — срединные крючья, 5 — срединные (а) и краевые (б) крючья *Gyrodactylus surrini* (из Диаровой, 1964); В — срединные крючья *G. sprostonae* (из Магтейса и Глезера, 1970); Г — схема измерения срединного (1) и краевого (2) крючка: а — общая длина крючка, б — длина основной части, в — длина внутреннего отростка, г — длина острия, д — общая длина крючка, е — длина самого крючка, ж — длина рукоятки, з — длина острия крючка, и — ширина основания крючка, к — длина сухожильной связки

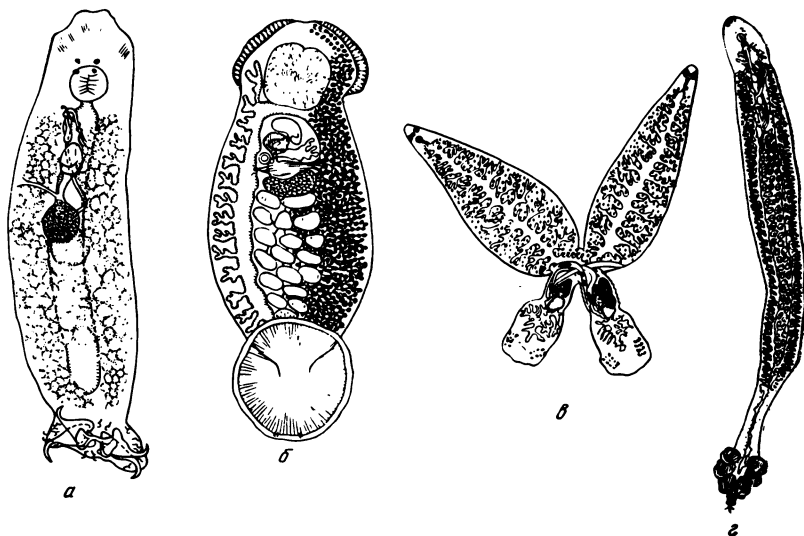


Рис. 92. Моногенеи пресноводных рыб:

а — *Tetraonchus monenteron*; б — *Nitzschia sturionis* (из Быховского, 1957); в — *Diplozoon paradozum* (из Быховского и Нагибиной, 1959); г — *Dicylbothrium armatum* (из Быховского и Гусева, 1950)

стекло в каплю чистой воды, добавляют раствор аммиака, закрывают чашкой Петри.

Плавники просматривают под МБС, добавив чистой воды. Отбирают паразитов, как указано выше. Далее делают соскоб с ротовой полости и носовых ямок (см. занятие 37), подсчитывают и отбирают паразитов, как указано в пп. 3 и 4.

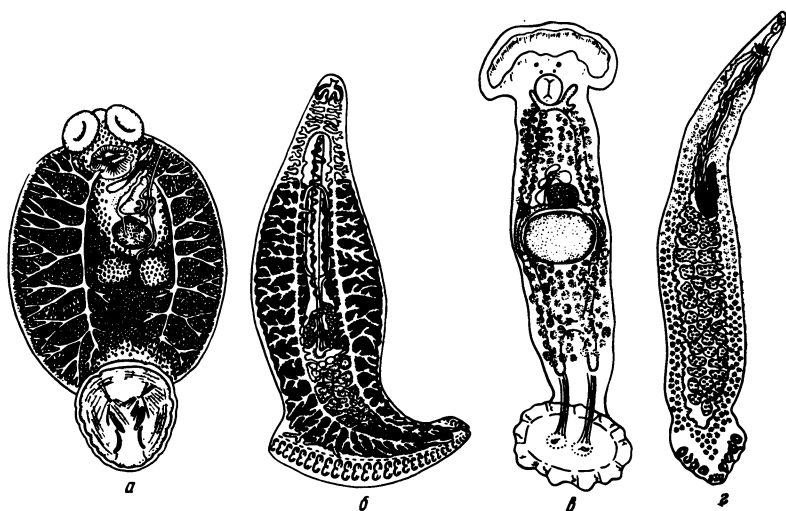


Рис. 93. Моногенеи морских рыб:

*a* — *Benedenia seriola* (из Ямагути, 1934); *б* — *Heteraxine heterocerca* (из Быховского, 1957); *в* — *Calceostomella inermis* (из Быховского, 1957); *г* — *Mazocreas alosae* (из Быховского, 1957)

2. Изучение живых паразитов. Выделенного и отмытого от слизи паразита помещают в каплю воды на предметное стекло. Накрывают покровным стеклом и помещают под микроскоп, рассматривают сначала под малым, а затем под большим увеличением. Рассматривают и зарисовывают общий вид, наличие пигментных глазков, строение пищеварительной и половой систем, прикрепительных органов и копулятивного аппарата (последних рисуют рисовальным аппаратом с придавленного червя, рис. 93).

3. Приготовление неокрашенных препаратов. На стекло, где были помещены паразиты, выделенные с поверхности тела, добавляют каплю 1%-ного раствора аммиака, кусочком фильтровальной бумаги удаляют воду, помещают под МБС, расправляют паразитов. Глицерин-желатин (на кончике скальпеля) нагревают над пламенем спиртовки до расплавления смеси, наносят каплю на стекло с паразитами. К краю капли осторожно приближают чистое покровное стекло и медленно, поддерживая его препаровальной иглой, опускают на каплю глицерин-желатина, следя за тем, чтобы под стеклом не оставались пузырьки воздуха. Под МБС осторожно тыльной стороной препаровальной иглы придавливают покровное

стекло, чтобы уменьшить слой глицерин-желатина, и расплющивают паразитов, у которых в таком положении хорошо просматривается хитиновое вооружение, по строению которого ведется определение червя.

Для длительного сохранения препарата по краям покровного стекла с помощью тонкой деревянной палочки (спички) наносят слой специальной замазки, состоящей из воска и канифоли, что предохраняет препарат от высыхания. На один из концов предметного стекла наклеивают этикетку с указанием хозяина, даты, органа или ткани, места вылова. Таким же способом изготавливают постоянные препараты из паразитов, выделенных с жабр, плавников, носовых ямок и ротовой полости.

4. Приготовление окрашенных препаратов. Крупных моногеней (роды *Diplozoon*, *Diclybothrium*, *Nitzschia*, *Benedenia* и другие) специально окрашивают, чтобы рассмотреть строение их внутренних органов, что важно для определения вида червей. Методика окраски — см. занятие 43.

5. Определение паразитов. Изготовленные препараты помещают под микроскоп и изучают под малым ( $7\times 9$ ) и большим ( $7\times 40$ ,  $10\times 90$ ) увеличением. Внимательно рассматривают строение прикрепительного диска и вооружение копулятивного органа. Зарисовывают срединные крючья и копулятивный орган при увеличении  $7\times 10$  и  $7\times 40$ . Измеряют срединные крючья с помощью окуляр-микрометра.

С помощью определителя выясняют вид паразита и делают соответствующую надпись на этикетке препарата. Результаты работы оформляют в тетради для лабораторных записей. Просматривают и зарисовывают готовые препараты из коллекции.

#### Контрольные вопросы [3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 32, 36, 37]

1. Какие роды моногеней паразитируют у рыб и по каким признакам их различают?
2. Как устроены прикрепительные органы моногеней?
3. Как устроены половая и пищеварительная системы моногеней?
4. Как происходит развитие моногеней?
5. На каких участках тела паразитируют различные виды моногеней?
6. Какие реактивы необходимы для приготовления постоянных препаратов и как их готовят?
7. Как собрать моногеней с поверхности тела, жабр, носовых ямок и ротовой полости?
8. Как обездвигить моногеней?
9. Как готовят препараты из крупных моногеней?
10. Каким образом изучают живых паразитов?
11. В чем различие постоянных и временных препаратов?

#### Занятие 45. Цестоды рыб

**Содержание.** Сбор и фиксация паразитов. Изучение морфологии разных систематических групп цестод. Методы приготовления препаратов, определение паразитов.

**Материальное обеспечение.** См. занятие 37, кроме покровного стекла со шлифованным краем, материальной банки для хранения мазков, лимоннокислого натрия, метилового спирта, формалина, жидкости Шаудина, и дополнительно

окуляр- и объектмикрометры, рисовальный аппарат, замазка для препаратов, глицерин-желатин, 96°-ный этиловый спирт, раствор квасцового кармина, подкисленный спирт, диметилфталат, раствор аммиака, канадский бальзам, лоток для препаратов, живая или охлажденная рыба, готовые препараты цестод, определители паразитов пресноводных и морских рыб.

**Организация и проведение работы.** Цестоды — многочисленный класс плоских червей, широко распространенных у пресноводных и морских рыб. Тело цестод лентовидное, состоит из головки (ско-

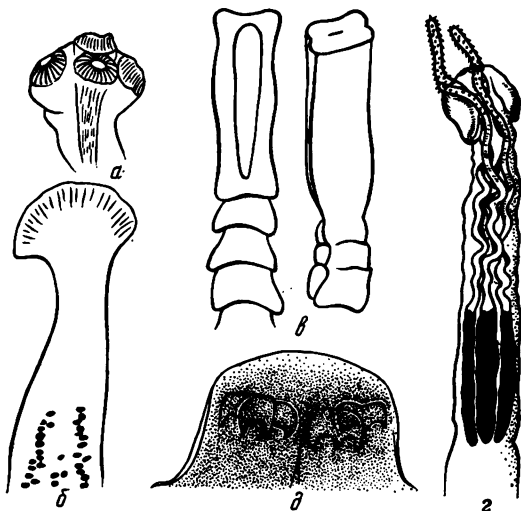


Рис. 94. Органы прикрепления цестод:

*a* — присоска *Silurotaenia siluri*; *б* — ботрии *Caryophyllaeus laticeps*; *в* — ботрии *Bothrioccephalus scorpii*; *г* — хоботок *Tetraarhynchus*; *д* — крючья *Triaenophorus meridionalis* (из разных авторов)

лекса), шейки и множества члеников (стробилл). У некоторых цестод тело нерасчлененное. На головке расположены органы прикрепления: ботридии, присоски, крючья, хоботки и др. (рис. 94). Пищеварительная система отсутствует, выделительная — прото-нефридиального типа. Ленточные черви — гермафродиты. У расчлененных цестод в каждом членике (кроме передних молодых) имеется свой половой комплекс, у нерасчлененных (гвоздичниковых) чаще имеется один комплекс, иногда несколько (циатоцефалюс), включающих яичник, яйцеводы, матку, мужские и женские половые протоки, а также многочисленные желточники и семенники (рис. 95).

Строение органов прикрепления, наличие шейки, строение половой системы (расположение и количество желточников и семенников, форма яичника, матки и др.) имеют важное систематическое значение.

Развитие цестод сложное, с участием промежуточных хозяев. Окончательными хозяевами цестод рыб являются обычно птицы,

рыбы, в кишечнике которых паразитируют половозрелые цестоды. С экскрементами птиц или рыб яйца гельминтов попадают в воду, где из них вылупляется подвижная ресничная личинка — корацидий. Корацидия чаще всего заглатывают низшие ракообразные (циклопы, диаптомусы, бокоплавы, мизиды), в теле которых развивается личиночная стадия — процеркоид. Зараженного циклопа

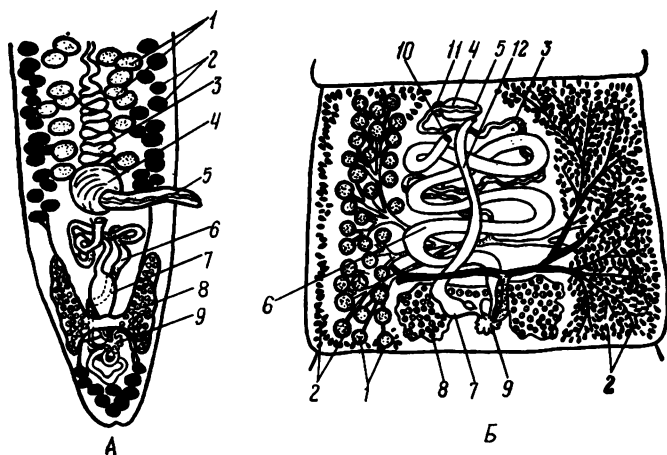


Рис. 95. Схема строения половой системы нечленистых (А) и членистых (Б) цестод (из разных авторов):

1 — семяники; 2 — желточники; 3 — семяпровод; 4 — сумка цирруса; 5 — циррус; 6 — матка; 7 — семяприемник; 8 — яичник; 9 — скорлуповые железы; 10 — отверстие матки; 11 — семенной пузырек; 12 — влагалище

съедает рыба, в которой паразит достигает следующей личиночной стадии — плероцеркоида. У рыб плероцеркоиды локализуются в мускулатуре, печени, полости тела, стенках кишечника и других внутренних органах.

Пораженную плероцеркоидом рыбу съедает рыбаодная птица, иногда хищная рыба, млекопитающие, в кишечнике которых паразит становится половозрелым. Имеются и другие циклы развития цестод, протекающие с участием одного промежуточного хозяина, как, например ботриоцефалос, протецефалос (циклопы), гвоздичники (олигохеты) и др.

Наиболее распространенными среди пресноводных рыб — объектов промышленного рыбоводства — являются роды *Saurophyllaeus*, *Khawia*, *Triaenophorus*, *Cyathocephalus*, *Bothriocephalus*, *Proteocephalus*. Роды *Diphyllobothrium*, *Ligula*, *Digramma* паразитируют у рыб на личиночной стадии (плероцеркоид), так же как цистицерки *Dilepis*, *Gyrophynchus* и др. (рис. 96). У морских рыб часто паразитируют представители рода *Bothriocephalus*, четыреххоботники из отряда *Tyranophyncha* родов *Nybelinia*, *Tentaculafia*, личинки тетрафилид (сем. *Phyllobothriidae*) и др. У осетровых рыб нередко встречаются в полости тела представители рода *Amphilina*.

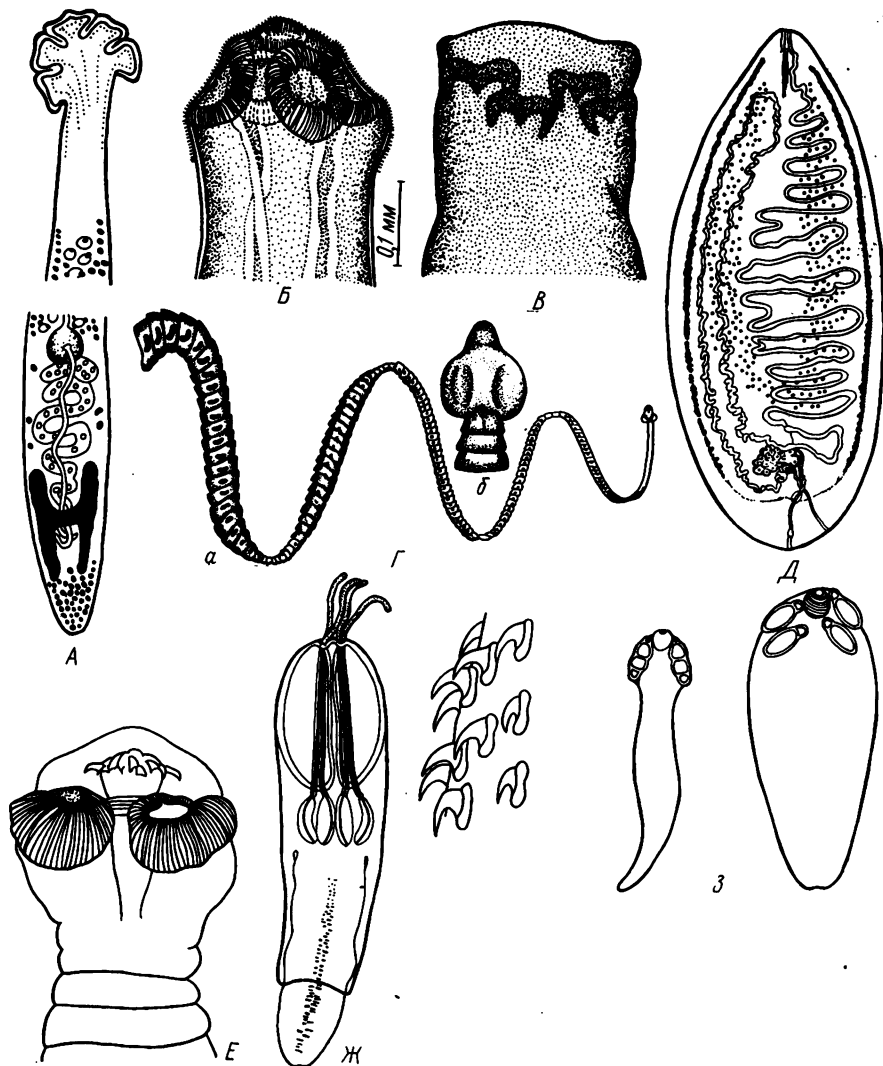


Рис. 96. Цестоды пресноводных и морских рыб (из разных авторов):

а — *Khawlia sinensis*; б — *Proteocephalus exiguus*; в — *Triaenophorus nodulosus*; г — *Bothriocephalus acheilognathi*; д — *Amphilina foliacea*; е — *Dilepis unilateralis*; ж — личинка *Nybelinia surmicola*; з — плероцеркоиды *Scolex pleuronectis*

Порядок проведения работы следующий.

1. Сбор материала. Живую рыбу обездвигивают, помещают в кювету. Вскрывают брюшную полость и тщательно осматривают внутренние органы, где можно обнаружить плероцеркоиды ремнецов или лентеца широкого и др. Осторожно выделяют комплекс внутренних органов, а из них (не повреждая!) освобождают ки-

щечник. Переносят его на стекло для вскрытия и разрезают маленькими ножницами вдоль. Если кишечник очень длинный (от крупной рыбы), его исследуют по частям. Для этого его разрезают на несколько частей и уже каждую часть разрезают вдоль, осматривают содержимое и извлекают пинцетом всех ленточных червей, видимых невооруженным глазом. Затем отделяют содержимое кишечника и рассматривают его под лупой или биноклем, далее делают соскоб со слизистой кишечника. Все это исследуют, прижимая между двумя стеклами, компрессионным способом. Если исследуют хищную рыбу, которая имеет пилорические придатки, то их тоже осторожно разрезают вдоль, чтобы не повредить головок ленточных червей, которые часто прикрепляются в них. Кроме того, рассматривают мускулатуру, гонады, печень, где могут быть личиночные стадии цестод, например триенофорус и др.

В кишечнике хищных рыб часто обнаруживают крупных ленточных червей родов *Trienophorus*, *Proteocephalus* и др., в кишечнике карпа часто паразитируют различные виды гвоздичниковых (роды *Khawia*, *Saurophyllaeus*). Представителей рода *Bothriocephalus* можно встретить и у пресноводных (*B. acheilognathi*, *B. opsariichthydis*) и у морских рыб (*B. scorpii*). В мышцах многих морских рыб паразитируют личинки цестод. В полости тела многих карповых часто обнаруживают плероцеркоидов ремнецов *Ligula intestinalis* и *Digamma interrupta*, а в полости тела осетровых — половозрелых *Amphilina foliacea*, имеющих необычную для ленточных форму.

2. Изучение живых паразитов. Выделенного, освобожденного от слизи и отмытого паразита помещают на предметное стекло в каплю чистой воды. Накрывают покровным стеклом (если гельминт большой, то предметным), рассматривают под лупой и биноклем наличие или отсутствие членистости, строение головки, прикрепительных органов на ней.

3. Приготовление окрашенных препаратов. Для определения вида ленточных червей недостаточно изучить живых паразитов, так как у них не всегда видно строение головки, внутренних органов, что очень важно для выяснения систематического положения паразита. Поэтому ленточных червей обязательно окрашивают. Наиболее эффективна окраска квасцовым кармином (см. занятие 43).

4. Определение паразитов. Изготовленные препараты рассматривают под биноклем, а также под малым (7×9) и большим (7×40) увеличением микроскопа. Внимательно изучают строение головки: наличие и количество присосок, ботридий, крючьев, количество члеников в стробиле, а также строение половой системы: расположение и количество желточников и семенников, строение матки, яичников. Зарисовывают с помощью рисовального аппарата все перечисленные признаки паразита и с помощью определителя выясняют видовую принадлежность гельминта, записав это на этикетке препарата. Результаты работы оформляют в тетради для лабораторных записей.

5. Просмотр и зарисовка готовых препаратов из коллекции.

1. Какие роды ленточных червей паразитируют у рыб?
2. По каким признакам различают роды ленточных червей?
3. Где локализуются ленточные черви у рыб?
4. Как протекает жизненный цикл ленточных червей?
5. Чем и как фиксируют ленточных червей?
6. Как готовят окрашенный препарат?
7. В какую среду закладывают постоянный препарат?
8. Какие признаки необходимо изучить, чтобы определить вид паразита?
9. Каковы органы прикрепления у ленточных червей и где они расположены?
10. Как устроена половая система ленточных червей?

## Занятие 46. Нематоды, или круглые черви, рыб

**Содержание.** Сбор и фиксация, приготовление временных и постоянных препаратов, изучение морфологических особенностей нематод, определение их до вида.

**Материальное обеспечение.** См. занятие 37, кроме покровного стекла со шлифованным краем, материальной банки для хранения мазков, лимоннокислого натрия, метилового спирта, формалина, жидкости Шаудина, и дополнительно окуляр- и объектмикротры, спиртовка, пробирки (поплавки), жидкость Барбагалло, молочная кислота, дистиллированная вода и физиологический раствор, глицерин-желатин, этиловый спирт 70°-ный, рисовальный аппарат и столик, листы белой бумаги, лоток для препаратов, коллекция нематод, живая или охлажденная рыба, фиксированные гельминты, определители паразитов пресноводных и морских рыб.

**Организация и проведение работы.** Нематоды — класс круглых червей, паразитирующих у представителей многих рыб. Тело нематод удлинненное, нитевидное или веретеновидное (рис. 97), всегда круглое в поперечном сечении, с хорошо развитым кожно-мускульным мешком. Плотная эластичная кутикула у некоторых видов образует шипики, крючья, бугорки или валики.

На головном конце тела расположено ротовое отверстие, которое обычно окружено губами и сосочками. Структура губ, количество и расположение позади их органов химического чувства — амфид — имеют важное диагностическое значение. Пищеварительная система состоит из пищевода, среднего и заднего отделов кишечника. Передний отдел пищевода образует стому или ротовую полость, задний — желудочек. У аскаридат (рис. 98) в местах перехода пищевода в среднюю кишку имеются слепые пищеводный и кишечный выросты, которые служат важным диагностическим признаком рода этих червей. За анальным отверстием, которым заканчивается кишечник, расположена хвостовая часть тела; форма и размер хвоста, а также наличие боковых желез (фазмид) имеют важное систематическое значение.

Нематоды раздельнополы. Самцы обычно меньше самок. Половая система самцов непарная и представлена трубчатым семенником и семяпроводом (см. рис. 98). Самцы имеют вспомогательные органы — подвижные спиккулы, служащие для раздвижения полового отверстия и удержания самки. Женская половая система состоит из парных яичников, яйцеводов и маток, соединяющихся в непарный

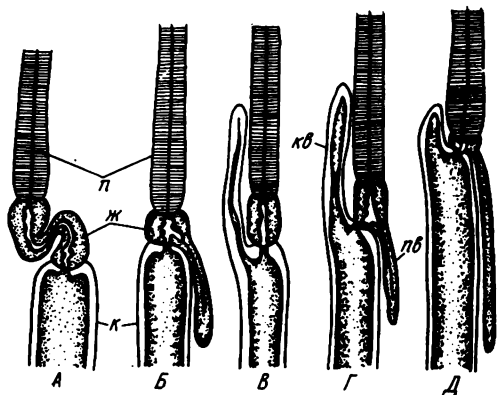
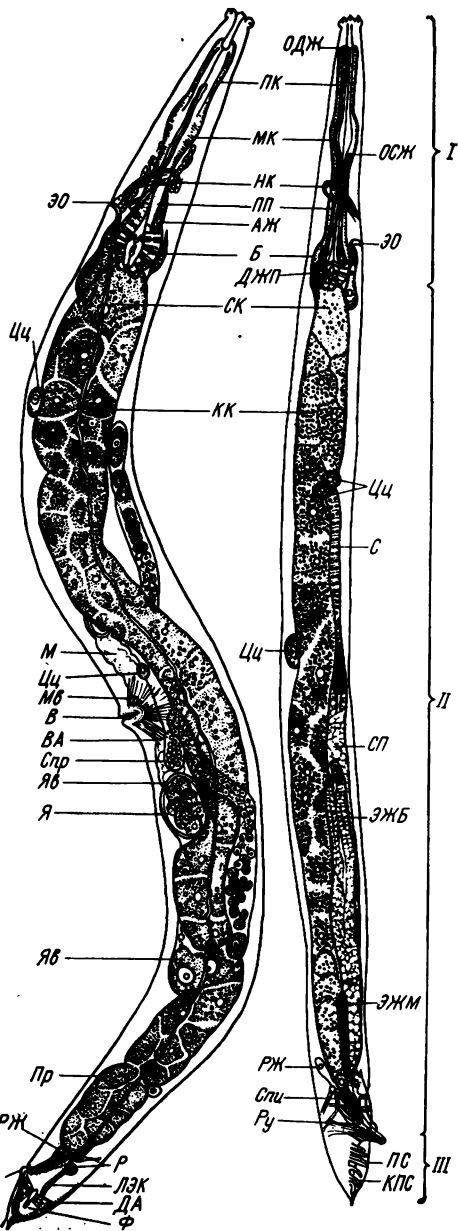


Рис. 98. Схема строения передней части пищеварительного канала у аскаридат:

А — *Anisakis*; Б — *Raphidascaris*; В — *Pogonascaris*; Г — *Contraascaris*; Д — *Goesia*; л — пищевод; ж — желудочек; к — кишечник; кв — кишечный вырост; лв — пищеводный вырост (из Мозгового, 1951)

Рис. 97. Общий вид и строение нематод (самка и самец):

А — анус; АЖ — амфидальная железа; Б — бульбус пищевода; В — вульва; ДА — депрессор ануса; ДЖП — дорсальная железа пищевода; КК — кардинальная область кишечника; КПС — крылья половых сосочков; ЛЭК — латеральный экскреторный канал; М — матка; Мв — мышцы вульвы; МК — метакорпус пищевода; НК — нервное кольцо; ОДЖ — отверстие дорсальной железы пищевода; ОСЖ — отверстие субвентральной железы пищевода; ПК — прокорпус пищевода; ПП — перешеек пищевода; Пр — преректум; ПС — половые сосочки; Р — ректум; РЖ — ректальные железы; Ру — рулек; С — семенник; СК — средняя кишка; Спр — семяприемник; Сли — спикула; СП — семявыносящий проток; Ф — фазиды; Цц — целомодиты; ЭЖБ — большая эйякулярная железа; ЭЖМ — малая эйякулярная железа; ЭО — экскреторное отверстие; Я — яйцо; Яв — яйцевод (из Читвуд, Читвуд, 1950)

канал — вагину, которая открывается на брюшной стороне тела половым отверстием — вульвой. Местонахождение вульвы имеет важное систематическое значение. Большинство нематод яйцекладущие, однако есть и живородящие виды. Яйца плотные, часто с волосками и филоментами. Форма и размер яиц значительно варьируют, что имеет определенное значение.

Развитие нематод происходит со сменой хозяев. Промежуточными хозяевами нематод рыб являются в основном ракообразные (Copepoda, Amphipoda), а также личинки насекомых и олигохеты. В полости тела промежуточного хозяина происходит рост личинок, который сопровождается линькой, после чего они становятся инвазионными. Окончательным хозяином могут служить рыбы, водоплавающие птицы или морские млекопитающие.

Личинок нематод чаще можно обнаружить во внутренних органах (*Raphidascaris acus*) полости тела рыбы, реже в мускулатуре и кишечнике (филометроидесы у карповых рыб, представители анизакид у морских рыб). Половозрелые черви локализуются различно: под эпителием покровов тела рыбы (*Cystoopsis acipenseris* у осетровых), в чешуйных кармашках, плавниках и глазах (самки филометроидесов), кишечнике рыб (*Raphidascaris acus*, представители рода *Samallanus* у пресноводных и рода *Cuccullanus* у морских рыб) (рис. 99). Встречаются они также в полости тела (*Skrjabillanus amuri*), стенках плавательного пузыря (самцы филометроидесов у карповых рыб) и его полости (*Cystidicola farionis* у многих лососевых и сиговых).

Порядок проведения работы следующий.

1. Сбор материала. Живую рыбу обездвиживают и кладут в кювету. Тщательно осматривают рыбу, обратив особое внимание на внутреннюю сторону жаберных крышек, чешуйные кармашки и плавники. Обнаруженных червей препаровальными иглами выделяют из ткани, переносят в каплю физиологического раствора и освобождают их от слизи и остатков тканей хозяина. Помещают в солонку с физиологическим раствором и метят временной этикеткой. Вскрывают рыбу и внимательно осматривают стенки брюшной полости, печени, гонады, брыжейку. Обнаруженных нематод переносят в солонку с физиологическим раствором или в каплю воды на предметное стекло. Компрессионным способом просматривают внутренние органы — печень, брыжейку, гонады и плавательный пузырь. Готовят соскоб с внешней и внутренней поверхностей плавательного пузыря и просматривают его под МБС на наличие скробилянусов и самцов филометроидесов. Червей, выделенных из различных органов и тканей рыбы, обрабатывают и хранят в дальнейшем отдельно. Вскрывают кишечник и просматривают его внутренние стенки и содержимое. При наличии червей их выделяют на предметное стекло, очищают и переносят в солонку с водой.

2. Изучение живых паразитов. Освобожденного от слизи червя помещают в каплю воды на предметное стекло (филометроидесов помещают в физиологический раствор). Стекло переносят под МБС

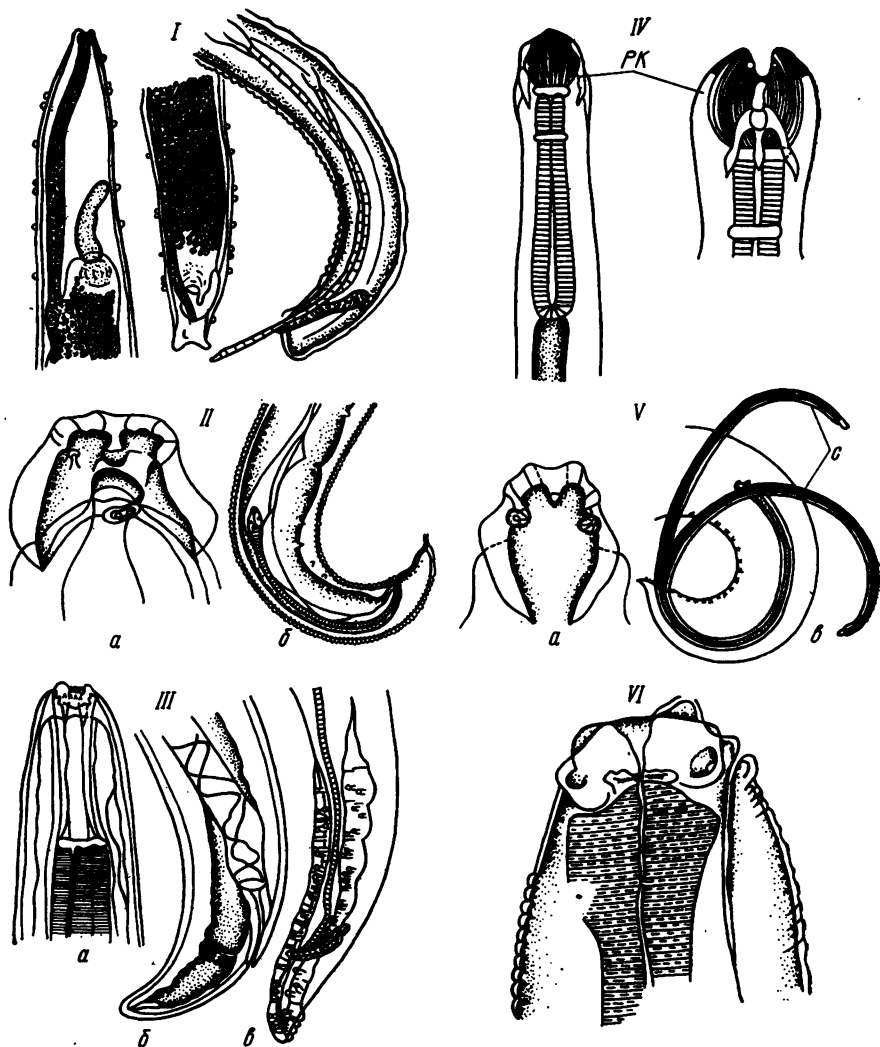


Рис. 99. Нематоды рыб:

*I* — *Philometroides lusiana* (из Висманья, 1967); *II* — *Raphidascaris acus* (из Мозгового, 1963); *III* — *Cystidicola farionis* (из Спасского и Раковой, 1958); *IV* — *Camallanus truncatus*; *V* — *Contracaecum aduncum* (из Мозгового, 1951); *VI* — головной конец личинок рода *Anisakis* (из Найденовой и Николаевой, 1968); *а* — передний конец тела самки; *б* — задний конец тела самки; *в* — задний конец тела самца; *рк* — ротовая капсула; *с* — спикулы

и рассматривают общий вид нематоды, отметив ее морфологические особенности (форму тела, строение головного и хвостового отделов, наличие фазмид, спикул, папил и т. д.). Если под МБС находится половозрелая самка, то препаровальной иглой надрывают заднюю часть ее тела в районе матки. Вышедшие в каплю яйца или сформированных личинок переносят на другое предметное стекло, покрывают покровным стеклом и рассматривают под МБС и малым увеличением микроскопа. Зарисовывают и измеряют части тела червей.

3. Фиксация и приготовление тотальных препаратов. Из личинок и очень мелких нематод готовят глицерин-желатиновые препараты так же, как из моногеней (см. занятие 44). Более крупных и плотных нематод фиксируют горячим спиртом или жидкостью Барбагалло. Зафиксированных червей с этикетками помещают в пробирки с фиксирующим раствором на хранение.

4. Определение паразитов. Зафиксированных червей переносят на часовое стекло (солонку) и заливают концентрированной молочной кислотой для просветления. Время просветления — от нескольких часов до нескольких суток в зависимости от размеров червя. После просветления червя помещают на предметное стекло в каплю молочной кислоты, под МБС и микроскопом изучают его внутренние морфологические структуры (строение ротового отверстия, пищеварительной и половой систем и др.). Записывают особенности их строения в рабочую тетрадь. С помощью определителя устанавливают видовую принадлежность паразита. Зарисовывают с помощью рисовального аппарата наиболее характерные признаки вида червя. Оформляют этикетку с указанием вида червя, его локализации, а также вида, места и даты отлова рыбы. Этикетку и червя помещают в пробирку с фиксатором для дальнейшего хранения или приготовления тотального препарата. Нематод, заключенных в глицерин-желатин, изучают непосредственно на препаратах. Просматривают препараты из коллекции нематод. Отмечают их морфологические особенности. Зарисовывают некоторые из них с помощью рисовального аппарата.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 7, 9, 11, 36, 37, 48]

1. Какие систематические признаки характерны для класса нематод?
2. В чем заключается особенность строения кишечника у аскаридат?
3. Как размножаются нематоды? Где развиваются их личинки?
4. Каковы основные места паразитирования личинок и взрослых нематод рыб?
5. Чем фиксируют нематод и как их хранят?
6. Каким образом готовят препараты из личинок и мелких нематод?
7. Каким образом готовят препараты из крупных нематод?
8. Чем просветляют нематод при изучении их внутренней структуры в процессе определения вида?
9. Какие признаки лежат в основе определения нематод до вида?

## Занятие 47. Скребни рыб

**Содержание.** Изучение морфологии и систематики скребней; методы приготовления постоянных и временных препаратов, определение паразитов.

**Материальное обеспечение.** См. занятие 37, кроме покровного стекла со шлифованным краем, материальной банки для мазков, метилового спирта, жидкости Шаудина, и дополнительно окуляр- и объектмикрометры, дистиллированная вода, молочная кислота, глицерин-желатин, квасцовый кармин, этиловый (70°-ный, 80°-ный, 96°-ный) и солянокислый спирты, диметилфталат, бальзам, формалин (4%-ный), рисовальный аппарат и столик, листы белой бумаги, лоток для препаратов, коллекция скребней, живая (охлажденная) рыба или фиксированные гельминты, определители паразитов пресноводных и морских рыб.

**Организация и проведение работы.** Скребни относятся к классу акантоцефал, или колючеголовых — *Acanthocephala*. Тело скребней белого или желтовато-оранжевого цвета, удлинненное, сужающееся к заднему концу (рис. 100). На переднем конце тела имеется вооруженный крючьями хоботок, который втягивается во влагалище. Здесь же располагаются два лемниска. Форма, размер хоботка и крючьев, а также взаимное расположение и количество последних на хоботке являются важными систематическими признаками (рис. 101). Пищеварительная система отсутствует, питание осуществляется осмотическим путем.

Скребни раздельнополы. Половые системы у самца и самки хорошо развиты и сложно устроены. У самцов есть два семенника с выводящими протоками, цементные железы, половая бурса и совокупительный орган. Цементные железы выделяют клейкий секрет, заклеивающий половое отверстие самки после совокупления.

Самка имеет парный яичник, который на ранней стадии развития представлен в виде группы яйцевых клеток. Выводящими аппаратами являются маточный колокол, яйцеводы, матка и влагалище. Структура цементных желез и форма яиц являются систематическими признаками основных подклассов скребней *Echinorhynchinea* и *Neoechinorhynchinea*.

Развитие скребней сложное, с участием промежуточного хозяина, в основном ракообразных (бокоплавов, водяных осликов, ракушечных рачков). В промежуточном хозяине вышедшая из яйца личинка (акантор) развивается в молодого скребня — акантеллу. Рыбы для скребней являются окончательным хозяином, в кишечнике которого черви становятся половозрелыми. Локализуются скребни в кишечнике, желудке или пилорических придатках рыб, нередко вызывая в местах своего прикрепления сильное воспаление.

Наибольшее эпизотическое значение имеют некоторые группы скребней: из рода *Metechinorhynchus* — *M. salmonis* и *M. truttae*, паразитирующие в лососевых и сиговых рыбах, *Pomphorhynchus laevis*, паразитирующий в кишечнике карповых рыб. У многих морских рыб разных широт встречаются *Rhadinorhynchus pristis*. У морских рыб северного полушария широко распространен *Echinorhynchus gadi* (рис. 102).

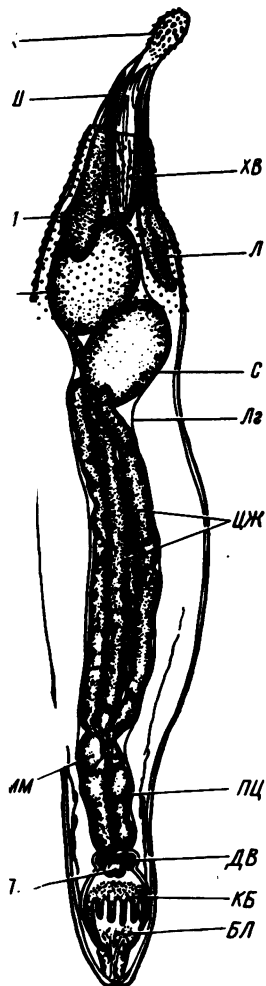


Рис. 100. Общий вид и строение скребня (*Polydora magnus*, самец):

Х — хоботок; Ш — шейка; ХВ — хоботковое влагалище; Л — лемниски; С — семенники; Лг — лигамент; ЦЖ — цементные железы; ММ — мускульный мешок; ПЦ — протоки цементных желез; ДБ — дивертикулы бursы; П — пенис; КБ — копулятивная бурса; БЛ — пальцевидные бурсальные лопасти (из Петроченко, 1956)

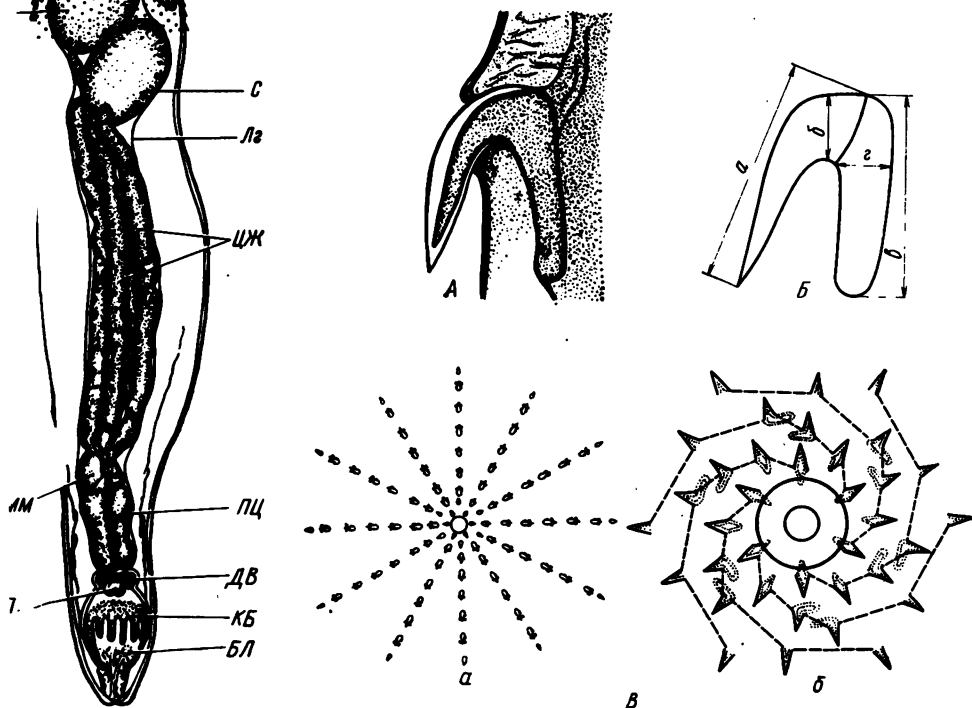


Рис. 101. Вооружение хоботка скребней:

А — продольный разрез крючка и стенки хоботка; Б — схема основных промеров крючка: а — длина острия, б — толщина острия, в — длина корня, г — толщина корня (из Петроченко, 1956); В — схема расположения крючков: а — радиальное (хвинкуцнальное), б — спиральное (из Майер, 1932)

Порядок проведения работы следующий.

1. Сбор материала. Живую рыбу обездвигивают и кладут в кювету. Вскрывают рыбу и выделяют органы пищеварительной системы, переносят их в чашку Петри. Ножницами осторожно производят разрез вдоль кишечника и просматривают его на наличие

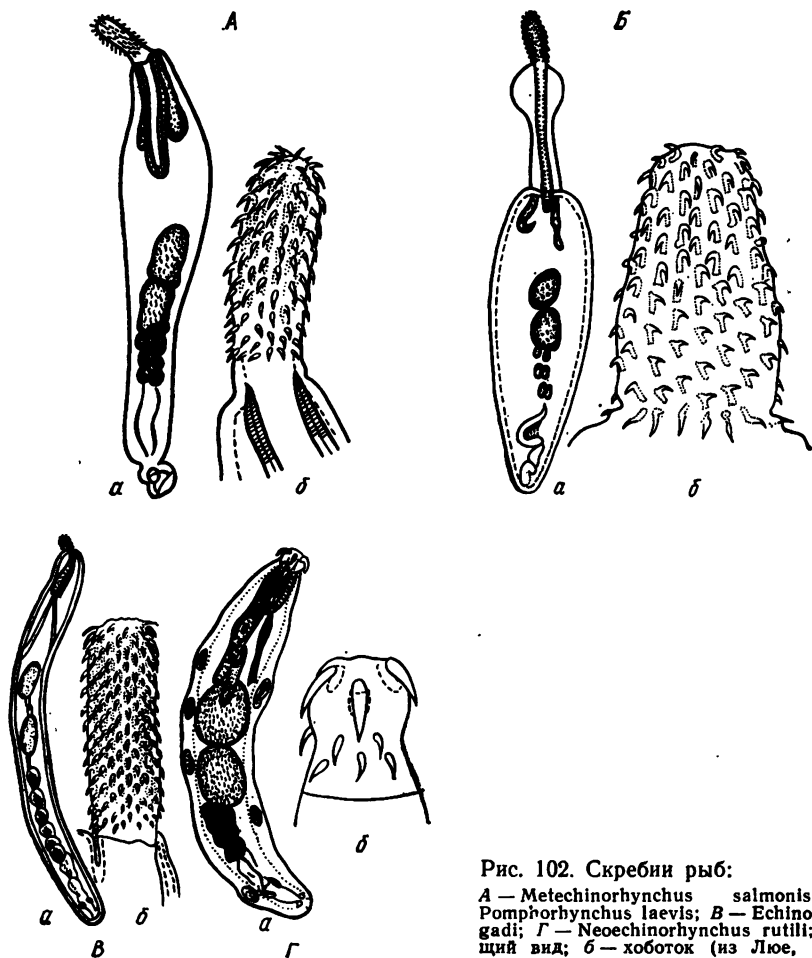


Рис. 102. Скребни рыб:

*A* — *Metechinorhynchus salmonis*; *Б* — *Pomphorhynchus laevis*; *В* — *Echinorhynchus gadi*; *Г* — *Neoechinorhynchus rutili*; *а* — общий вид; *б* — хоботок (из Люе, 1911)

скребней, внедрившихся в стенку кишки. Скальпелем с внутренней поверхности кишечника производят глубокий соскоб (если черви крупные или наблюдается прободение стенки кишечника, выделение гельминтов вместе с хоботками производят с помощью препаровальных игл). Слизь с паразитами переносят в чашку Петри. Добавляют немного воды и препаровальными иглами освобождают червя, причем особенно тщательно его хоботок, от слизи и тканей хозяина.

2. Изучение живых паразитов. Освобожденного от слизи скребня кладут на предметное стекло в каплю воды или молочной кислоты. Стекло помещают под МБС и рассматривают червя. Препаровальными иглами расправляют тело червя, его хоботок и накрывают покровным или другим предметным стеклом, слегка придавив передний конец, чтобы хоботок оставался вывернутым.

Рассматривают и зарисовывают общий вид скребня, хоботок и расположение на нем крючьев. Зарисовывают форму и измеряют хоботок и крючья.

3. Приготовление тотальных препаратов. Отмытого, с тщательно очищенным хоботком скребня помещают на предметное стекло в каплю воды, переносят под МБС, накрывают другим предметным стеклом, помещая сверху небольшой грузик (если червь крупный, то масса груза может достигать 1 кг и выше), добившись, чтобы хоботок был вывернут наружу, а тело червя хорошо сдавлено. Фиксируют червя спиртом (70%-ным) или формалином (4%-ным), подпуская из пипетки фиксатор между стеклами. Время фиксации до 1 ч. Зафиксированного в таком положении скребня можно длительное время хранить в пробирке с фиксатором. После фиксации червя переносят в солонку с дистиллированной водой и тщательно (в течение 0,5—2 ч) отмывают от фиксатора.

Последующую окраску скребней, дифференцировку в солянокислом спирте, обезвоживание, просветление и заключение в балъзам осуществляют, как и при работе с трематодами (см. занятие 43). Однако приготовление тотального препарата из скребней требует большего времени и тщательности, так как покровы скребней труднопроницаемы. Просветление следует проводить особенно тщательно, добиваясь полной пропитки червя диметилфталатом. Однако окраска скребней необязательна. Просветленных в молочной кислоте червей можно заключать в глицерин-желатин.

4. Определение паразитов. Препарат из скребня помещают под МБС или микроскоп и рассматривают внутреннее строение червя и его хоботок. Производят необходимые измерения тела скребня, его хоботка и отдельного крючка, обратив внимание на строение его внутреннего отростка. Определяют схему расположения крючьев на хоботке. Изучают внутреннее строение червя: отмечают морфологические особенности строения половой системы, наличие яиц у самки, их форму и размеры. С помощью определителя выясняют видовую принадлежность скребня. Зарисовывают наиболее характерные морфологические особенности в строении червя. Составляют этикетку к препарату. Результаты работы оформляют в тетради. Просматривают коллекцию готовых препаратов из скребней рыб. Выясняют их систематическое положение до вида.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 7, 9, 11, 36, 37]

1. Представители каких подклассов скребней паразитируют у рыб? Каковы их систематические признаки?
2. Что является органом прикрепления скребней?
3. Каков цикл развития скребней?
4. Где локализуются скребни у рыб?
5. Как выделяют скребней из тканей хозяина?
6. Чем и каким образом производится фиксация червей?
7. Каковы основные процессы изготовления тотальных препаратов из скребней? Какой краситель используют?
8. Какие систематические признаки лежат в основе видового определения скребней?

## З а н я т и е 48. Пиявки рыб

**Содержание.** Сбор, фиксация, изучение морфологии, приготовление препаратов и определение паразитов.

**Материальное обеспечение.** См. занятие 37, кроме покровного стекла со шлифованным краем, материальной банки для хранения мазков, лимоннокислого натрия, метилового спирта, формалина, жидкости Шаудина, и дополнительно ручная лупа, окуляр- и объектмикрометры, чашка Петри с застывшим слоем парафина на дне, банки из темного стекла с притертыми пробками на 50 и 100 мл, марля, вата, фильтровальная бумага, дистиллированная вода, квасцовый кармин, этиловый 80°-ный, 90°-ный, 96°-ный и солянокислый спирты, диметилфталат, канадский бальзам, глицерин, рисовальный аппарат и столик, листы белой бумаги, весы, живая, только что пойманная рыба, определители паразитов пресноводных и морских рыб.

**Организация и проведение работы.** Пиявки *Hirudinea* принадлежат к классу кольчатых червей (*Annelides*). Это широко распространенные животные, некоторые из них паразитируют у рыб во многих пресных и морских водоемах. Тело пиявок короткое, плоское или длинное, уплощенное, реже цилиндрическое (рис. 103). На концах тела обычно расположены передняя и задняя присоски, являющиеся органами прикрепления пиявок. У многих видов на передней присоске имеются глаза (рис. 104), на задней — глазоподобные пятна (рис. 105).

Тело пиявок состоит из сомитов, число которых, как и число колец внутри «полных» сомитов (в середине тела), является систематическим признаком вида.

Пищеварительная система представлена ротовой полостью, глоткой, пищеводом, желудком и кишкой. Строение переднего отдела пищеварительного аппарата является одним из важнейших систематических признаков, по которым типичных пиявок делят на два отряда: хоботные пиявки и бесхоботные пиявки. У хоботных пиявок ротовая полость разрастается вокруг глотки, которая принимает вид подвижной мускулистой трубки, служащей для прокалывания покровов жертвы и всасывания крови. У бесхоботных пиявок в глотке образуются 3 валика, снабженных у кровососущих видов зазубренными пластинками — челюстями. Желудок у большинства пиявок имеет парные слепые отростки.

Пиявки — гермафродиты. Мужская половая система представлена семенными мешками (4—12 пар и более), расположенными в средней и задней частях тела. Выходящие из них семявыводящие каналы впадают в семяпроводы, которые образуют семенные резервуары, переходящие в мускулистые семяизвергательные каналы. Концевые отделы последних открываются в непарный атриум.

Женская половая система представлена двумя яйцевыми мешками и яйцеводами, которые, сливаясь, образуют короткое влагалище.

Развитие пиявок происходит прямым путем: после оплодотворения в женской половой системе образуются яйца, которые пиявки откладывают в коконы и прикрепляют их к различным подводным

Рис. 103. Форма тела пиявок:

А — плоское короткое тело не разделенное на «шею» и «туловище»; Б — то же, но резко разделенное на «шею» и «туловище», с крупными боковыми пузырями; В — длинное цилиндрическое тело, не разделенное на «шею» и «туловище», с маленькими боковыми пузырями. *пл* — передняя присоска; *зп* — задняя присоска; *ш* — «шея»; *л* — пояссок; *т* — туловище; *бп* — боковые пузыри (из Быховского, 1962)

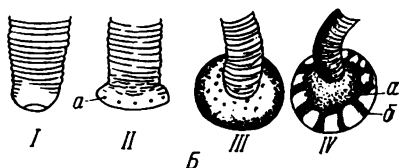
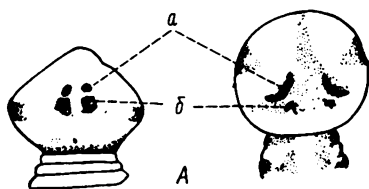
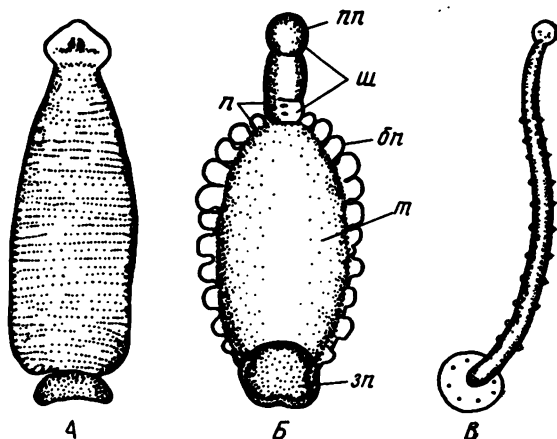


Рис. 104. Строение отдельных частей тела пиявок:

А — передние присоски и глаза пиявок: *а* — первая, *б* — вторая пара глаз; Б — задние присоски (з. п.) пиявок: I — з. п., составляющая прямое продолжение тела, II — маленькая з. п., III — большая з. п., прикрепленная к телу центрально, IV — большая з. п., прикрепленная к телу эксцентрично, *а* — глазоподобные пятна, *б* — радиальные пигментные полосы, В — определение числа колец в сомите: *а* — по боковым пузырям; *б* — по окраске; *в* — по чередованию колец (из Быховского, 1962)



предметам, растениям или к почве у берега. Из яиц выходят вполне сформировавшиеся пиявки.

Большинство из них — кровососущие формы. Многие пиявки — временные паразиты, связанные с рыбой только во время питания (например, *Piscicola geometra*) и лишь некоторые из них проводят основное время своей жизни на хозяине (*Piscicola respirans*, *Limnotrachelobdella sinensis*). Эпизоотическое значение для пресноводных рыб имеют лишь несколько видов (*Acanthobdella peledina*, *Piscicola geometra* и др.). Вызываемые пиявками заболевания рыб называют бделлозами (см. рис. 105).

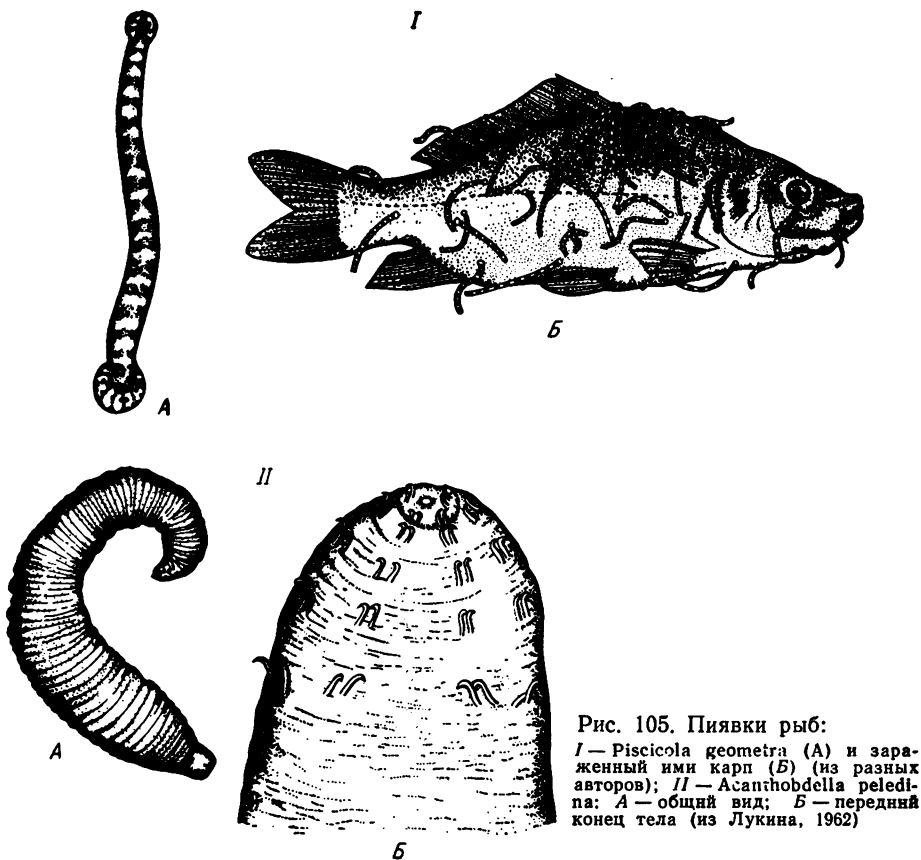


Рис. 105. Пиявки рыб:  
 I — *Piscicola geometra* (A) и зара-  
 женный ими карп (B) (из разных  
 авторов); II — *Acanthobdella peledina*:  
 A — общий вид; B — передний  
 конец тела (из Лукина, 1962)

Порядок проведения работы следующий.

1. Сбор фиксации и хранение материала. Живую рыбу обездвиживают и кладут в кювету. Тщательно (с использованием ручной лупы) осматривают рыбу: плавники, поверхность тела, ротовую полость, жабры и жаберные крышки. Обнаруженных пиявок пинцетом переносят в солонки с водой. Метят их временными этикетками и отмечают в тетради естественную окраску червей. Фиксируют пиявок, используя один из фиксаторов — 1—2%-ный формалин или 70°-ный спирт. Время окончательной фиксации 1—2 ч и более. На хранение червей переносят в 4%-ный формалин или новый раствор 70°-ного спирта и помещают в темноту, чтобы материал не обесцветился на свету.

Из мелких пиявок готовят тотальные препараты с окрашиванием и последующим заключением в бальзам, как при работе с трематодами (см. занятие 43).

2. Определение паразитов. Пиявок изучают на фиксированном (реже живом) материале. Зафиксированного червя

переносят на предметное стекло и накрывают сверху другим. Помещают паразита под МБС и, слегка придавливая, изучают его наружное строение. Отмечают форму и размер тела, присосок, устанавливают общее число сомитов и количество колец в одном полном сомите, наличие щетинок, глазков, глазных пятен и т. д. Все эти данные заносят в рабочую тетрадь. Для выяснения некоторых признаков (например, наличие и расположение глазков и др.) полезно просветлять целых пиявок или части их в глицерине (выдерживая их в глицерине в течение нескольких часов). С помощью определителя выясняют видовую принадлежность пиявки, проводя с линейкой и окуляр-микрометром необходимые промеры. Зарисовывают отдельные, наиболее характерные морфологические структуры вида. Делают соответствующую этикетку на препарат.

В некоторых случаях вскрывают червей, чтобы выяснить особенности строения пищеварительной, половой и других систем. С этой целью кладут червя в чашку Петри с застывшим на дне воском (желательно темного цвета) и помещают под МБС; острым скальпелем надрезают кожные покровы, изолируют нужные части червя; при помощи препаровальных игл постепенно расщепляют ткани, осторожно изолируя различные органы для последующего изучения и зарисовки их. Просматривают пиявок рыб из коллекции. Выясняют их систематическое положение.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 7, 9, 36, 37]

1. Представители каких подклассов паразитируют у рыб?
2. Каковы основные наружные морфологические признаки, характерные для пиявок?
3. В чем заключаются особенности строения пищеварительной системы пиявок и ее систематическое значение?
4. Как размножаются пиявки?
5. Какие пищевые связи существуют у пиявок с хозяином (рыбой)?
6. Чем фиксируют пиявок и как хранят собранный материал?
7. Какие методы исследования используют при изучении внутреннего строения пиявок?

#### МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ДРУГИМИ ГРУППАМИ ЖИВОТНЫХ

Помимо паразитов, возбудителей болезней, перечисленных в предыдущих разделах, болезни рыб иногда вызывают и представители других типов животных, например ракообразные, кишечнополостные и моллюски.

В классе ракообразных (Crustacea) объединены свободноживущие и паразитирующие виды. Паразитические ракообразные произошли от свободноживущих. Паразитический образ жизни часто до неузнаваемости изменяет общий вид рачка, особенно форму его тела, которая значительно варьирует. С одной стороны, происходит упрощение их морфологии: сливаются сегменты тела, редуцируются конечности и изменяется их функция, меняется форма тела, с другой — дифференцируются органы прикрепления, появляются роговидные выросты, присосковидные образования, реду-

цируются органы чувств, нервная система, однако особенно значительно развивается половая система. Тело ракообразных членистое, состоит из различного числа сегментов, которые образуют голову, грудь и брюшко. Иногда сегменты головы и груди сливаются, образуя головогрудь. Каждый сегмент тела, кроме последнего, несет пару членистых конечностей и только у низших раков на сегментах брюшка конечности отсутствуют. На голове расположены две пары антенн, мандибулы (жвалы) и две пары челюстей (максилл). Тело рачков покрыто хитинизированной кутикулой, которую рачок по мере роста сбрасывает и заменяет новой.

Пищеварительная система свободноживущих раков хорошо развита. Имеются нервная и выделительная системы, органы чувств, глаза. Раки раздельнополы. Часто четко выражен половой диморфизм. Оплодотворенные яйца откладываются в воду, приклеиваются к различным предметам или конечностям самки или вынашиваются самками в специальных яйцевых мешках. Развитие раков происходит прямым путем с метаморфозом. Паразитические ракообразные распространены довольно широко в естественных водоемах (реках, озерах, водохранилищах) и прудовых хозяйствах, а также морях. Однако массовые заболевания вызывают лишь отдельные представители этого многочисленного класса. Поскольку развитие ракообразных происходит без участия промежуточных хозяев, то при плотных посадках рыбы в озерах, озерно-товарных и прудовых хозяйствах создаются благоприятные условия для накопления возбудителя и возникновения болезни.

Наиболее часто наблюдают эргазилез в пресных естественных водоемах у пеляди и других сиговых, а также у лососевых рыб. Калигоз отмечен в солоноватых водах. Лернеоз и аргулез часто возникают в прудовых хозяйствах у любых культивируемых там видов рыб. С аргулезом нередко связаны значительные потери рыбы, особенно молоди. У морских рыб паразитические раки встречаются довольно часто, особенно представители веслоногих (*Penella*, *Sphirion* и др.), однако заболевания отмечаются редко.

Единственный паразит рыб из кишечнополостных — полип *Polypodium hydriforme* — локализуется в икринках различных видов осетровых и вызывает их гибель.

Личиночные стадии двустворчатых моллюсков — глохидии — также иногда вызывают заболевания, поселяясь на жабрах и поверхности тела, особенно молоди рыб различных видов. Эти болезни распространены не очень широко и не носят массового характера, однако в отдельных случаях регистрируют именно болезнь, а не паразитоносительство.

### **З а н я т и е 49. Ракообразные паразиты рыб**

**Содержание.** Сбор, фиксация паразитических моллюсков — глохидии — разных систематических групп, методы приготовления препаратов, определение паразитов.

**Материальное обеспечение.** См. занятие 37, кроме покровного стекла со шлифованным краем, материальной банки для хранения мазков, лимоннокислого

натрия, метилового спирта, жидкости Шаудина, и дополнительно окуляр- и объектмикрометры, рисовальный аппарат, спиртовка, иммерсионное масло, замазка для препаратов, глицерин-желатин, глицерин, 70°-ный и 96°-ный этиловый спирт, жидкость Калецкой, канадский бальзам, лоток для препаратов, живая рыба, готовые препараты ракообразных, определители паразитов пресноводных и морских рыб.

**Организация и проведение работы.** Паразитирующие у рыб ракообразные (Crustacea) делятся на два подкласса (низших и высших) и относятся к отрядам веслоногих (Copepoda), жаброхвостых (Branchiura) и равноногих (Isopoda).

Наиболее распространены среди паразитов рыб веслоногие раки. Представители семейства Ergasilidae имеют циклопообразную форму тела, расширенную на переднем и суженную на заднем конце (рис. 106). Тело их, покрытое хитинизированной кутикулой, состоит из нескольких сегментов, составляющих голову и брюшко, которое у самок имеет три, а у самцов — четыре сегмента. На переднем конце тела расположены один глаз, две пары антенн, при этом вторые служат для прикрепления к хозяину. Они состоят из 3—4 члеников и заканчиваются изогнутым когтем. Имеется пять пар плавательных ножек. Яйцевые мешки парные, яйца расположены в них продольными рядами. Самцы похожи на самок, но в отличие от них ведут свободный образ жизни.

У некоторых веслоногих сохраняется сходство со свободноживущими (роды Ergasilus, Sinergasilus), у других тело приобретает червеобразную (роды Lernaea, Penella) или мешковидную форму, при этом плавательные ножки редуцируются (роды Achteres, Vasanistes). Форма тела и строение прикрепительных органов имеют важное систематическое значение.

У эргасилиуса они имеют вид когтей, у лерней — хитинового якоря или рогов, с помощью которых паразит закрепляется на теле хозяина. У представителей рода Achteres отмечены рукоподобные образования, на конце которых имеется булавовидный или присосковидный прикрепительный аппарат и др.

Жаброхвостые раки (отряд Branchiura) представлены в СССР одним родом Argulus. Тело аргулюса покрыто сплюснутым, округлым хитиновым щитом. Антенны имеют вид изогнутых прикрепительных крючков. Имеются парные присосковидные органы, колющий хоботок и два темных фасеточных глаза, четыре пары двуветвистых плавательных ножек. Яйцевых мешков нет. Паразитируют самки и самцы. Виды рода Argulus дифференцируются по размерам тела, строению брюшка («хвостового плавника»), на конце которого имеются две различные по величине и форме округлые лопасти (рис. 107).

Развитие веслоногих и жаброхвостых происходит с метаморфозом. Для личиночных стадий, науплиальных и копеподитных, характерен один глаз. Они свободно плавают в воде, растут, многократно линяя, созревают. Здесь же происходит оплодотворение, и лишь потом рачки переходят к паразитированию (у веслоногих — только самки, у жаброхвостых — самки и самцы).

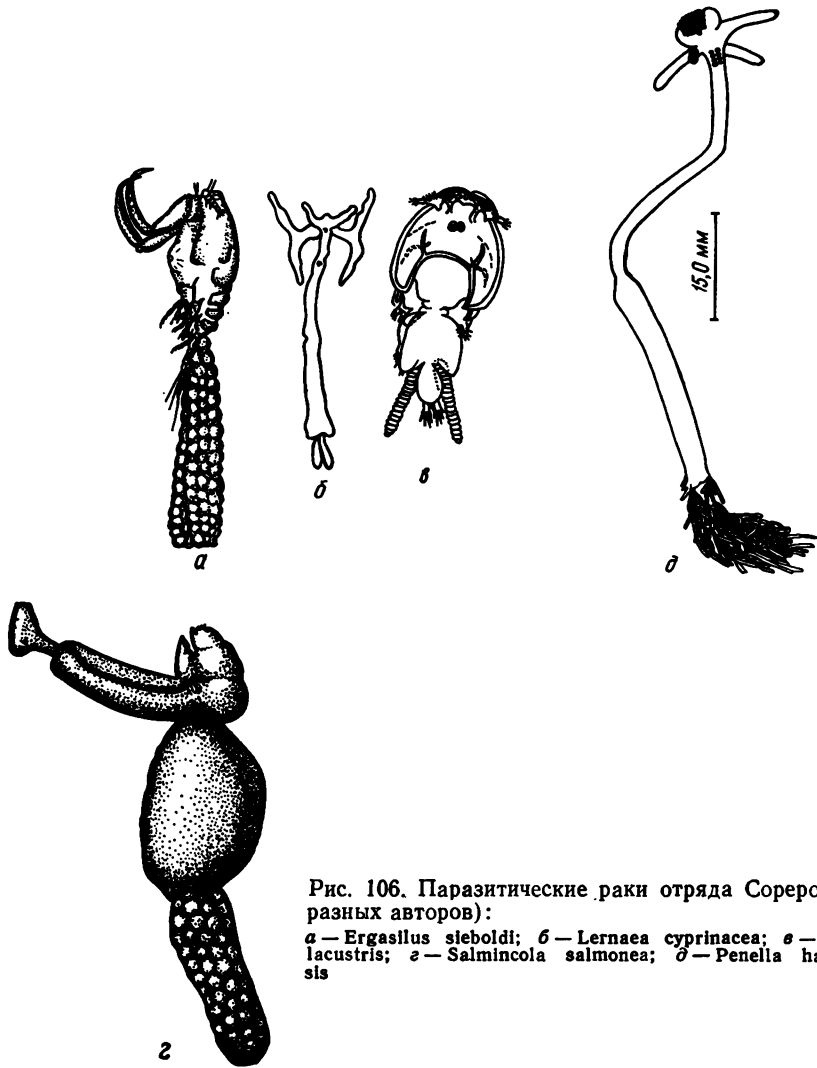


Рис. 106. Паразитические раки отряда Sorcopoda (из разных авторов):

*а* — *Ergasilus sieboldi*; *б* — *Lernaea cyprinacea*; *в* — *Caligus lacustris*; *г* — *Salmincola salmonea*; *д* — *Penella hawaitensis*

Тело равноногих раков (Isopoda), чаще встречающихся у морских рыб, сплющено, сегментировано. Грудной отдел состоит из 7, брюшной из 6 сегментов. Голова и грудь сливаются, образуя головогрудь. Грудные и брюшные сегменты тела несут одно- и двуветвистые ножки. Брюшные сегменты тела часто редуцируются, а грудные превращаются в прикрепительные органы. На голове имеется две пары антенн, превращенных в сосательный аппарат.

При изучении рачков следует обращать внимание на форму и размеры тела, характер сегментации, соотношение размеров тела, строение конечностей и прикрепительных органов и яйцевых мешков.

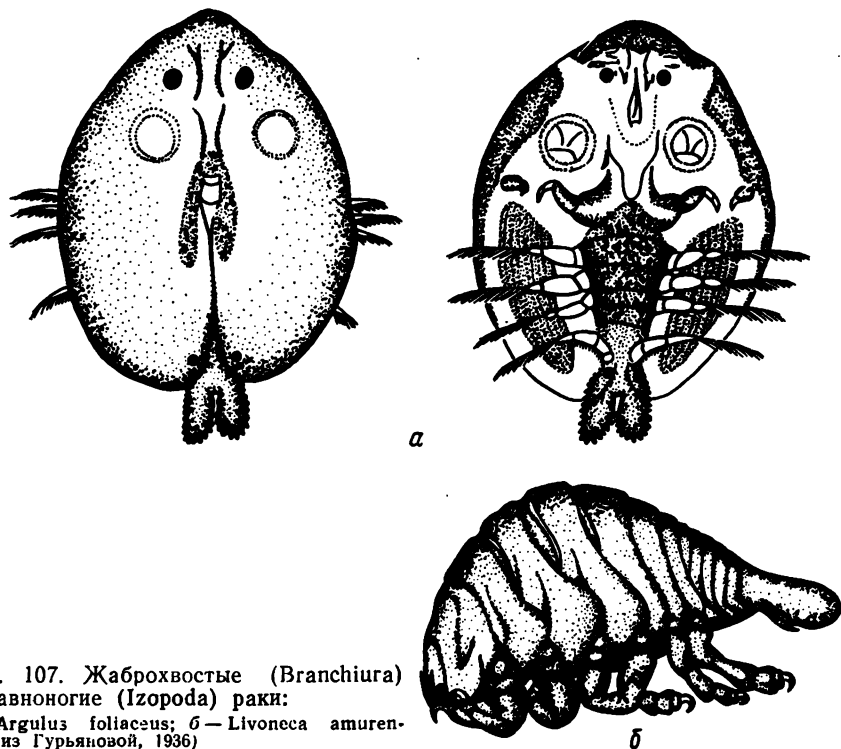


Рис. 107. Жаброхвостые (Branchiura) и равноногие (Isopoda) раки:

а — *Argulus foliaceus*; б — *Livoneca amurensis* (из Гурьяновой, 1936)

У рыб пресных вод наиболее распространены представители родов *Ergasilus*, *Sinergasilus*, *Lernaea*, *Caligus*, *Achteres*, *Tracheiastes*, относящихся к отряду *Copepoda*, а также рода *Argulus* из отряда жаброхвостых (*Branchiura*). У морских рыб помимо названных родов копепод часто паразитируют представители родов *Sphyrion*, *Penella*, *Lernaenicus* и др., а также некоторые из равноногих раков.

Порядок проведения работы следующий.

1. Сбор материала. Живую рыбу обездвигивают, кладут в кювету. Внимательно осматривают поверхность тела, а также жаберные крышки. Далее отрезают плавники, помещают на стекло, смочив водой. Затем делают соскоб с поверхности тела, ротовой полости, плавников и, смочив водой, рассматривают под биноклем. На поверхности тела пресноводных рыб можно обнаружить рачков из родов *Lernaea*, *Caligus*, *Tracheiastes*, *Argulus*, морских рыб — рачков из родов *Penella*, *Leprophtherius*, *Sphyrion* и др. В ротовой полости и на жабрах лососевых нередко находят рачков из рода *Salmincola*, тресковых — из рода *Caligus*. На глазах и других участках головы сельдей находят рачков из рода *Lernaenicus*.

Всех рачков, обнаруженных на поверхности тела, осторожно снимают препаровальными иглами, надрезая при необходимости ткани хозяина в месте прикрепления паразита, с тем чтобы выделить неповрежденным головной конец паразита, который играет важную роль в определении вида. Снятых паразитов помещают сначала в солонку (или часовое стекло) с чистой дистиллированной водой и с помощью пинцета и тонких препаровальных игл освобождают от остатков тканей, слизи.

Далее аккуратно вырезают жаберные дуги (см. с. 190), помещают на стекло для вскрытий, смачивают водой из пипетки. Вначале осматривают их невооруженным глазом, а затем под лупой или биноклем, осторожно раздвигая жаберные лепестки иглами. Обнаруженных паразитов аккуратно снимают препаровальными иглами или пинцетом и переносят в чистую воду.

На жаберных лепестках пресноводных рыб могут быть обнаружены представители рода *Ergasilus*, *Sinergasilus*, *Achteres*, *Salpincola*, морских рыб — представители родов *Lernaeocera*, *Caligus* и др.

2. Изучение живых паразитов. Выделенного рачка помещают на предметное стекло в каплю чистой воды и рассматривают под лупой или биноклем, а отдельные детали — под малым увеличением микроскопа, предварительно прикрыв рачка покровным стеклом, но не придавливая его, с тем чтобы не повредить хрупкую хитинизированную кутикулу, покрывающую тело рачка. Внимательно рассматривают форму тела, строение прикрепительного аппарата, наличие и количество сегментов, парных яйцевых мешков. Зарисовывают основные систематические признаки.

3. Фиксация, определение паразитов и приготовление постоянных препаратов. Не всегда удается определить вид паразита на живом материале. Часто это удобнее сделать на фиксированном. Рачков фиксируют, помещая во флакон с 70°-ным спиртом или 4%-ным формалином, не придавливая их, а просто опуская туда. Чаще всего для определения вида паразита его вынимают из флакона с фиксатором, помещают на предметное стекло в спирт с глицерином или каплю молочной кислоты или спирта (для просветления) и рассматривают под МБС. С помощью определителя выясняют видовую принадлежность рачка. После определения его снова кладут в спирт, где хранят неопределенное время. Во флакон вкладывают этикетку с указанием вида паразита, хозяина, места и времени обнаружения.

Однако иногда возникает необходимость приготовить постоянный препарат для более тщательного изучения мелких деталей паразита или его личинок. Препарат из целого паразита готовят следующим образом: фиксированных в 4%-ном формалине рачков отмывают, проводят по спиртам возрастающей концентрации, иногда просветляют в спирте с диметилфталатом или спирте с глицерином, переносят на предметное стекло в заранее нанесенную на него каплю глицерин-желатина или бальзама и аккуратно, не слишком придавливая (чтобы не повредить кутикулу), покрывают

покровным стеклом. Если рачок крупный и толстый (например, аргулюс или лернея, калигус и др.), то по углам покровного стекла делают маленькие ножки из воска, которые предохранят паразита от раздавливания. При этом количество глицерин-желатина следует увеличить, чтобы между покровным и предметным стеклом не образовывалось пустот и пузырьков воздуха.

При определении вида представителей сем. Ergasilidae, Lernaeopodidae и некоторых других рачка помещают в каплю воды на предметное стекло и под МБС препаровальными иглами отделяют

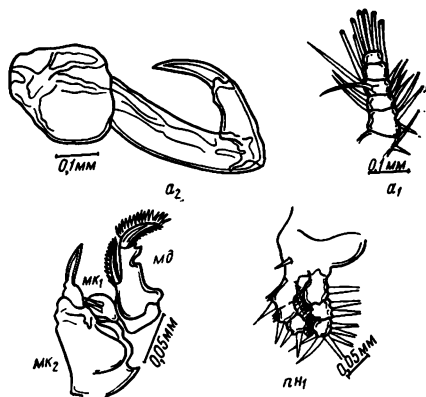


Рис. 108. Строение частей тела и конечностей *Sinergasilus lienii* (из Мирзоевой, 1973):

$a_1$  — антенна;  $a_2$  — антеннула; мд — мандибула; МК<sub>1</sub> — максилла 1; МК<sub>2</sub> — максилла 2; лп<sub>1</sub> — плавательные ножки первой пары

головные конечности: антенны I и II, жвалы (мандибулы) и челюсти (максиллы), грудные ножки (максиллипеды), которые видоизменяются в челюстные и иногда брюшные (плавательные) ножки, которые часто бывают рудиментарными. Отпрепарованные конечности помещают в каплю жидкости Калецкой или спирт с глицерином и осторожно накрывают покровным стеклом, которое позднее обмазывают замазкой. На готовом препарате изучают строение конечностей, их размеры, вооружение (шипики, коготки и т. п.), соотношение члеников, форму ротового аппарата (рис. 108).

Определение паразита ведут с помощью определителя, как указано выше. На конец предметного стекла наклеивают этикетку такого же содержания, как на флакон, в котором хранятся фиксированные рачки.

4. Просмотр и зарисовка готовых препаратов из коллекции.

#### Контрольные вопросы [3, 4, 5, 7, 9, 11, 30, 36, 37]

1. К каким отрядам относятся рачки, паразитирующие у рыб?
2. На каких частях тела обычно паразитируют рачки и какие роды рачков вам известны?
3. Каково строение веслоногого рачка?
4. Каково строение жаброхвостого рачка?
5. Как устроен равноногий рачок?
6. Какие рачки паразитируют у пресноводных рыб?
7. Какие рачки паразитируют у морских рыб?

8. Как собирают и в чем фиксируют рачков?
9. Как хранят рачков?
10. Как готовят постоянные препараты?

## Занятие 50. Кишечнополостные, паразитирующие у рыб

**Содержание.** Сбор, фиксация, изучение морфологических особенностей, определение кишечнополостных.

**Материальное обеспечение.** Микроскоп, МБС, лупа, ножницы, пинцеты, препаровальные иглы, глазные пипетки, кювета, предметные и покровные стекла, часовое стекло, флакон для фиксации, 4%-ный раствор формалина, дистиллированная вода, готовые препараты.

**Организация и проведение работы.** Из типа кишечнополостных (Coelenterata) у рыб паразитирует всего один вид — полип *Polypodium hydriforme*, локализующийся только в икринках осетровых рыб. Кишечнополостные — чаще морские, реже пресноводные многоклеточные животные. Их тело имеет форму мешка, внутри которого происходит переваривание пищи. Непереваренные остатки пищи выбрасываются через рот. Характерной чертой кишечнополостных является наличие стрекательных клеток, с помощью которых полипы прикрепляются, ловят добычу и т. д.

*P. hydriforme* устроен типично для всех кишечнополостных. Развитие его происходит в икре осетровых рыб, где планулообразная личинка поселяется в период образования желтка, т. е. на II—III стадиях зрелости. По мере роста икры личинка превращается в трубку — столон, на котором имеются вздутия — почки. Позднее в почках появляются щупальца. Икринки, пораженные полипом на ранней стадии заражения, несколько крупнее и темнее здоровых, а позднее, когда в ней уже развивается спирально закрученный столон, икринки выглядят в виде белых полосатых шариков, значительно более крупных, чем непораженные, и легко от них отличаются. Паразит зимует в икринках, а в период нереста вместе с икрой выметывается в воду. Из попавшего в воду stolона выворачиваются щупальца, и он распадается на отдельные полипы, которые становятся свободноживущими животными с 12 щупальцами для передвижения и захвата пищи. Полип способен к бесполому размножению путем деления на два. Затем у полипов развиваются половые железы.

*P. hydriforme* встречается в икре осетра, севрюги, стерляди и других осетровых в реках Днепр, Дон, Кубань, Дунай, Волга, Амур и др. Найден также в Северной Америке.

Порядок проведения работы следующий.

Порядок проведения работы может быть различным: либо работают с живой осетровой рыбой, либо с заранее фиксированным яичником, имеющим пораженные полипом икринки. В первом случае вскрывают брюшную полость рыбы и осторожно выделяют яичники (ястыки). Обычно уже через оболочку яичника просвечивают крупные неоднородно окрашенные, резко отличающиеся от здоровых, пораженные полипом икринки (рис. 109). Осторожно

разрезают оболочку яичника, отделяют пораженных икринок и помещают их на предметное стекло (или в часовое стекло) в каплю воды.

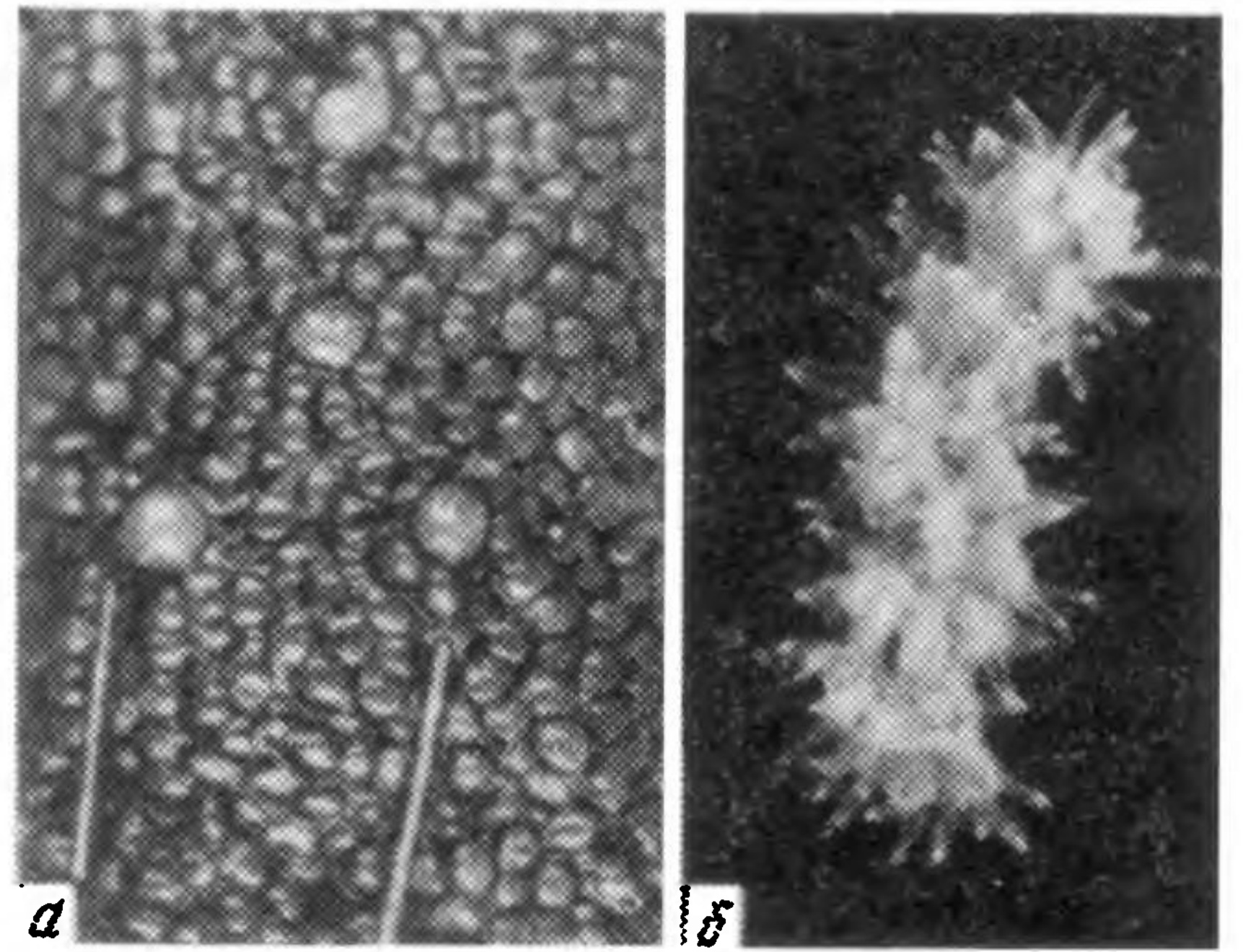


Рис. 109. *Polypodium hudriforme* (из Райковой и Хоффмана, 1971):

*a* — икринки осетра, пораженные полипом;  
*б* — столон полипа

Далее икринку осторожно разрывают. Из разорванной икринки в воду попадает прозрачное, видимое невооруженным глазом тело паразита. Рассматривают под МБС и зарисовывают стадию развития паразита. Пораженную икринку или выделенного полипа фиксируют в 4%-ном растворе формалина. Тотальных препаратов не готовят. При поста-

новке диагноза следует дифференцировать наличие в икринке полипа от заражения ее микроспоридиями рода *Cossoneta*, которые также паразитируют в икре осетровых рыб. При поражении микроспоридией икринка заметно большего размера, чем здоровая, грязновато-белого цвета (не полосатая), причем при раздавливании такой икринки из нее выделяется только мутная жидкость.

Когда на занятиях знакомятся с заранее фиксированными икринками, изучают только их внешний вид, так как при фиксации содержимое икринки уплотняется и выделить полип не удается. Зарисовывают фиксированные, пораженные икринки.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 7, 9, 36]

1. Какой представитель кишечнополостных паразитирует у рыб, где он локализуется?
2. Какие виды рыб поражаются полипом?
3. Как развивается полип?
4. Как выглядит икринка, пораженная полипом?
5. Как дифференцируют поражение полипом от поражения микроспоридиями?
6. Чем фиксируют икру, пораженную полипом?

### З а н я т и е 51. Моллюски, паразитирующие у рыб

**Содержание.** Сбор, фиксация, морфологические особенности и определение видовой принадлежности моллюсков — паразитов рыб.

**Материальное обеспечение.** МБС, рисовальный аппарат, ножницы, пинцет, скальпель, стекла для вскрытий, предметные и покровные стекла, часовое стекло, пробирки биологические для фиксации, кисточка, пергаментная бумага для этикеток, листы белой бумаги, тетрадь, карандаш, 4%-ный раствор формалина, определитель паразитов пресноводных рыб, коллекция фиксированных глохидиев, определитель моллюсков.

**Организация и проведение работы.** Из типа моллюсков (*Mollusca*) в водах СССР обитают представители двух классов: брюхоногие (*Gastropoda*) и двустворчатые (*Bivalvia*). Личинки дву-

створчатых моллюсков — глохидии — нередко временно паразитируют у рыб. Наиболее часто это представители семейств Unionidae, родов *Unio* (перловицы), *Anadonta* (беззубки), *Margaritana* (жемчужницы), *Cristaria* (гребенчатки).

Тело двустворчатых моллюсков сплюснутое, состоит из туловища и ноги. Оно покрыто мантией и заключено в раковину, состоящую из двух створок, соединенных между собой на спинной

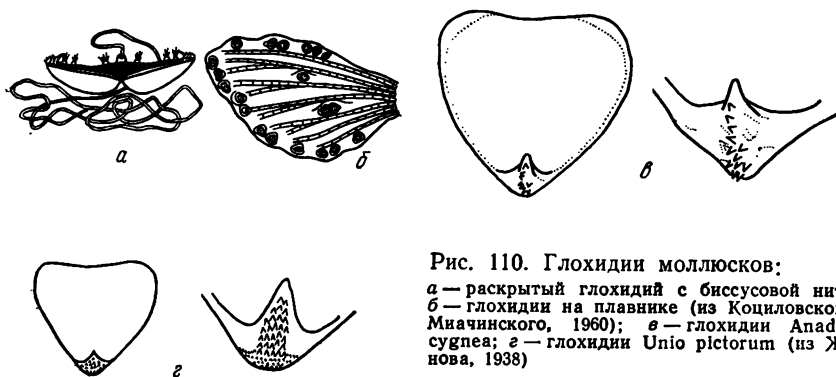


Рис. 110. Глохидии моллюсков:

а — раскрытый глохидий с биссусовой нитью; б — глохидии на плавнике (из Коциловского и Мначинского, 1960); в — глохидии *Anadonta sугпеа*; г — глохидии *Unio pictorum* (из Жданова, 1938)

стороне с помощью зубовидных отростков (зубов) и мускула замыкателя. На переднем конце тела расположен рот, на заднем — порошица, между ними находится нога с биссусовой железой, выделяющей тягучий нитевидный секрет, с помощью которого моллюск прикрепляется к подводным предметам. Жабры находятся в мантийной полости. Пищеварительная система состоит из рта, пищевода, желудка, кишечника. Половая система — в виде парных дольчатых образований. Большинство моллюсков раздельнополы. Оплодотворение наружное. Развитие беззубок (представителей семейств, паразитирующих у рыб) происходит следующим образом. Яйца откладываются внутрь наружных жабр, где из них развиваются двустворчатые личинки — глохидии (рис. 110), отличающиеся от материнского организма. Их створки округлые, на брюшном крае есть зубец с крючком. Нога рудиментарна, жабр нет. На брюшной стороне выделяется длинная, липкая биссусовая нить.

Когда мимо моллюска с глохидиями проплывает рыба, моллюск выталкивает их в воду. С помощью биссусовой нити и зубцов на створках глохидий прикрепляется к поверхности тела, плавникам, жабрам рыбы.

На месте его прикрепления образуется разрастание, внутри которого находится глохидий. Он растет, превращается в маленького моллюска. Разрастание лопается, моллюск падает на дно водоема и далее ведет свободный образ жизни.

Форма и размеры раковин, а также форма зубов являются систематическими признаками при определении вида глохидиев. Массовое появление глохидиев у разных видов происходит в различные сроки: у беззубок в мае—июне, у жемчужниц— в августе, у перловиц— с мая по август. Паразитирование на рыбах длится от нескольких дней до одного месяца.

Порядок проведения работы следующий.

Если рыба небольшая, ее помещают на стекло для вскрытий и внимательно рассматривают под МБС сначала поверхность тела, затем плавники, далее выделяют жабры и осматривают их отдельно. Если рыба крупная, то с поверхности ее тела делают соскоб, затем отрезают плавники, кладут в чашку Петри и смачивают водой, вырезают жабры, помещают их в отдельную чашку Петри, увлажняют.

Далее под МБС последовательно осматривают соскоб с поверхности тела, плавники, жабры. Обнаруженных глохидиев осторожно (створки их очень хрупки) с помощью препаровальных игл и кисточки снимают и помещают на предметное стекло в каплю чистой воды, очищают от слизи и тканей. С помощью окуляр-микрометра измеряют длину и ширину створок, зарисовывают их форму и по определителю определяют вид.

Если невозможно определить вид сразу на живом материале, то выделенных глохидиев фиксируют в пробирке с 4%-ным раствором формалина и определение проводят позднее. Коллекцию глохидиев хранят в пробирках с 4%-ным формалином, вкладывают туда этикетку с указанием вида хозяина, вида глохидиев, места вылова, даты. Постоянные окрашенные препараты не изготавливают, а неокрашенные заключают в глицерин-желатин. Зарисовывают фиксированных глохидиев из коллекции.

#### Контрольные вопросы [4, 5, 7, 9, 36]

1. Представители какого семейства и каких родов моллюсков паразитируют у рыб?
2. Где локализуются глохидии?
3. Как происходит развитие двустворчатых моллюсков?
4. Как происходит заражение рыб?
5. Как собирают и в чем фиксируют глохидиев, по каким признакам определяют их видовую принадлежность?

## ГЛАВА IV. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ НЕЗАРАЗНЫХ БОЛЕЗНЕЙ РЫБ

Незаразными называют болезни, возникающие в результате воздействия на организм рыбы различных неблагоприятных факторов. В условиях промышленного рыбоводства, использующего интенсивные методы выращивания рыбы, такие факторы многочисленны и потому незаразные болезни возникают довольно часто. Многочисленные перевозки и пересадки рыбы связаны с

травматизацией, плотные посадки рыбы на единицу площади или объема, а также применение искусственных, недостаточно полноценных кормов способствуют накоплению в воде избытков токсических органических веществ, продуктов обмена, т. е. ее загрязнению; подогрев воды нарушает равновесие растворенных в воде газов. Все это вместе взятое не только вызывает возникновение незаразных болезней, но ослабляет организм рыбы и делает его особенно восприимчивым к заразным болезням.

### **З а н я т и е 52. Незаразные болезни рыб**

**Содержание.** Ознакомление с диагностикой гепатомы, цериодной дегенерации печени форели, газопузырьковой болезнью.

**Материальное обеспечение.** Макропрепараты рыб и отдельных органов, пораженных гепатомой, цериодной дегенерацией печени, газопузырьковой болезнью; гистологические препараты печени форели, пораженной гепатомой и цериодной дегенерацией.

**Организация и проведение работы.** Незаразные болезни подразделяются на алиментарные, функциональные и болезни, возникающие в результате ухудшения условий окружающей среды, травмирования, неаккуратного обращения с рыбой и др.

Алиментарные болезни связаны с нарушениями в диете, кормлении. Они могут быть вызваны использованием недоброкачественных кормов (цериодная дегенерация печени форели), наличием в них ядовитых веществ, например афлотоксина, являющегося причиной гепатомы или злокачественной опухоли форели, отсутствием в корме необходимых витаминов (авитаминоз) или их избытком (гипервитаминоз) (последнее встречается редко). Алиментарные заболевания проявляются клинически (изменения формы и цвета тела рыбы, иногда пучеглазие, изменения в поведении рыбы) и патологоанатомически. Особенно яркие патологические изменения обнаруживаются в таких внутренних органах, как печень, почки, кишечник. Обычно отмечают увеличение против нормы количества полостного жира или его необычную консистенцию (нарушение обмена у белого амура), изменение цвета, формы и размеров печени, почек, желчного пузыря. Гибель от этих болезней может быть весьма значительной. Диагноз на алиментарные болезни должен быть подтвержден анализом кормов на их доброкачественность, наличием в них афлотоксина и других ядовитых веществ.

Из функциональных болезней описаны водянка желточного мешка и белопятнистая болезнь личинок лососевых. Заболевания возникают при подрачивании личинок лососевых при их искусственном воспроизводстве. Первое заболевание клинически выражается в оводнении желточного мешка, пучеглазии, анемии, второе — в появлении белых включений в желточном мешке в период его рассасывания. Причины обеих болезней не выяснены окончательно. Последние исследования свидетельствуют о том, что они незаразны и возникают при ухудшении условий содержания икры и ли-

чинок: небрежном обращении, резких изменениях температуры, недостатке кислорода, избытке растворенных в воде газов, наличии в воде аммиака, ионов металлов, особенно цинка и т. п.

С дефицитом кислорода связана асфиксия, или удушье, рыб. Дефицит кислорода нередко возникает в рыбоводных хозяйствах и на рыбоводных заводах в связи с переуплотнением посадки рыбы в пруды, садки, бассейны или с недостаточно хорошим качеством воды в водоисточнике. Асфиксия четко проявляется клинически в поведении рыбы которая в основном подходит к поверхности воды, заглатывает воздух, явно ослаблена, сносится ветром, погибает с открытыми жаберными крышками и ртом. Диагноз на асфиксию должен быть подтвержден гидрохимическим анализом.

Избыток в воде газов, чаще всего азота (редко кислорода) приводит к возникновению газопузырьковой болезни. В последнее время эту болезнь регистрируют довольно часто в связи с использованием в рыбоводстве теплых вод, сбрасываемых электростанциями, подогревом воды для инкубационных цехов, что приводит к нарушению равновесия растворенных в воде газов. Заболеванию подвержены все виды и все возрасты рыб, однако чувствительность рыб различна. Так, например, лососевые рыбы более чувствительны, чем карповые. Клинически болезнь проявляется у личинок в переполнении плавательного пузыря газом и переворачивании ее брюшком вверх, у более старших рыб — в образовании пузырьков под кожей на теле, плавниках, жаберных крышках, полости рта, глазах и даже во внутренних органах.

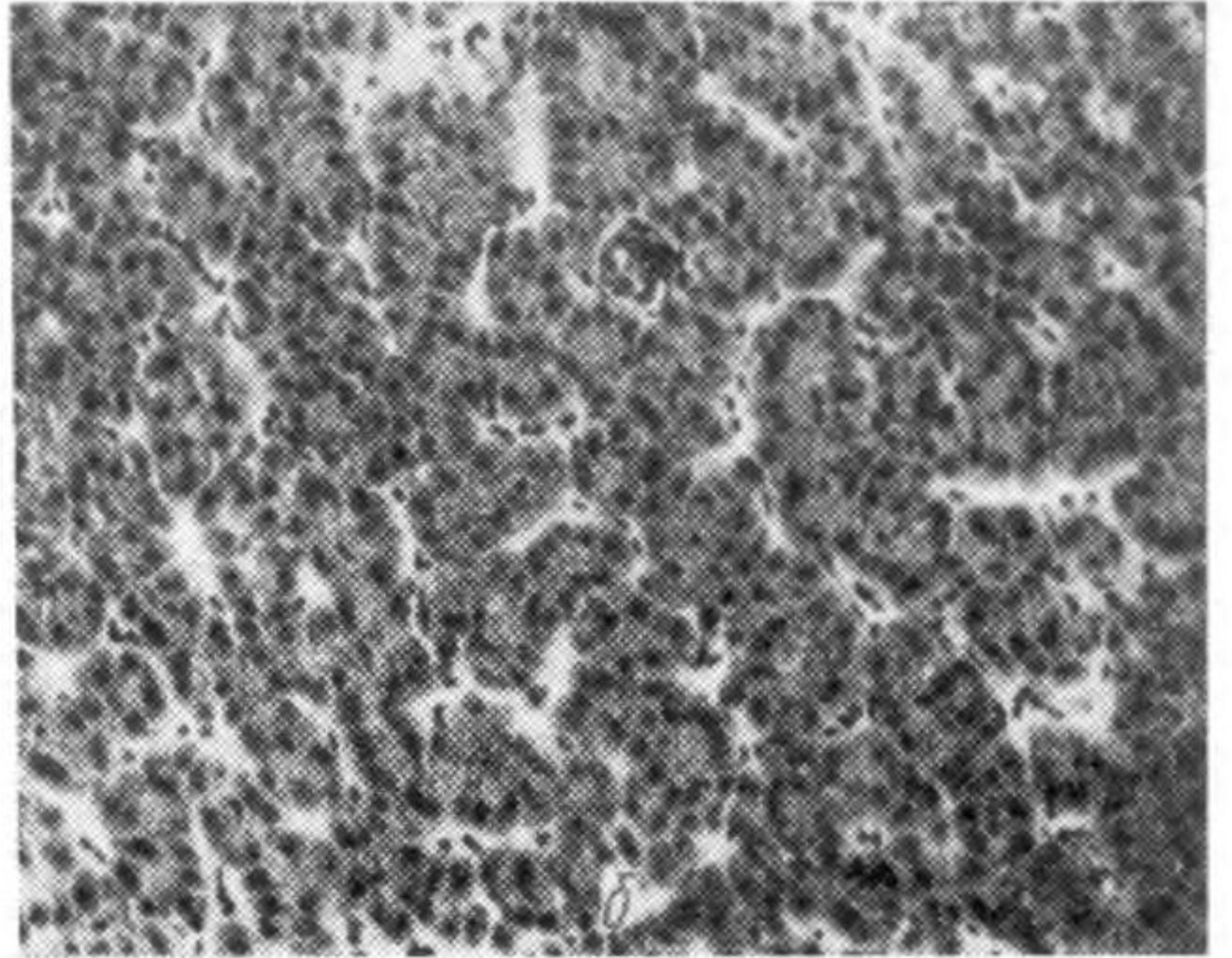
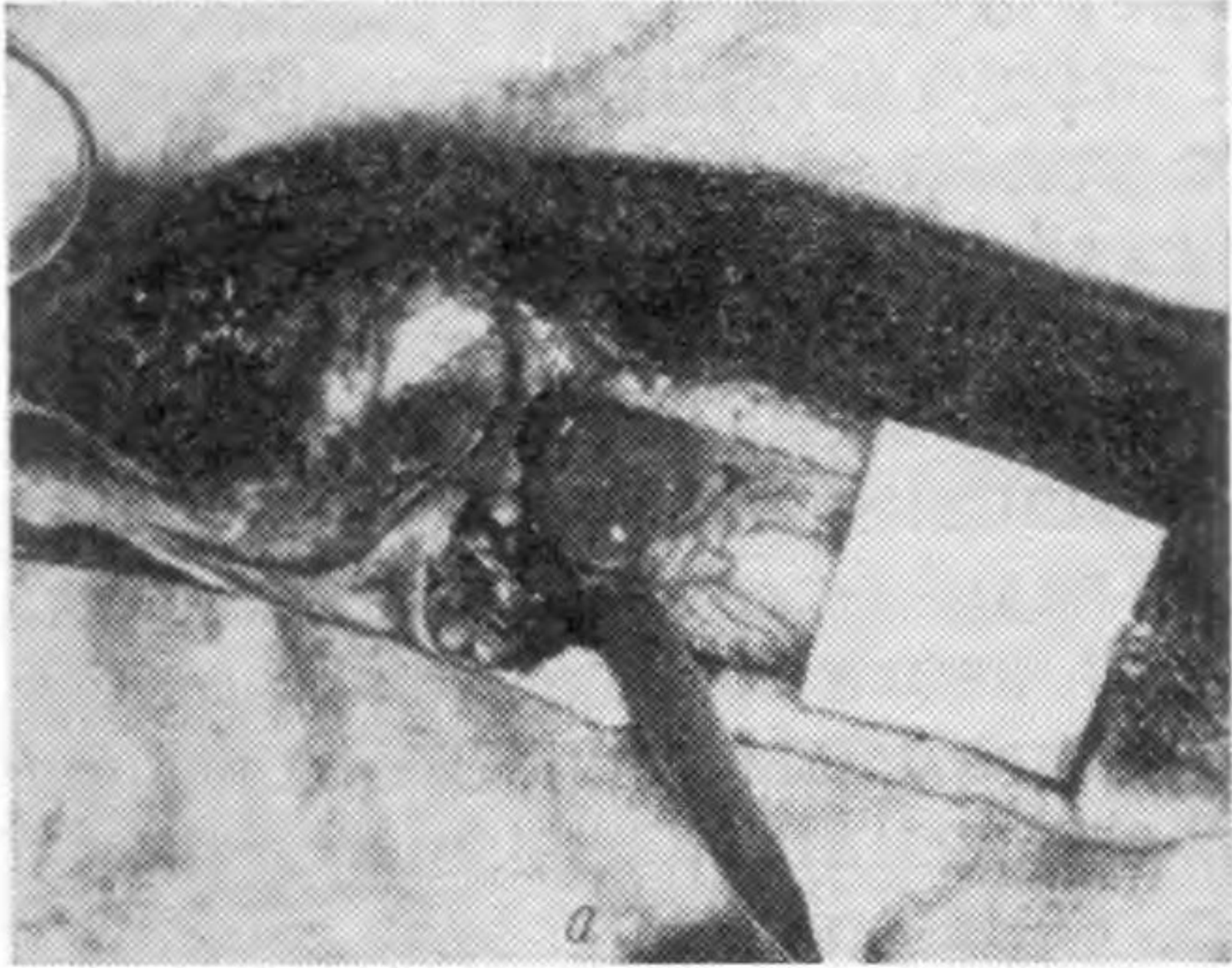
Диагноз на газопузырьковую болезнь должен быть подтвержден гидрохимическим анализом избыточного содержания в воде растворенных газов, в том числе азота ( $N_2$ ).

Порядок проведения работы следующий.

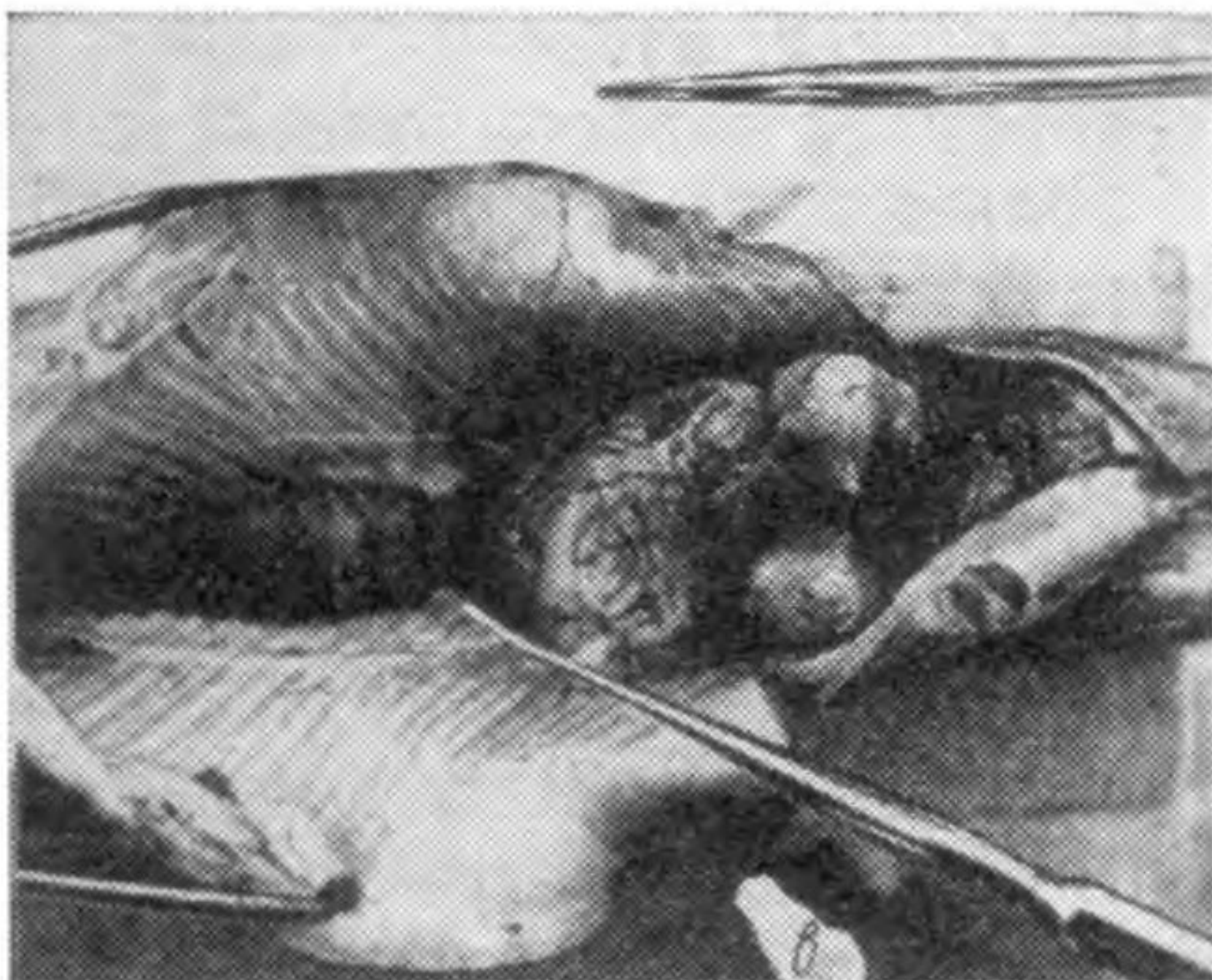
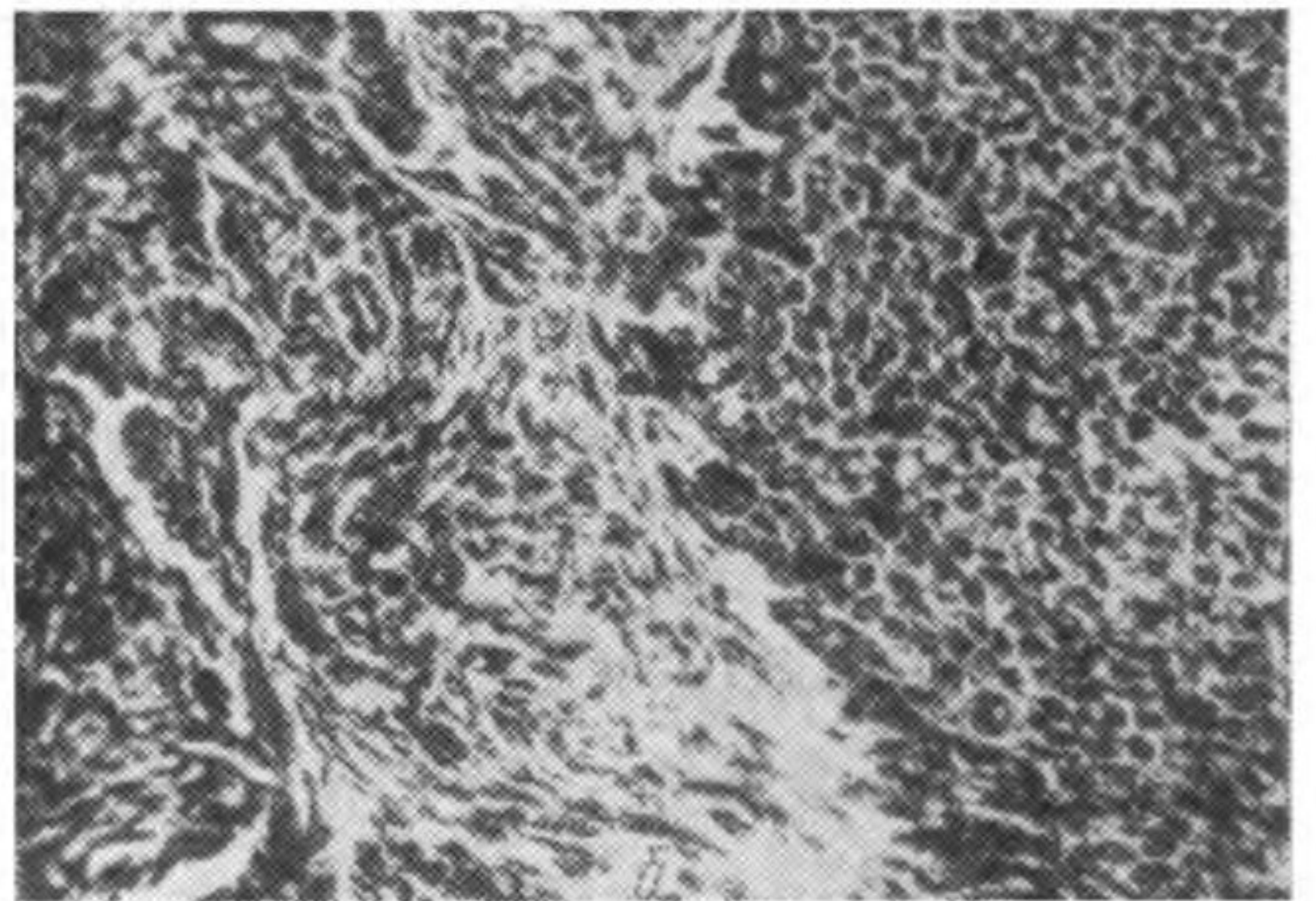
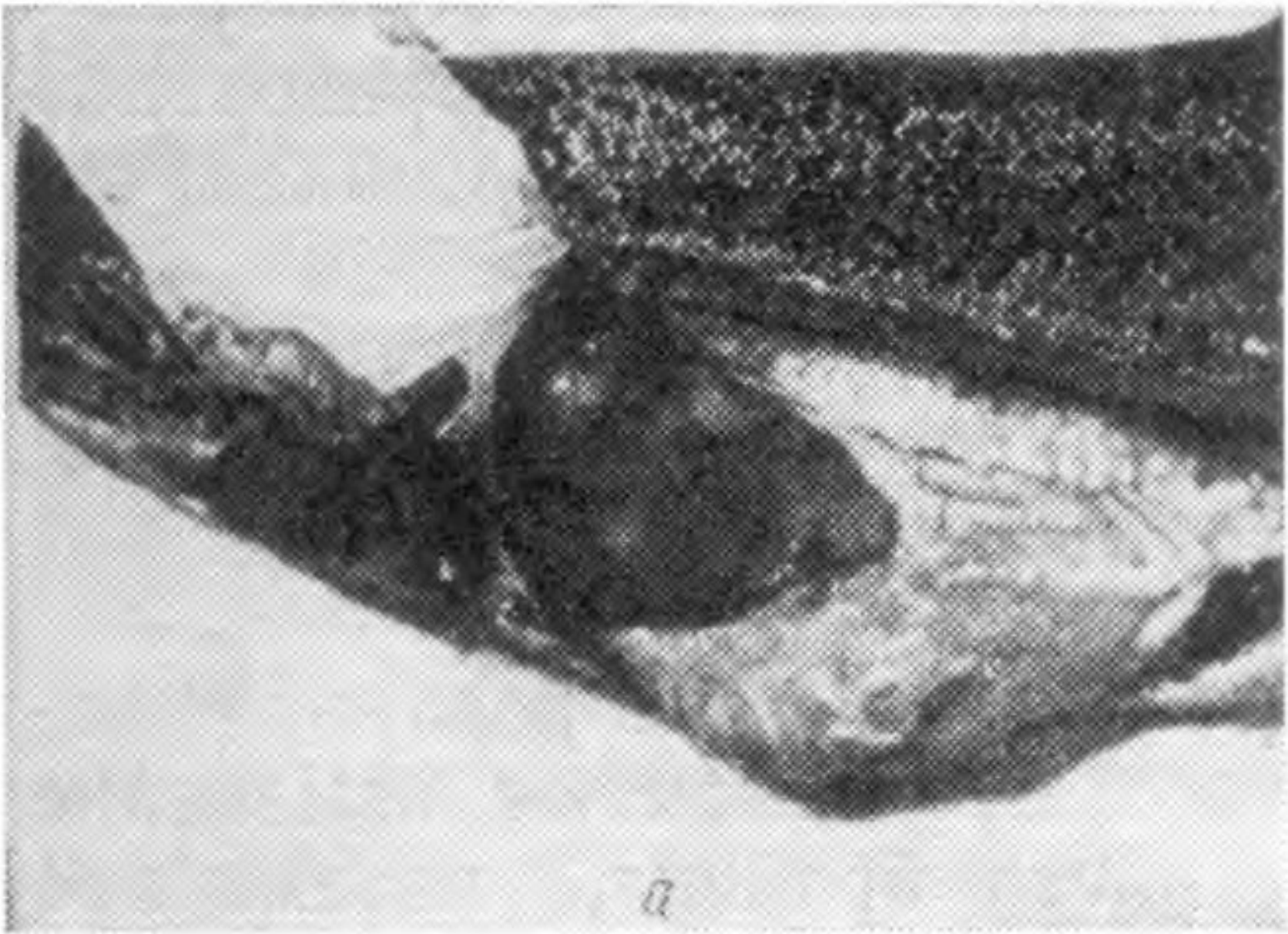
1. Гепатомы форели. На макропрепаратах фиксированной форели (здоровой и пораженной гепатомой) отмечают изменение формы тела, увеличение передней части брюшка, потемнение больных рыб по сравнению со здоровыми. Внимательно рассматривают состояние печени вскрытых рыб. Описывают отличия в форме, размерах, цвете печени здоровых и больных рыб. Зарисовывают печень больной рыбы (рис. 111, а; 112, а).

Проводят микроскопическое исследование коллекционных гистологических препаратов печени больных и здоровых рыб (рис. 111, б; 112, б), отмечают различие в строении ткани: гипертрофию ядер пораженных клеток печени, изменение их формы, которая становится веретеновидной, нарушение процессов деления клетки (анормальные митозы).

2. Цероидная дегенерация печени форели. На микропрепаратах фиксированной больной форели обращают внимание на цвет рыб, которые становятся темными, почти черными, особенно при острой форме болезни. Внимательно рассматривают патологоанатомические признаки: обилие жировых отложений на внутренних органах, увеличение размера печени, изменение ее окраски, которая становится желтовато-песочной.



**Рис. 111. Печень здоровой форели:**  
общий вид (а) и гистопрепарат печени здоровой форели (б) (из Хальвера и Митчела, 1967)



**Рис. 112. Печень форели, пораженной гепатомой:**

а — общий вид печени; б — гистопрепарат печени больной рыбы; в — общий вид пораженной печени с метастазом в почку (из Хальвера и Митчела, 1967)

Проводят микроскопическое исследование коллекционных препаратов печени больных и здоровых рыб (рис. 113). Отмечают различие в строении ткани: изменение структуры цитоплазмы клеток печени больной форели, наличие в них гранул цероида, аномалии в делении клеток.

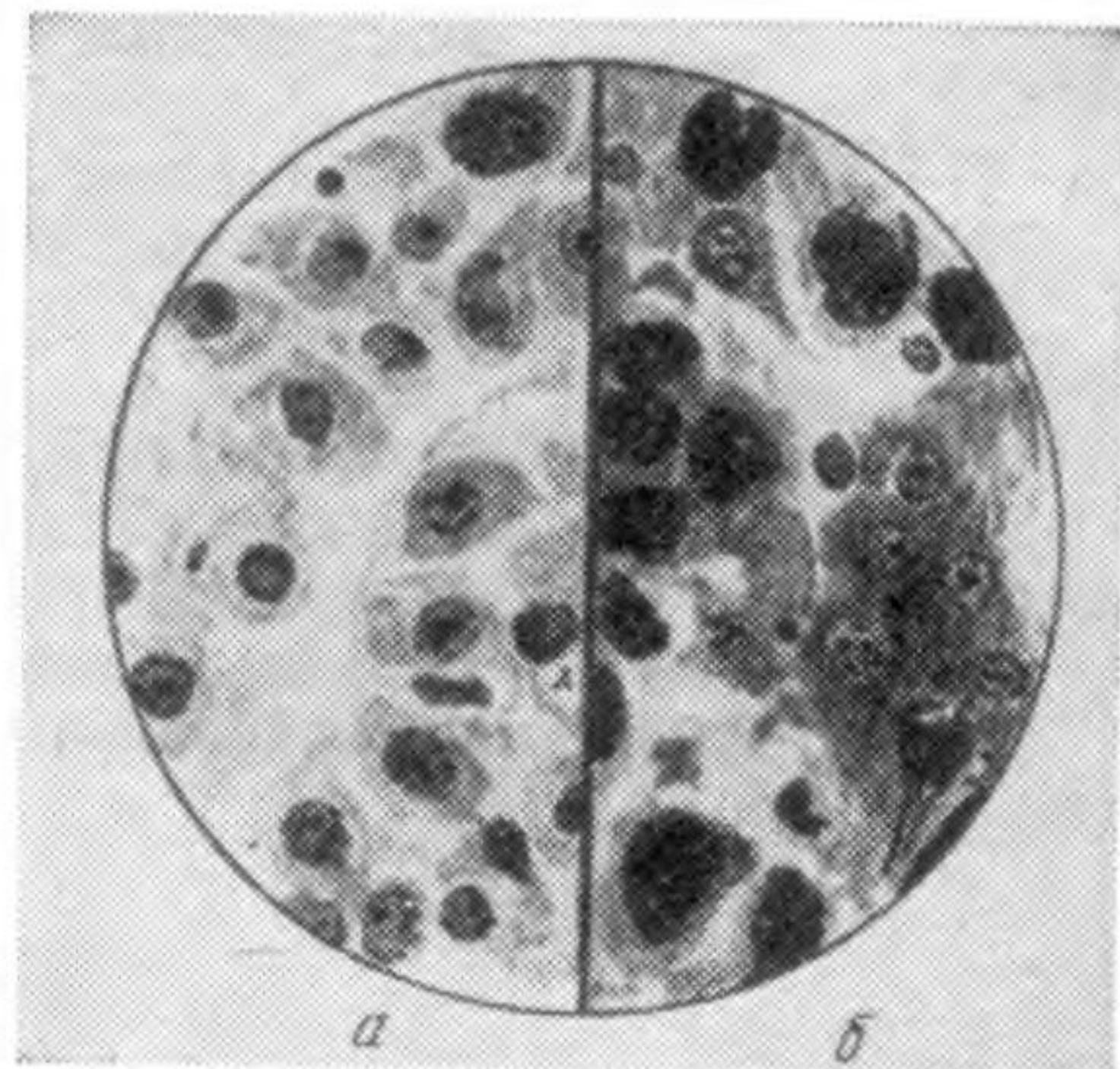


Рис. 113. Цероидная дегенерация печени форели:

*а* — гистопрепарат печени здоровой рыбы; *б* — гистопрепарат печени больной рыбы (из Факторович, 1962)

3. Газопузырьковая болезнь. На фиксированных рыбах и отдельных органах отмечают характерные признаки болезни: образование экзофтальмии, наличие и расположение подкожных пузырьков газа. Для этого сначала внимательно обследуют рыбу клинически, обращая внимание на хвостовую стебель, межлучевую ткань парных и хвостового плавников, чешуйные кармашки, жаберную крышку, а затем исследуют патологоанатомически. Изучают состояние внутренних органов: наличие пузырьков в сердце, почках карпа. У форели в первую очередь выясняют наличие пузырьков газа в сердце и увеличение объема плавательного пузыря (рис. 114).

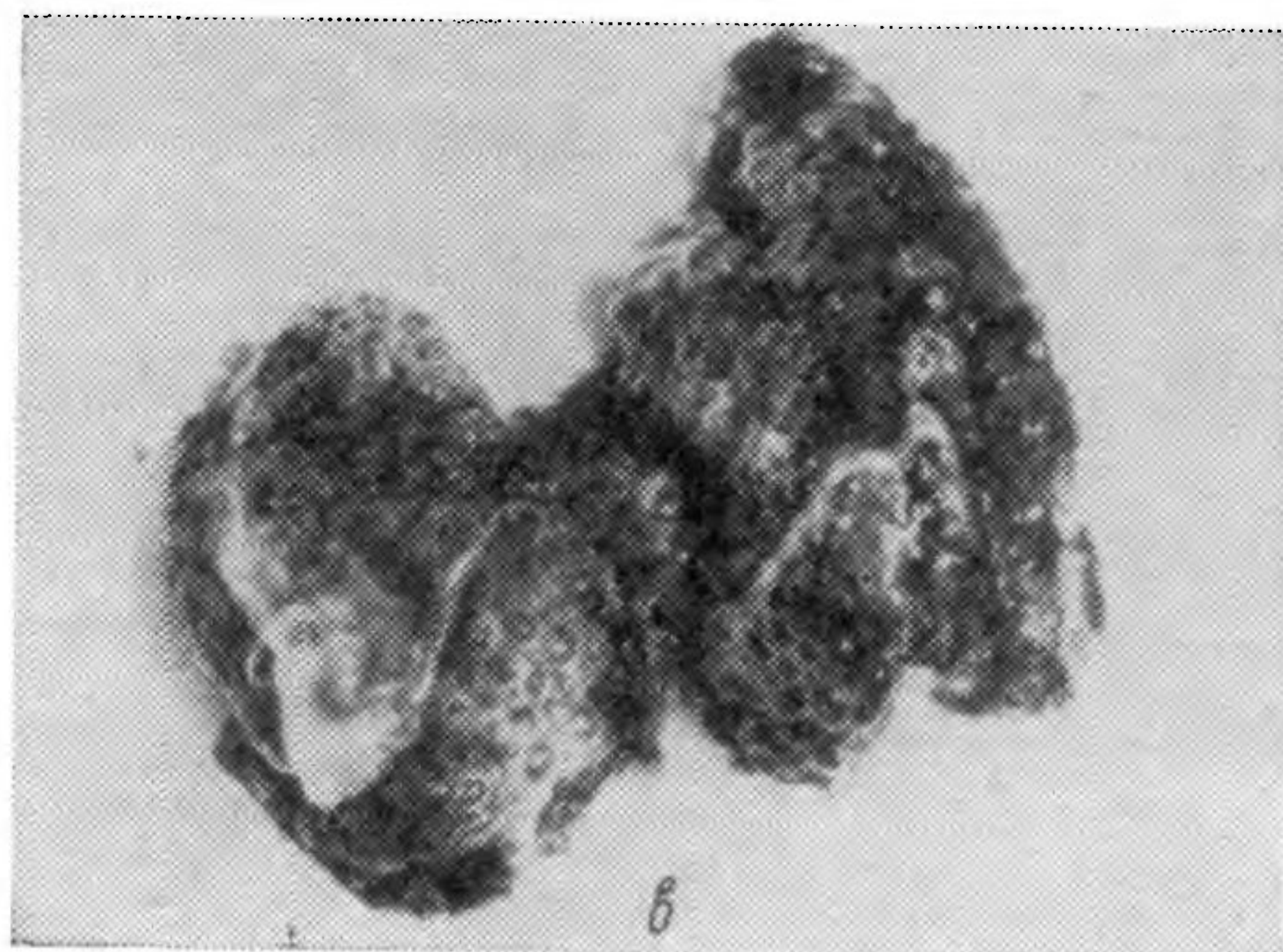
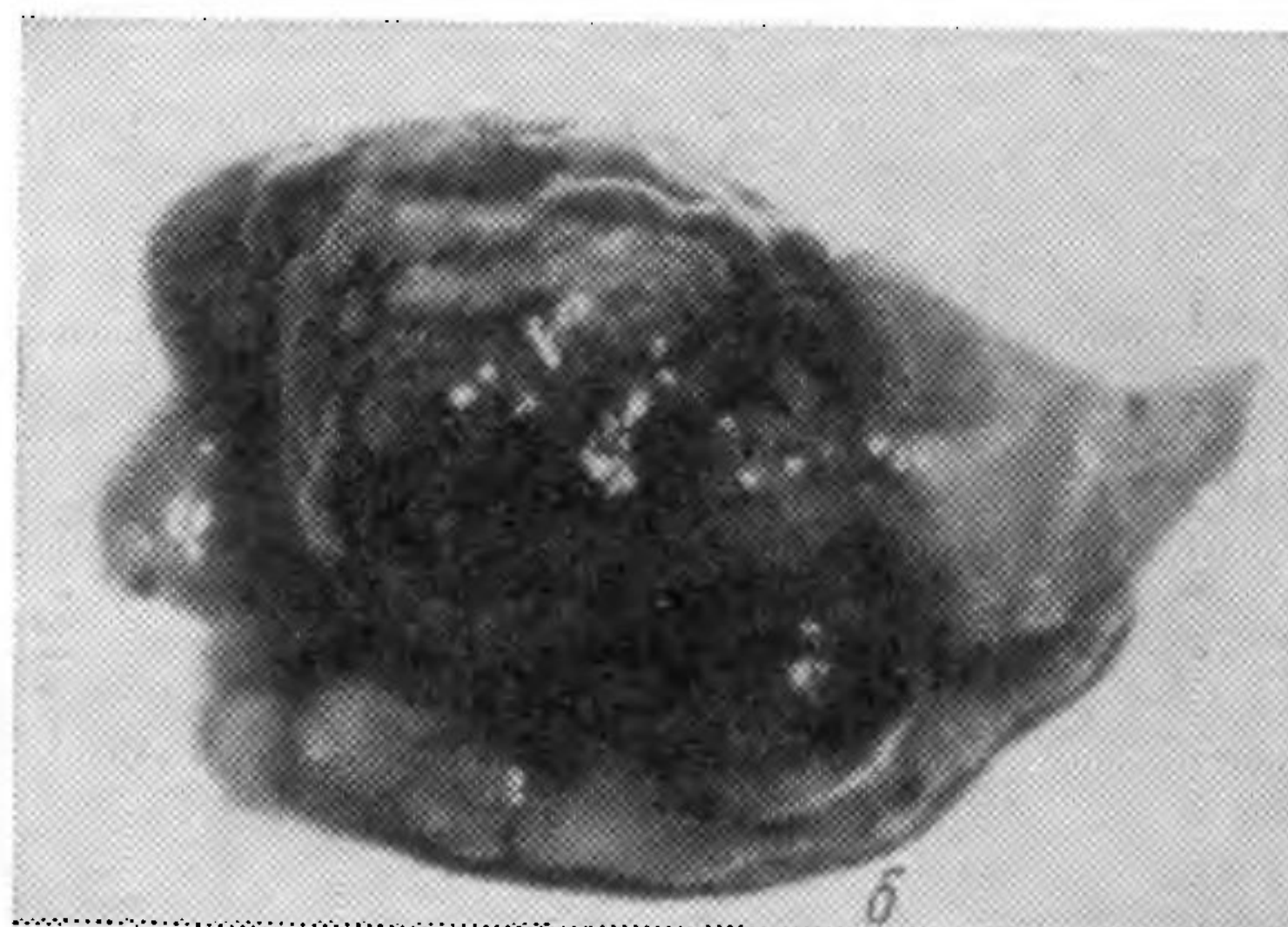


Рис. 114. Газопузырьковая болезнь:

пузырьки газа: *а* — под эпителием ротовой полости; *б* — в сердце карпа; *в* — в почках карпа (из Мусселиус, Головина, 1977)

### **Контрольные вопросы [4, 5, 9, 10, 33, 45]**

1. Каковы внешние изменения рыбы при гепатоме?
2. Как выглядит печень форели, пораженной гепатомой?
3. Какие гистологические изменения ткани печени характерны для гепатомы?
4. Как изменяется внешний вид печени при зернистой дегенерации?
5. Какие гистологические изменения печени характерны для зернистой дегенерации?
6. Каковы клинические признаки газопузырьковой болезни?
7. Особенности изменения внутренних органов карпа и форели при газопузырьковой болезни?

Министерство  
сельского хозяйства СССР  
Ветеринарно-санитарный надзор

Форма № 1

Выдается ветврачом по месту выхода животных (птиц, рыб, пчел), предьявляется для контроля при отгрузке, в пути следования и передается в месте назначения получателю

\_\_\_\_\_ (наименование учреждения, предприятия, организации)

Район (город) \_\_\_\_\_

Область (край) \_\_\_\_\_

Республика \_\_\_\_\_

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 19 \_\_\_\_ г.

**ВЕТЕРИНАРНОЕ СВИДЕТЕЛЬСТВО № \_\_\_\_\_**

Выдано \_\_\_\_\_ (кому — наименование предприятия, организации)

\_\_\_\_\_ фамилия, и. о. отправителя)

в том, что при ветеринарном осмотре подлежащих отправке \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ (указать вид животных, птиц, рыб, пчел)

в количестве \_\_\_\_\_ голов (мест) больных и подозрительных по заболеванию заразными болезнями не обнаружено, и они выходят (вывозятся) из \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ (наименование населенного пункта, колхоза, совхоза и т. д.)

Благополучного по заразным болезням животных. Животные перед отправкой

\_\_\_\_\_ (указать, каким подвергались исследованиям, прививкам

\_\_\_\_\_ или другим обработкам, и дату)

Животные направляются \_\_\_\_\_ пункт (станция) назначения и получатель

при спецификации (гуртовой ведомости) № \_\_\_\_\_ от « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 19 \_\_\_\_ г. для

\_\_\_\_\_ (убоя, откорма, продажи, разведения и т. п.)

и следуют: гоном, железной дорогой, водным, автомобильным, воздушным транспортом (нужное подчеркнуть) по маршруту \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ (указать основные пункты следования или станцию и дорогу погрузки)

Особые отметки \_\_\_\_\_ заполняется при отправке животных, переболевших

\_\_\_\_\_ ящуром, указать дату, положительно реагирующих на бруцеллез, туберкулез и т. п.,

\_\_\_\_\_ перевозимых на особых условиях и по специальному указанию, кем оно дано, номер и дата

Ветеринарный врач \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ (подпись и указать полное наименование должности, фамилию, инициалы)

Отметки о ветеринарном осмотре при погрузке, в пути следования  
и на месте назначения

1	2	Обнаружено		5	6	7	8
		3	4				
Дата и наименование пункта, где производится ветеринарный осмотр (П — погрузка, Т — транзит, В — выгрузка)	Осмотрено животных (птицы, рыбы и др.), количество голов (мест)	больных животных (птицы)	трупов животных (птицы)	Недостает (голов, мест, масса)	Сколько задержано, причины задержания и принятые меры (карантин, прививки, оказание ветпомощи и т. д.)	Разрешено к дальнейшему следованию (количество животных, мест, рыбы и др.)	Подпись врача, производившего осмотр, и печать

Приложение 2а

Министерство рыбного хозяйства СССР  
Центральная ихтиопатологическая инспекция

## Журнал

эпизоотического состояния и учета  
лечебно-профилактических мероприятий

форма № 312

Утвержден приказом Минрыбхоза СССР  
10 апреля 1974 г., № 155

Москва 1978

Четная страница

1	2	3	4	5	6	7	8
№ п/п, дата	Категория и № пруда	Вид и возраст исследуемых рыб	Количество исследуемой рыбы	Название (возбудителя) болезни	Дата наложения карантина (ограничения), № решения исполкома	Дата снятия карантина (ограничения), № решения исполкома	Чем и каким способом обработана, дата

Нечетная страница

Подвергнуто обработке				13	14	15	16
Профилактической		Лечебной					
тыс. шт.	израсходовано препарата	тыс. шт.	количество препарата, кг	Дезинфекция водоема (чем, площадь, га)	Израсходовано дезинфеканта (Ц)	Выведено на летование (дата) прудов, га	Отход рыбы в процессе выращивания или заболелания
9	10	11	12				

Министерство рыбного хозяйства СССР  
Центральная ихтиопатологическая инспекция

форма № 324

Ихтиопатологический журнал  
рыбоводного хозяйства

Утвержден приказом Минрыбхоза СССР  
от 21 июня 1974 г. № 255

Москва 1974

СОДЕРЖАНИЕ

Указания по заполнению

- I. Общие сведения
  - II. Санитарное состояние хозяйства
  - III. Рыбоводно-мелиоративные мероприятия
  - IV. Эпизоотическое состояние
  - V. Лечебно-профилактические мероприятия
  - VI. Сведения о завозе
  - VII. Гидрохимические данные
    - Таблица 1
    - Таблица 2
- Заключение

УКАЗАНИЯ

по заполнению ихтиопатологического журнала рыбоводного хозяйства

Ихтиопатологический журнал заполняют на целое рыбоводное хозяйство (прудовое, садковое, озерно-товарное, рыбопитомник, нерестово-выростное, репродуктор, племрассадник, рыбоводный завод) или его отделения (участок, рыбцех, рыбхоз), если они находятся на другом источнике водоснабжения.

Ихтиопатологический журнал рыбоводного хозяйства является учетным документом. Выдается вышестоящей рыбохозяйственной организацией и заполняется соответствующим ихтиопатологическим подразделением, обслуживающим хозяйство (главным или старшим ихтиопатологом и главным рыбоводом хозяйства).

Ихтиопатологический журнал заполняется 2 раза в год. В соответствующие разделы вносятся изменения и дополнения.

Ихтиопатологический журнал является постоянно действующим документом.

**Раздел I. Общие сведения о рыбоводном хозяйстве** (пп. 1—9) заполняют главный рыбовод и старший ихтиопатолог на основании документальных данных, имеющихся в хозяйстве, и подписывают главный рыбовод, старший ихтиопатолог хозяйства и скрепляют печатью.

В журнал вкладывают схематический план (карту) хозяйства с нанесенными на ней прудами и сельскохозяйственными угодьями.

**В разделе II** (санитарное состояние хозяйства) указывают: зарастаемость водной растительностью, состояние гидротехнических сооружений, заболоченность, заиленность, наличие бочагов, спускные и неспускные пруды, а также дезинфекция и дезинвазия (площадь обработанных прудов; количество обработанных садков, инкубационных аппаратов, бассейнов, лотков, питомников).

**В разделе III** (рыбоводно-мелиоративные мероприятия) указывают смешанно-видовые и возрастные посадки рыб (тыс. шт./га); проводимые мелиоративные работы; устройство и восстановление на прудах водосборной и осушительной сети канав (в м); засыпка бочагов на ложе прудов; засев прудов сельскохозяйственными культурами и травами; вспашка и культивирование ложа прудов.

**В разделе IV** (эпизоотическое состояние хозяйства) указывают заболевание, время возникновения болезни, отход рыбы (в штуках и %), причины возникновения болезни.

**В разделе V** (лечебно-профилактические мероприятия в хозяйстве) указывают название препарата, метод обработки, количество обработанной рыбы, каким методом ведется оздоровление хозяйства (летование, комплексный). Эффективность применяемых препаратов и методов.

А также 2 раза в год (весной и осенью) заносят данные по профилактической обработке племенного и рыбопосадочного материала в хозяйстве (количество обработанных рыб и чем проведена обработка).

При обработке рыбы в антипаразитарных ваннах и прудах при смешанных инвазиях (триходиниоз, хилоденеллез, ихтиофтириоз и т. д.) показывают однократное количество обработанной рыбы, а не отдельно по заболеваниям.

**Раздел VI** (сведения о завозе племенного и рыбопосадочного материала) заполняют при поступлении материала.

**В разделе VII** (гидрохимические данные) таблицы 1 и 2 записываются на основании собранных лабораторных исследований (анализов), а также научно-исследовательских институтов рыбной промышленности, инспекцией рыбоохраны и других лабораторий, проводящих гидрохимические обследования, или исследований, проводящихся в ихтиопатологических лабораториях.

Журнал должен заполняться чисто, четко и разборчиво.

### 1. Общие сведения

Наименование рыбоводного хозяйства \_\_\_\_\_

подчиненного \_\_\_\_\_  
Министерству, Главному управлению, Управлению (Объединению)  
рыбного хозяйства

расположенного в \_\_\_\_\_ районе \_\_\_\_\_  
(край, область, АССР)

Почтовый адрес \_\_\_\_\_

Телеграфный адрес \_\_\_\_\_

Ближайшая ж. д. станция (водная пристань) \_\_\_\_\_

1. Тип рыбоводного хозяйства \_\_\_\_\_  
(полносистемное, рыбопитомник, нагульное,  
нерестово-выростное)  
\_\_\_\_\_ (рыбоводный завод)

2. Источник водоснабжения \_\_\_\_\_  
(река, ключ, атмосферные осадки и др.)

3. Использование водоема для других целей \_\_\_\_\_  
(водоснабжения, орошения, выгула  
водоплавающей птицы)  
\_\_\_\_\_ гидроэнергетических целей, лесосплава и др.)

4. Какие виды рыб выращиваются в рыбоводном хозяйстве \_\_\_\_\_

5. Дата ввода рыбоводного предприятия в эксплуатацию \_\_\_\_\_

6. Мощность хозяйства: а) производителей \_\_\_\_\_ шт.

б) ремонта \_\_\_\_\_ шт.

в) личинок \_\_\_\_\_ млн. шт.

г) сеголетков \_\_\_\_\_ тыс. шт.

д) годовиков \_\_\_\_\_ тыс. шт.

е) товарной рыбы \_\_\_\_\_ тыс. ц

ж) 2-летков \_\_\_\_\_ тыс. шт.

7. Общая площадь прудов, водоема и др. \_\_\_\_\_

8. Назначение прудов, их площадь и количество

Наименование прудов	Количество	Площадь, га	Зависимое, независимое водоснабжение, спускаемость прудов и др.
1	2	3	4

Нерестовые

Мальковые

Выростные

Летние маточные

Зимние маточные

Нагульные

Зимовальные

Карантинные

Садки

Инкубационный цех (вид и количество аппаратов, их объем)

Бассейны

Лотки

Питомники

9. Заболевания рыб и мероприятия, проведенные по оздоровлению хозяйства в предыдущие годы (3—5 лет)

Время появления заболевания, диагноз	Какие проведены мероприятия по оздоровлению	Примечание
--------------------------------------	---	------------

Дата заполнения паспорта \_\_\_\_\_

Главный рыбовод предприятия \_\_\_\_\_

Главный (старший) ихтиопатолог \_\_\_\_\_

## II. Санитарное состояние хозяйства (рыбоводного завода)

Санитарная характеристика хозяйства	Проведенные мероприятия	Категория обработанных прудов	Общая площадь, га	Наименование и израсходованное количество дезинфектанта
1	2	3	4	5

## III. Рыбоводно-мелиоративные мероприятия

Дата проведения мероприятия	Проведенные мероприятия	Категория обработанных прудов и сооружений	Площадь, га	Примечание
1	2	3	4	5

## IV. Эпизоотическое состояние хозяйства

Наименование заболевания	Результаты обследования, время возникновения болезни, вид и возраст рыб, причины возникновения болезни, отход рыбы (в шт. и %)	Дата наложения карантина или ограничения, № и дата решения исполкома	Дата снятия карантина или ограничения, № решения исполкома
1	2	3	4



2. Нормы для лососевых, осетровых и карповых рыб рыбоводных заводов

Виды рыб	Активная реакция рН		Окисляемость, мг/л		Содержание кислорода, мг/л		Азот альбуминоидный, мг/л		Аммиак свободный, мг/л		Нитриты, мг/л		Нитраты, мг/л		Фосфаты, мг/л		Углекислота, мг/л		Сероводород		Щелочность, мг/л		Жесткость общая, мг/л		Железо общее		Хлориды, мг/л		Сульфаты, мг/л	
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16															
Лососевые	7-8	5-15	7-8	0,5	0,1	0,01	1,0	0,2	10	-	1,8-2,0	8-12	0,5	5	5															
Осетровые	7-8	5-15	6	0,5	0,1	0,1	1,0	0,3	10	-	1,8-2,0	6-8	0,5	10	10															
Проходные карповые (кутум, рыбец, шема)	7	5-15	6,5	1,0	0,1	0,1	2,0	0,4	10	-	1,8-2,0	6-8	0,5	10	10															
Полупроходные карповые (лец, сазан)	6,5-8	5-20	4,0	1,5	0,1	0,1	2,0	0,5	10	-	1,5-2,0	5-8	0,5	10	10															
Проходной судак	7	5-15	5	0,5	0,1	0,1	1,0	0,3	10	-	1,8-2,0	6-9	0,5	10	10															

Кому высылается \_\_\_\_\_

наименование и адрес получателя

Наименование учреждения (хозяйства), высылающего отчет  
\_\_\_\_\_

## СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОТЧЕТНОСТЬ

Форма № 3-вет

Утверждена ЦСУ СССР 23 VIII 1974 г. № 17—19

Республика \_\_\_\_\_

Почтовая-полугодовая

Край, область \_\_\_\_\_

Район \_\_\_\_\_

1. Ветеринарные врачи колхозов и других хозяйств, занимающихся рыбоводством, ветеринарные участки, участковые ветлечебницы (по обслуживаемым хозяйствам, не имеющим ветврачей) высылают главному ветврачу района к 2 июля и 2 января, ветеринарные врачи рыбоводных хозяйств, не входящих в систему Министерства сельского хозяйства СССР, кроме того, высылают вышестоящей организации по подчиненности копии отчета к 2 июля и 2 января.

2. Главные ветврачи районов, областные (краевые), республиканские ветеринарные лаборатории, экспедиции (отряды) по болезням рыб—соответственно ветотделу областного (краевого) управления сельского хозяйства, министерства сельского хозяйства автономной республики, главному управлению (управлению) ветеринарии министерства сельского хозяйства союзной республики, не имеющей областного деления, к 5 июля и 5 января.

3. Ветеринарные отделы областных (краевых) управлений сельского хозяйства, министерств сельского хозяйства автономных республик— главному управлению (управлению) ветеринарии министерства сельского хозяйства союзной республики к 15 июля и 15 января.

4. Главные управления (управления) ветеринарии министерств сельского хозяйства союзных республик— Главному управлению ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР к 30 июля и 30 января.

## ОТЧЕТ О БОЛЕЗНЯХ РЫБ

за \_\_\_\_\_ полугодие 19\_\_ г.

## I. Общие сведения\*

№ строки	A	Рыбоводных хозяйств		Рыбпромысловых водоемов
		всего	в том числе системы Минрыбхоза	
		1	2	3
1	Всего имеется в районе, области (крае), республике _____			
	из них _____			
2	неблагополучных по заразным болезням (на конец отчетного периода) _____			
3	обследовано за отчетный период _____			

Заполняют, начиная от районного звена.

## II. Сведения о неблагополучных пунктах и ветеринарных мероприятиях

Название болезни	Выявлено за отчетный период неблагополучных		Оздоровлено за отчетный период		Осталось неблагополучных к концу отчетного периода		Обработано рыб, тыс. шт.		Профилактические, оздоровительные мероприятия			
	рыбоводных хозяйств	рыбопромысловых водоемов	рыбоводных хозяйств	рыбопромысловых водоемов	рыбоводных хозяйств	рыбопромысловых водоемов	с профилактической целью	с лечебной целью	летование		дезинфекция	
									количество водоемов	площадь	количество водоемов	площадь
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

«    » \_\_\_\_\_ 19 г.

\_\_\_\_\_ Должность, подпись

Приложение 2г

Кому высылается \_\_\_\_\_

наименование и адрес получателя

## СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОТЧЕТНОСТЬ

Форма № 3-рх

Утверждена ЦСУ СССР 15 X 1975 г. № 17—48

## ПОЧТОВАЯ-ПОЛУГODOVAY

Главные (старшие) иктиопатологи рыбхозов, рыбокомбинатов представляют рыбтресту, рыбокомбинату области (края) к 5 июля и 5 января.

Главные (старшие) иктиопатологи рыбтрестов и рыбокомбинатов представляют Министерству, Главному управлению, управлению, объединению рыбного хозяйства союзной республики, Каспрыбе, Дальрыбе, Азчеррыбе к 10 июля и 10 января.

Главный иктиопатолог Министерства, Главного управления, управления, объединения рыбного хозяйства союзной республики, Каспрыбы, Дальрыбы, Азчеррыбы представляет Центральной иктиопатологической инспекции Министерства рыбного хозяйства СССР к 15 июля и 15 января.

Наименование учреждения, представляющего отчет \_\_\_\_\_

Республика \_\_\_\_\_

Край (область) \_\_\_\_\_

Район \_\_\_\_\_

ОТЧЕТ О БОЛЕЗНЯХ РЫБ  
В РЫБОВОДНЫХ ХОЗЯЙСТВАХ МИНИСТЕРСТВА  
РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА СССР

за \_\_\_\_\_ полугодие 19\_\_ г.

## I. Болезни рыб

Вид рыб и название болезни	Выявлено новых неблагополучных пунктов	Оздоровлено пунктов за отчетный период	Осталось неблагополучных пунктов к концу отчетного периода	Погибло рыб, шт.		
				сего-летки	двух-летки	производители и ремонт
A	1	2	3	4	5	6

## II. Лечебно-профилактические мероприятия

### Профилактические мероприятия

Наименование мероприятия (используемые способ и препарат)	Обработано, тыс. шт.			Площадь прудов, выведенная на лето-вание, га	Площадь прудов, подвергнутая дезинфекция, дезинвазии, га
	сеголетки	двухлетки	производители и ремонт		
А	1	2	3	4	5

### Лечебные мероприятия

Наименование мероприятия (используемые способ и препарат)	Обработано, тыс. шт.		
	сеголетки	двухлетки	производители и ремонт
А	1	2	3

«    » \_\_\_\_\_ 19   г.      Главный (старший) ихтиопатолог

### УКАЗАНИЯ К ЗАПОЛНЕНИЮ ОТЧЕТА

Отчет составляется на основании данных «Журнала эпизоотического состояния» (форма № 312) и «Ихтиопатологического журнала рыбоводного хозяйства» (форма № 324).

#### Раздел I. Болезни рыб

В графе А раздела I сначала указывают название болезни, а под ним вид рыб, пораженных этой болезнью. Название болезней приводят в алфавитном порядке. Обязательно отражаются в отчете независимо от степени поражения рыб болезни: бранхиомикоз, вертеж лососевых, воспаление плавательного пузыря, жаберное заболевание невыясненной этиологии, инфекционная анемия форели, краснуха карпов, фурункулез, а также апнозомоз, ботрицефалез, гидроактилез, дактилогироз, ихтиофтириоз, кавиоз, кокцидиоз, костиоз, синергазилез, триходиниоз, филометроидоз, хилодонеллез. В эту графу включают также и другие заразные болезни рыб, проявляющиеся в клинической форме или вызывающие гибель рыбы, а также болезни, возбудители которых установлены у свыше 30% исследуемых рыб независимо от степени их поражения. Кроме того, в этой же графе указывают и незаразные болезни (отравления ядовитыми веществами, замор, авитаминозы и т. д.), вызывающие массовую гибель рыб в рыбоводных хозяйствах.

В графе 1 против названия болезни должно быть указано количество рыбоводных хозяйств, рыбцехов, рыбоучастков, территориально обособленных или находящихся на отдельном водоснабжении, в которых выявлена эта болезнь.

В графе 2 указывают, сколько пунктов (хозяйств, рыбцехов, рыбоучастков и т. д.) оздоровлено от данного заболевания.

В графе 3 указывается количество пунктов (хозяйств, рыбцехов, рыбоучастков и т. д.), оставшихся неблагополучными к концу отчетного периода.

В графах 4, 5, 6 указывается соответственно, сколько рыбы погибло от данного заболевания за отчетный период.

## Раздел II. Лечебно-профилактические мероприятия

В подразделе «Профилактические мероприятия» в графе А указываются профилактические (весенне-осенние) обработки, в графах 1, 2, 3 — количество обработанных рыб отдельно по возрастным группам.

При обработке рыбы в антипаразитарных ваннах и прудах при смешанных инвазиях (триходиноз, гидроактилез, ихтиофтириоз и др.) в отчете следует показывать однократное количество обработанной рыбы, а не отдельно по заболеваниям.

В графах 4, 5 указывают количество прудовой площади, выведенной на летование, и площадь прудов, подвергнутая дезинфекции. В подразделе «Лечебные мероприятия» в графе А указываются лечебные мероприятия, проведенные при заболеваниях рыб, указанных в разделе 1, в графах 1, 2, 3 — количество обработанных рыб отдельно по возрастным группам.

К отчету должна быть приложена объяснительная записка, в которой указывают дополнительные сведения:

количество рыбоводных хозяйств (прудовых, садковых, озерно-товарных, рыбопитомников, нерестово-выростных, репродукторов, племрассадников и рыбоводных заводов), входящих в состав Министерства, Главного управления, управления объединения рыбного хозяйства союзной республики, и их краткая санитарно-эпизоотическая характеристика;

вновь выявленные, оздоровленные и остающиеся неблагополучными (по видам болезней) рыбоводные хозяйства (указать в перечне название хозяйств, участков, когда наложен и снят карантин или ограничения);

характеристика возникшей в отчетном полугодии эпизоотии или массовой гибели рыб (название, время и причины возникновения болезни, процент поражения и экономический ущерб, причиненный болезнями или отравлениями);

основные лечебно-профилактические мероприятия, методы оздоровления хозяйств (летование, комплексный метод), применяемые лечебно-профилактические препараты и их эффективность.

### Приложение 3

#### Численные выражения и размерности лабораторных тестов в новой (Международной) и старой системах единиц (из Пиксанов, Осадчая, 1973)

Показатели	Прежнее обозначение	Обозначение в системе СИ
Гемоглобин крови	15,6%	156 г/л
Содержание гемоглобина в одном эритроците	32 мк мкг	32 пг
Цветной показатель	0,95	0,95
Диаметр эритроцита	7,34 мк	7,34 мкм
Объем эритроцита	90 мк <sup>3</sup>	90 мкм <sup>3</sup>
Толщина эритроцита	2,2 мк	2,2 мкм
Площадь эритроцита	135 мк <sup>2</sup>	135 мкм <sup>2</sup>
Гематокритное число	47 об. %	0,47 л/л
Резистентность эритроцитов	0,42%	0,42%
Реакция оседания эритроцитов (РОЭ) — скорость оседания эритроцитов (СОЭ)	11 мм/ч	11 мм/ч
Вязкость крови	5	1/5 или 5 <sup>-1</sup>
Число эритроцитов в крови	4 480 000 в 1 мм <sup>3</sup>	4,48 · 10 <sup>6</sup> в 1 мкл
Число лейкоцитов в крови	7200 в 1 мм <sup>3</sup>	7,2 · 10 <sup>3</sup> в 1 мкл
Число тромбоцитов в крови	304 000 в 1 мм <sup>3</sup>	30,4 · 10 <sup>4</sup> в 1 мкл
Число миелокариоцитов в костном мозгу	247 000 в 1 мм <sup>3</sup>	0,247 · 10 <sup>6</sup> в 1 мкл
Общий белок сыворотки крови	7,8 г%	78 г/л
Содержание железа в сыворотке крови	78 гамма %	780 мкг/л
Длина митохондрии	150 Å	15 нм

## Обработка предметных стекол для мазков крови

1. Предметные стекла, бывшие в употреблении, замачивают в растворе любого стирального порошка (6 столовых ложек стирального порошка растворяют в 3 л теплой водопроводной воды), затем мягкой щеткой или комком ваты тщательно моют и промывают в водопроводной, а потом в дистиллированной воде. Воду меняют по нескольку раз. Стекла вытирают полотенцем и кладут на хранение в смесь 96°-ного спирта и эфира 1:1. Перед работой стекла вынимают из смеси и тщательно вытирают чистым и мягким полотенцем.

2. Стекла, не бывшие в употреблении, промывают в горячей воде, насухо вытирают, затем кладут в стеклянную широкогорлую банку со смесью спирта и эфира и в ней хранят, вынимая при необходимости.

## Приложение 5

## Приготовление растворов для окраски мазков крови по Паппенгейму

**Приготовление раствора Май-Грюнвальда.** Раствор красителя-фиксатора Май-Грюнвальда имеется в продаже в готовом виде. Это раствор эозинметилового синего в метиловом спирте). При отсутствии готового красителя-фиксатора его готовят, растворяя 0,250 г сухого красителя Май-Грюнвальда в 100 мл абсолютного метилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения раствор 2 раза фильтруют и хранят в плотно закрывающемся сосуде.

**Приготовление рабочего раствора Романовского.** В продаже имеется готовый раствор красителя Романовского. При окраске мазков крови его разводят нейтральной дистиллированной водой в соотношении 2 мл раствора краски на 100 мл нейтральной воды. Время окраски зависит от температуры раствора: чем выше температура, тем меньше времени необходимо для окраски мазков.

## Приложение 6

## Нейтрализация дистиллированной воды буферными смесями

Готовят  $1/15$  н. растворы: 1) динатрийфосфата ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), высушенного в теплом месте в течение 5 сут, растворяя 11,876 г его в 1 л дистиллированной воды; 2) монофосфата калия ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), растворяя 9,076 г его в 1 л дистиллированной воды. Эти растворы хранят в темном месте, прибавляя к ним кристаллик тимола во избежание образования плесени. Пользоваться ими можно до образования в них хлопьев. Для нейтрализации воды необходимо приготовить раствор из 7 частей первого и 3 частей второго растворов. Смесь добавляют к воде в соотношении 1:100.

## Приложение 7

## Приготовление забуференного изотонического раствора хлористого натрия

Фосфатный буфер готовят путем смешивания в определенном соотношении раствора двузамещенного фосфорнокислого натрия  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  и однозамещенного фосфорнокислого калия  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . Перед растворением натриевую соль прокалывают до постоянной массы и хранят в герметической емкости. Для приготовления 0,158 М фосфатного буфера в 1 л дистиллированной воды растворяют 28,149 г фосфорнокислого натрия и в другой колбе в 1 л воды растворяют 21,504 г калиевой соли. Навеску соли готовят на аналитических весах. Количество натриевого и калиевого растворов, смешиваемых для получения буфера с известным рН, представлены в таблице.

### Приготовление фосфатного буфера с известным рН

рН буфера после смешивания ингредиентов	Количество смешиваемых ингредиентов, мл		рН буфера после смешивания ингредиентов	Количество смешиваемых ингре- диентов, мл	
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$		$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
4,94	0,1	9,9	6,81	5,0	5,0
5,29	0,25	9,75	6,98	6,0	4,0
5,59	0,50	9,5	7,17	7,0	3,0
5,91	1,0	9,0	7,38	8,0	2,0
6,24	2,0	8,0	7,73	9,0	1,0
6,47	3,0	7,0	8,04	9,5	0,5
6,64	4,0	6,0	8,34	9,75	0,25
			8,67	9,9	0,1

Наиболее часто в серологических исследованиях применяют забуференный изотонический раствор хлористого натрия (ЗИР) с рН, близким к нейтральному. Для приготовления ЗИР с рН 7,17 готовят следующую смесь:

NaCl	0,85 г
0,158 М фосфатный буфер с рН 7,17	10 мл
Дистиллированная вода	До 100 мл

Полученный раствор фильтруют и используют при проведении реакций.

Протоколы учета серологических реакций  
 Протокол учета ОРАБ

№ п/п	Исследуемый материал	Диагностикум	Условия проведения реакции	Разведения сыворотки						Контроль диагностичности	Приложение	
				1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320			1:640

Протокол учета РГА или РПГА

№ п/п	Исследуемый материал	Эритроциты	Условия проведения реакции	Разведения сыворотки										Контроль эритроцитов	Приложение
				1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	или			
				1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1,6 т.*	1:3,2 т.	1:6,4 т.				

## Приготовление раствора Олсвера

Декстроза (глюкоза)	2,5 г
Лимоннокислый натрий	0,8 г
Хлористый натрий	0,42 г
Вода дистиллированная	До 100 мл

После растворения ингредиентов с помощью 10%-ной лимонной кислоты получают рН 6,1. Полученный раствор стерилизуют, прогревая его в кипящей водяной бане по 20 мин ежедневно в течение 3 дней, а затем оставляют при комнатной температуре. Хранят раствор после трехкратного прогрева при 6°C.

## Приложение 10

## Рецепты красителей и реактивов для бактериологических исследований

Приготовление многих красящих растворов основано на применении насыщенных спиртовых растворов красителей, приготовление которых одинаково для всех.

8—10 г красителя высыпают во флакон, заливают 100 мл 96°-ного спирта-ректификата и ставят на 18—20 ч в термостат при 37°C, периодически взбалтывая. Такие насыщенные растворы могут храниться длительное время во флаконах из темного стекла.

Из насыщенных спиртовых растворов готовят спиртово-водные растворы: насыщенный спиртовый раствор красителя смешивают в различных соотношениях с дистиллированной водой.

## 1. Кристалл-виолет — насыщенный спиртовый раствор

Кристалл-виолет	10 г
Этиловый спирт 96°-ный	100 мл

## 2. Кристалл-виолет — спиртово-водный раствор

Насыщенный спиртовый раствор кристалл-виолета	1 мл
Дистиллированная вода	10 мл

## 3. Кристалл-виолет — карболовый раствор

Кристалл-виолет	1 г
Карболовая кислота	2 г
Этиловый спирт 96°-ный	10 мл
Вода дистиллированная	100 мл

Вместо кристалл-виолета можно использовать генциан-виолет и метил-виолет, но растворы из них менее стойкие.

## 4. Фуксин — насыщенный спиртовый раствор

Фуксин основной	8—9 г
Этиловый спирт 96°-ный	100 мл

## 5. Фуксин Циля

К 10 мл насыщенного спиртового раствора фуксина приливают 90 мл карболовой кислоты (не наоборот!). Смесь энергично встряхивают в течение нескольких минут и фильтруют. Раствор можно хранить длительное время во флаконе из темного стекла.

## 6. Фуксин Пфейфера

Фуксин Циля	1 мл
Вода дистиллированная	9 мл

### 7. Метиленовый синий — насыщенный спиртовый раствор

Метиленовый синий	8—9 г
Этиловый спирт 96°-ный	100 мл

### 8. Метиленовый синий — спиртово-водный раствор

Метиленовый синий насыщенный спиртовый раствор	1 мл
Дистиллированная вода	30 мл

### 9. Метиленовый синий Лёффлера

Насыщенный спиртовый раствор метиленового синего	30 мл
Дистиллированная вода	99 мл
КОН 1%-ный	1 мл

Насыщенный спиртовый раствор метиленового синего фильтруют через бумажный фильтр, добавляют КОН и разбавляют дистиллированной водой. Раствор красителя можно хранить в течение длительного времени.

### Приготовление красящих бумажек по Синёву

#### 10. Кристалл-виолет

Кристалл-виолет	1 г
Этиловый спирт 96°-ный	100 мл
Глицерин	5 мл

#### 11. Фуксин основной

Фуксин	2 г
Этиловый спирт 96°-ный	100 мл
Глицерин	1 мл

#### 12. Фуксин карболовый Циля

Фуксин Циля	100 мл
Глицерин	1—2 мл

#### 13. Метиленовый синий

Метиленовый синий	1 г
Этиловый спирт 96°-ный	100 мл
Глицерин	1 мл

Фильтровальную бумагу нарезают полосками 4,5×50 см и погружают в лоток с красителем на несколько секунд так, чтобы смочились обе поверхности. После этого окрашенные полоски вынимают пинцетом, дают красителю стечь и подвешивают для просушивания при комнатной температуре. Высушенные полоски бумаги разрезают на кусочки размером 2×4,5 см и хранят в чашках Петри или банках.

### Растворы

#### 14. Изотонический раствор хлорида натрия

8,5 г хлорида натрия растворяют в 1 л дистиллированной воды, доводят до кипения, после охлаждения фильтруют через бумажный фильтр, разливают в колбы или пробирки, автоклавировуют при 1 атм в течение 20 мин.

#### 15. Раствор Люголя

Кристаллический йод	1 г
Йодид калия	2 г
Дистиллированная вода	300 мл

Йодид калия растворяют в 10 мл дистиллированной воды и прибавляют кристаллический йод. После полного растворения йода доливают остальное количество воды.

## 16. Приготовление спиртовых растворов нужной концентрации

Измеряют спиртометром концентрацию спирта при температуре окружающей среды и делают расчет по формуле  $X = P A / B$ , где  $X$  — количество спирта исходной концентрации;  $P$  — желаемое количество спирта нужной концентрации;  $A$  — нужная концентрация спирта;  $B$  — исходная концентрация.

**Пример.** Предположим, что необходимо получить 100 г 60°-ного спирта. Исходная концентрация спирта 97,3°. Подставляем данные в формулу  $X = (100 \cdot 60 / 97,3) = 61,6$ , т. е.

к 61,6 г 97,3°-ного спирта доливают воду до 100 г, чтобы получить 60°-ный спирт:

$$100 - 61,6 = 38,4.$$

Чтобы получить 100 г 60°-ного спирта, необходимо к 61,6 г исходного спирта добавить 38,4 г воды.

## Приложение 11

### Индикаторы

#### 17. Лакмусовая настойка

Имеющийся в продаже лакмус растирают в фарфоровой ступке в порошок и экстрагируют десятикратным количеством 96°-ного спирта в течение 3 сут при 37°С. Спирт ежедневно меняют, затем его сливают, осадок высушивают в термостате, заливают десятикратным количеством дистиллированной воды и настаивают в течение 3 сут при комнатной температуре, после чего фильтруют. Настойку хранят в хорошо закрытом флаконе из темного стекла.

#### 18. Индикатор Андреде

Фуксин кислый	0,5
Едкий натр (1 н. раствор)	16,4 мл
Дистиллированная вода	100 мл

Индикатор выдерживают в течение 1 сут в термостате при 37°С, затем в течение 2 сут на свету. Хранят его во флаконах из темного стекла с притертой пробкой. Исходный цвет, соломенно-желтый. При уменьшении рН появляется ярко-малиновая окраска.

#### 19. Бромтимоловый синий

Бромтимоловый синий	0,4 г
Дистиллированная вода	40 мл

Нагревают до кипения, добавляют 6,4 мл 0,1 н. раствора едкого натра и доливают до 100 мл дистиллированной водой. Индикатор хранят во флаконе из темного стекла с притертой пробкой.

При рН 7 индикатор имеет травянистый цвет, в щелочной среде — синий, в кислой — желтый с различными оттенками.

#### 20. Индикаторная бумага на сероводород

Ацетат свинца	20 г
Бикарбонат натрия	1 г
Дистиллированная вода	100 мл

В растворе смачивают фильтровальную бумагу, высушивают на воздухе и нарезают полосками размером 0,4×5 см. При образовании бактериальной культуры сероводорода бесцветная бумага окрашивается в черно-бурый цвет.

#### 21. Индикаторная бумага на индол

Парадиметиламидобензальдегид	5 г
Этиловый спирт 96°-ный	50 мл
Фосфорная кислота	10 мл

Тепловатой жидкостью смачивают фильтровальную бумагу, высушивают, нарезают полосками размером 0,4×5 см и хранят в банке из темного стекла. При наличии индола желтоватые бумажки окрашиваются в серовато-розовый или интенсивно-малиновый цвет.

## 22. Вибростатический агент 0/129

0,1 г препарата растворяют в 10 мл ацетона и наносят 0,02 мл на диск фильтровальной бумаги. Высушивают при 37°C до испарения ацетона. Хранят диски в плотно закрытой банке при 4°C.

## 23. Диски с новобиоцином

Используют 5 мкг новобиоцина на диск (натриевая соль новобиоцина хорошо растворяется в воде при pH 7,5).

Тесты на чувствительность к вибростатическому агенту 0/129 и новобиоцину ставят одновременно на пластинчатом агаре аналогично определению чувствительности к антибиотикам методом диффузии в агар с помощью индикаторных дисков.

## Приложение 12

### Рецепты основных питательных сред

#### 24. Мясная вода

Мясо, очищенное от жира и сухожилий, пропускают через мясорубку, заливают двойным количеством холодной дистиллированной воды и настаивают при температуре 4—6°C в течение 16—24 ч, затем кипятят в течение 1 ч. До начала кипения снимают появившуюся накипь. После кипячения остывшую мясную воду фильтруют через фильтровальную бумагу, доливают дистиллированной водой до первоначального объема, разливают по бутылкам и стерилизуют при 1 атм в течение 30—40 мин. Перед приготовлением бульона мясную воду снова фильтруют.

При использовании рыбьего мяса лучше брать судака или щуку, так как их мясо менее жирное. 1 кг мяса рыбы освобождают от костей, заливают двойным количеством дистиллированной воды и кипятят в течение 3—5 мин. После охлаждения воду осторожно сливают с осадка, разливают по флаконам и стерилизуют, как мясную воду.

#### 25. Мясопептонный бульон. (МПБ)

К мясной воде прибавляют 1% пептона и 0,5% хлористого натрия, нагревают при помешивании до растворения пептона. После этого устанавливают pH с помощью 20%-ного раствора едкого натра. Следует учитывать, что после стерилизации pH снижается на 0,5—0,4. Если МПБ используют для приготовления плотных сред, pH должен быть не ниже 8,2—8,4. Бульон кипятят в закрытой емкости в течение 30—40 мин, предварительно отметив уровень жидкости. После кипячения доливают до исходного уровня дистиллированной водой, окончательно устанавливают pH, разливают по бутылкам и автоклавируют при 1 атм в течение 20—30 мин.

#### 26. Мясопептонный агар (МПА)

К мясопептонному бульону с pH 8,2—8,4 добавляют мелконарезанный агар-агар и нагревают при постоянном помешивании до полного растворения агара. Доливают горячую дистиллированную воду до первоначального объема, кипятят, устанавливают pH, фильтруют в горячем виде через ватно-марлевый фильтр, разливают в пробирки или колбы, стерилизуют при 1 атм в течение 20—30 мин.

В зависимости от назначения среды добавляют 0,15—0,5—1,5—2,0—5,0% агар-агара.

#### 27. Кровавый агар

К расплавленному и охлажденному до 45°C МПА стерильно добавляют 5—10% дефибринированной крови кролика, барана или человека. Агар с кровью тщательно перемешивают (при этом следят, чтобы не образовывалась пена)

и разливают по чашкам и пробиркам. Обязательна проверка на стерильность (чашки и пробирки выдерживают в течение 1 сут в термостате).

### 28. Сывороточный агар

К расплавленному и охлажденному до 45°C МПА прибавляют 10—15% лошадиной или бычьей стерильной сыворотки и тщательно перемешивают, после чего разливают в чашки Петри.

### 29. Свернутая кровяная сыворотка

Стерильную лошадиную или бычью сыворотку разливают по 3 мл в пробирки и подвергают свертыванию при наклонном положении пробирок в свертывателе.

### 30. Мясопептонная желатина (МПЖ)

К МПБ с pH 8,0 добавляют мелкораскрошенный желатин (в теплое время года 15—20%, в холодное 10—12%), при постоянном помешивании нагревают до 40—50°C. После полного растворения желатина устанавливают pH 7,1—7,3 и прогревают в течение 1 ч текучим паром, пропускают через ватно-марлевый фильтр, разливают по пробиркам и стерилизуют текучим паром в течение 2 дней по 20 мин.

### 31. Молоко с лакмусом

Свежее молоко кипятят в течение 5 мин, следя, чтобы оно не пригорело. После отстаивания в прохладном месте в течение 1 сут сливают верхний жирный слой, повторно кипятят в течение 5 мин и оставляют в течение 1 сут. Повторно снимают верхний слой. Молоко дважды фильтруют через ватно-марлевый фильтр, добавляют 5—10%-ной лакмусовой настойки и столько же 10%-ного раствора углекислой соды, чтобы пена молока приняла синевато-фиолетовый оттенок, затем разливают в пробирки и стерилизуют текучим паром в течение 2 дней по 30 мин.

При кислотообразовании молоко становится розовым до красного, при щелочеобразовании — сине-фиолетовым до синего.

### 32. Мясопептонный агар с крахмалом

МПА расплавляют и добавляют 0,5%-ного растворимого крахмала, предварительно растворенного в небольшом количестве воды. Смесь тщательно перемешивают, подогревая на водяной бане, разливают по пробиркам и в наклонном положении стерилизуют текучим паром в течение 3 дней по 1 ч.

Изучаемую культуру засевают штрихом. Через 18—20 ч инкубирования в термостате выросшую на скошенной поверхности культуру заливают раствором Люголя. При гидролизе крахмала вокруг культуры на черно-фиолетовом фоне возникает бурая или светлая зона.

### 33. Картофельная среда

Используют желтый картофель, не распадающийся при стерилизации. Очищенный картофель тщательно несколько раз ополаскивают водой и с двух противоположных сторон срезают небольшие кусочки (рис. 115). Сверлом для

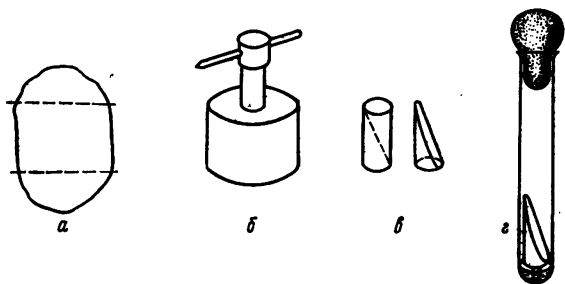


Рис. 115. Схема приготовления картофельной среды: а — подготовка картофельного клубня; б — нарезание цилиндриков; в — подготовка «клиньев»; г — пробирка с картофельной средой (из Синая, 1948)

пробок нарезают цилиндры длиной около 4 см и разрезают по диагонали на 2 клина, которые помещают в 1%-ный раствор двууглекислой соды на 1—2 ч. После этого каждый клин слегка обсушивают марлей и помещают основанием вниз в пробирку, на дно которой в небольшое количество дистиллированной воды кладут стеклянную трубку. Это предохраняет картофель от разваривания и высыхания. Пробирки стерилизуют при 0,5 атм в течение 20 мин.

После автоклавирования пробирки в течение нескольких часов выдерживают в наклонном положении плоской поверхностью картофеля вниз, чтобы куски картофеля при хранении не изгибались.

#### 34. Среда Клодницкого

К 900 мл кипящего МПБ (рН 7,6) добавляют 20 г глюкозы и 100 мл 1%-ного расплавленного МПА (рН 7,6).

В охлажденной смеси пузырьки воздуха при встряхивании пробирки должны подниматься медленно. Среду разливают по 8—10 мл в пробирки и автоклавируют при 0,5 атм в течение 20 мин.

В этой среде хорошо развиваются аэробы и анаэробы и уменьшается проявление антагонизма при развитии микробных ассоциаций.

#### 35. Среда Китта-Тароци

Говяжью печень нарезают кусочками по 1—1,5 г, заливают тройным количеством МПБ (рН 7,0) и кипятят в течение 30 мин. Бульон фильтруют, разливают по 10 мл в пробирки. Печень промывают водой под краном и кладут по 4—5 кусочков в каждую пробирку. Бульон заливают слоем вазелинового масла и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм в течение 30 мин.

#### 36 Цитофага-агар

Триптон	0,5 г
Дрожжевой экстракт	0,5 г
Ацетат натрия	0,2 г
Агар-агар	11,0 г
Хлористый кальций	0,02 г
Дистиллированная вода	1000 мл
рН	7,2

Все компоненты вносят в воду, нагревают, постоянно помешивая, до полного растворения, разливают по флаконам и автоклавируют при 0,5 атм в течение 30 мин.

#### 37. Среда Шмиц-Шанделье (модификация Пешкова)

МПБ (сброженный)	1000 мл
Агар-агар	20 г
Конго-рот (30%-ный водный раствор)	100 мл
Сахароза (30%-ный водный раствор)	50 мл
Едкий натр (4%-ный раствор)	5 мл

Для приготовления среды стерильный МПБ засевают суточной культурой кишечной палочки и инкубируют в течение 1 сут при 37°C. После этого среду стерилизуют текущим паром в течение 30 мин, охлаждают и получают рН 7,6. Добавляют измельченный агар, дают ему набухнуть в течение 2 ч, взвешивают и кипятят при помешивании до расплавления агара. Добавляют в МПА дистиллированную воду до первоначального объема, фильтруют, разливают в бутылки по 100 мл и автоклавируют при 1 атм в течение 15 мин.

4%-ный раствор щелочи (х. ч. едкий натр) готовят в стерильной колбе на стерильной дистиллированной воде.

Перед использованием МПА расплавляют. К 10 мл конго-рот стерильно добавляют 0,5 мл щелочи и 5 мл сахарозы, нагревают до 80°C на водяной бане и смесь вливают в МПА, хорошо размешивают и разливают по чашкам Петри. Среда прозрачная, красно-рубинового цвета.

## 38. Среда Кларка

Пептон ферментативный	0,5 г
Глюкоза	0,5 г
Калий фосфорнокислый двузамещенный ( $K_2HPO_4$ )	0,5 г
Дистиллированная вода	100 мл

Указанные компоненты растворяют в 80 мл воды и подогревают на водяной бане при помешивании в течение не менее 20 мин. После полного растворения смесь фильтруют через бумажный фильтр, охлаждают до 20°C и доливают дистиллированной водой до 100 мл, разливают по 2 мл в пробирки и стерилизуют текучим паром в течение 3 дней по 30 мин.

## 39. Среда Хью-Лейфсона

Пептон	2 г
Хлорид натрия	5 г
Калий фосфорнокислый двузамещенный ( $K_2HPO_4$ )	0,3 г
Глюкоза	10 г
Бромтимоловый синий	0,03 г
Агар-агар	3 г
Дистиллированная вода	1000 мл
pH	7,1—7,2

К воде добавляют пептон, хлорид натрия и агар-агар. Смесь подогревают до расплавления агара, после чего добавляют фосфат калия и глюкозу и кипятят еще в течение 2—3 мин. С помощью 20%-ного раствора едкого натра получают pH 7,4—7,5, доводят объем среды до первоначального и добавляют 3 мл 1%-ного водного раствора бромтимолового синего. Среду фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают по 4—5 мл в стерильные пробирки и стерилизуют при 0,5 атм в течение 20 мин. Цвет среды до стерилизации синий, после автоклавирования — травянисто-зеленый (pH 7,1—7,2). При кислой реакции среда желтеет.

## 40. Среда с аминокислотой

Синтетическая среда 199	5 мл
Глюкоза	0,05 мл
Аминокислота	50—200 мг
Дистиллированная вода	До 10 мл
pH	7,2

Вначале в 3 стерильные пробирки вносят по 4 мл дистиллированной воды и аминокислоты (50 мг *l*-аргинина и по 100 мг *l*-орнитина и *l*-лизина; при *dl*-формам аминокислот количество их удваивается).

Рабочие растворы аминокислот стерилизуют кипячением, их можно готовить впрок. 0,05%-ный раствор глюкозы готовят из 40%-ной стерильной глюкозы, продающейся в аптеках. Перед употреблением среды стерильно смешивают аминокислоту, глюкозу и среду 199 в соотношении 4:1:5. В контроле аминокислоту заменяют стерильной дистиллированной водой. Исходная среда светлорозового цвета, при кислой реакции (отрицательной) — желтого, при щелочной (положительной) — от оранжевого до сиреневого цвета.

## 41. Среды Гисса для определения ферментативной активности

Пептон	1 г
Хлорид натрия	0,5 г
Углевод	0,5—1 г
Индикатор Андреде	1 мл
Дистиллированная вода	100 мл
pH	7,0—7,4

Пептон и соль вносят в воду и нагревают в течение нескольких минут до растворения, фильтруют и прибавляют один из углеводов (лактозу, сахарозу, маннит или др.) и индикатор Андреде, тщательно перемешивают и разливают

в пробирки, простерилизованные вместе с поплавками (если нет поплавков, можно использовать небольшие хлопья стерильной ваты). Стерилизуют в течение 20 мин при 0,5 атм. Среду с 1-арабинозой стерилизуют при 0,1—0,2 атм в течение 20 мин. Исходный цвет среды соломенно-желтый, при кислотообразовании бактерий — ярко-розовый, малиновый.

Газообразование определяют по наличию пузырьков газа в поплавке или комочке ваты, который при этом поднимается вверх.

#### 42. Лактозо-сахарозная среда

Пептон	5 г
Хлорид натрия	5 г
Лактоза	10 г
Сахароза	1 г
Агар-агар	10 г
Индикатор Андресе	40 мл
Дистиллированная вода	1000 мл
pH	7,2—7,4

Среду варят, фильтруют, разливают в стерильные пробирки по 5—7 мл и стерилизуют при 0,5 атм в течение 20 мин. После стерилизации среду охлаждают в наклонном положении, чтобы получился столбик.

#### 43. Среда с глицерином

Мясной экстракт	0,5 г
Пептон	1,0 г
Хлорид натрия	0,3 г
Натрий фосфорнокислый двузамещенный	0,2 г
Бромтимолблау	1,2 мл
Дистиллированная вода	100 мл
pH	7,4

При постоянном помешивании нагревают до растворения пептона и добавляют 1% стерильного глицерина. Наливают по 5 мл в пробирки, опускают поплавки или небольшие хлопья ваты. Автоклавируют при 0,5 атм в течение 30 мин.

Для приготовления индикатора 1 г бромтимолблау растворяют в 25 мл 0,1 н. раствора едкого натра и доливают 475 мл дистиллированной воды.

Среду засевают суточной изучаемой культурой. Положительный результат — появление пузырьков газа в поплавке или вате при инкубировании при 25—26°C.

#### 44. Среда для определения мезо-2,3-бутандиолдегидрогеназы (по J. Lehmann, 1978)

Протеозопептон	0,5 г
$K_2HPO_4$	0,5 г
Дистиллированная вода	100 мл

Нагреть до полного растворения, простерилизовать текучим паром в течение 15 мин, охладить и добавить 0,5 г мезо-2,3-бутандиола, установить pH 6, среду профильтровать и разлить в пробирки по 2 мл.

Изучаемую культуру засевают петлей, инкубируют при 25—30°C в течение 24—48 ч. Добавляют кристаллик креатинина и реактивы для реакции Фогес — Проскауэра по Барриту (40%-ный KOH и 6%-ный альфа-нафтол в абсолютном спирте), пробирки сильно встряхивают. Учет реакции через 10 мин.

Положительный результат — красное окрашивание, отрицательный — грязно-желтое.

#### Среды для культивирования грибов

##### 45. Среда Чапека

Натрий азотнокислый	2 г
Калий фосфорнокислый однозамещенный	1 г
Магний сернокислый	0,5 г

Калий хлористый	0,5 г
Железо сернокислое	0,012 г
Глюкоза	30 г
Вода	1000 мл
Агар-агар	2,5%

Нагревают до растворения агар-агара, не допуская пригорания, фильтруют через ватно-марлевый фильтр и стерилизуют при 0,5 атм в течение 20 мин.

#### 46. Среда с рыбным экстрактом

Свежую рыбу очищают от чешуи, нарезают на мелкие кусочки, гомогенизируют в ступке, заливают десятикратным количеством воды. Полученную суспензию кипятят в течение 30 мин, добавляют 1,5% агар-агара и 1% глюкозы, фильтруют и стерилизуют при 0,5 атм в течение 20 мин.

Для предупреждения бактериального роста на средах применяют смесь пенициллина и стрептомицина, содержащую по 5000 ЕД антибиотиков в 1 мл 0,9%-ного раствора хлористого натрия. Смесь хранят в холодильнике не более 1 нед. По мере надобности берут две капли смеси, наносят на агаровую среду, предназначенную для посева.

#### Приложение 13

Связь центробежного ускорения с параметрами ротора центрифуги

Осаждение частиц при центрифугировании достигается действием на них центробежной силы, возникающей при вращении ротора. Величина этой силы прямо пропорциональна развиваемому центробежному ускорению:

$$F_{ц} = m a_{ц},$$

где  $m$  — масса частицы;  $a_{ц}$  — центробежное ускорение.

Для того чтобы один и тот же режим центрифугирования можно было воспроизвести на центрифугах различных марок, именно величину центробежного ускорения, а не частоту вращения ротора необходимо указывать для характеристики процесса центрифугирования. Центробежное ускорение принято выражать количеством  $g$  ( $g$  — ускорение свободного падения). Преобразовав известное из механики выражение для  $a_{ц}$  и подставив числовые значения, получаем

$$a_{ц} = g \cdot 1,118 \cdot 10^{-5} n^2 r,$$

где  $g$  — ускорение свободного падения,  $g = 9,8$  м/с<sup>2</sup>;  $n$  — частота вращения ротора, об/мин;  $r$  — радиус вращения, см;  $r$  берут до середины вращающейся пробирки.

По этой формуле, зная  $a_{ц}$ , легко рассчитать необходимую частоту вращения  $n$  и, наоборот, зная  $n$ , определить величину  $a_{ц}$ .

#### Приложение 14

Приготовление буферных растворов для определения чувствительности вируса к кислоте с рН 3,0

Оба буферных раствора готовят на биdistиллированной воде в посуде, прошедшей принятую для вирусологических исследований обработку.

**Фосфат-цитратный буфер (рН 3,0).** К 4,11 мл 0,2 М раствора  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  добавляют 15,89 мл 0,1 М раствора лимонной кислоты. Раствор готовят в стеклянном флаконе, определяют величину рН и хранят в холодильнике.

**Трис-НСI буфер (рН 8,0).** К 20 мл 0,3 М раствора трис-(оксиметил)-аминометана приливают небольшими порциями 0,3 н. НСI. Контролируя величину рН с помощью рН-метра, доводят ее до 8,0. Полученный буфер проверяют на безвредность для клеток, заменяя им питательную среду в пробирке с культурой клеток на несколько часов. Если по истечении этого времени культура клеток сохраняет нормальный вид, раствор стерилизуют фильтрованием через мембранный фильтр и хранят в холодильнике.

Рецепты приготовления реактивов для заливки образцов  
в эпоксидные смолы

Запасные растворы	Сохранность
Раствор А 2,26% $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	В замороженном состоянии сохраняется несколько недель
Раствор Б 2,52% $\text{NaOH}$	Хранить в плотно закрытом полиэтиленовом сосуде при комнатной температуре. Стабилен в течение нескольких недель
Раствор В 5,4% глюкоза 2% $\text{OsO}_4$	Готовят перед употреблением В сосуде из темного стекла в холодильнике сохраняется в течение нескольких лет
25%-ный глутаровый диальдегид	В холодильнике сохраняется в течение нескольких месяцев

**2%-ный водный раствор четырехоксида осмия.** Четырехокись осмия летуча и обладает сильным токсическим действием, поэтому работу с ней необходимо проводить только в вытяжном шкафу. В связи с тем что она очень легко восстанавливается, при работе с ее растворами следует использовать химически чистую посуду.

Ампулу с четырехокисью осмия освобождают от этикетки, тщательно отмывают от остатков клея и других загрязнений и, поместив в сосуд с дистиллированной водой, вскрывают под водой. Количество воды должно быть таким, чтобы после полного растворения  $\text{OsO}_4$  образовался 2%-ный раствор. Так как четырехокись осмия растворяется очень медленно, раствор готовят заблаговременно. Для более быстрого растворения сосуд со вскрытой ампулой можно оставить при комнатной температуре в темном месте на 1 сут, а затем поместить в холодильник.

Свежеприготовленный раствор имеет светлую желтовато-зеленую окраску. Если раствор приобретает коричневый или красноватый оттенок, он непригоден к работе. Это же относится и ко всем осмиевым фиксаторам.

Хранят раствор четырехоксида осмия в холодильнике в плотно закрытом сосуде из темного стекла с притертой пробкой.

## Осмиевый фиксатор Миллонига

Раствор А	37,4 мл
Раствор Б	7,6 мл
Раствор В	5 мл
$\text{OsO}_4$	0,5 г

Указанное количество четырехоксида осмия вводят в фиксатор в виде 2%-ного раствора. Для этого 25 мл раствора А (из 37,4 мл) готовят на 2%-ном растворе  $\text{OsO}_4$ .

В замороженном состоянии фиксатор сохраняется в течение нескольких недель.

**4%-ный глутаральдегидный фиксатор на фосфатном буфере Миллонига.**

25%-ный водный раствор глутарового диальдегида	8 мл
Раствор А	32 мл
pH (при добавлении раствора Б)	До 7,3—7,4
Дистиллированная вода	До 50 мл

Фиксатор сохраняется в холодильнике в течение нескольких дней.

## Фосфатный буфер Миллонига

Раствор А	50 мл
Раствор Б	10,2 мл
Раствор В	6,7 мл
pH	7,3—7,4

Фиксатор сохраняется в замороженном состоянии в течение нескольких недель.

#### Эпон-аралдитовая смесь

Эпон 812	5 мл
Эпон-уплотнитель DDSA	11 мл
Аралдит М	3 мл
Дибутилфталат (пластификатор)	0,2 мл

В подогретом состоянии (до 30—40°C) перемешивают в течение 15—20 мин.

#### Готовая заливочная смесь с катализатором

К указанному количеству приведенной выше эпон-аралдитовой смеси добавляют 14—17 капель катализатора DMP-30 и тщательно перемешивают в течение 15—20 мин.

### Приложение 16

#### Рецепты фиксаторов и красителей, наиболее часто употребляемых в икhtiопаразитологии

Для фиксации паразитов, их окраски и хранения в паразитологии применяют различные фиксирующие смеси, красители, среды для заключения паразитов и т. п. В каждой лабораторной работе приводятся методы работы с ними, здесь даются методы их приготовления.

#### Фиксаторы

**Спирты этиловые.** При фиксации и изготовлении препаратов часто приходится употреблять спирты различной крепости. Их готовят из 96°-ного спирта. Для приготовления спирта нужной концентрации можно пользоваться следующей таблицей.

Искомая концентрация спирта, град	Соотношение спирт : вода, %							
	спирт 96°-ный	вода	спирт 90°-ный	вода	спирт 80°-ный	вода	спирт 70°-ный	вода
40	42	58	44	56	50	50	57	43
45	47	53	50	50	56	44	64	36
50	52	48	56	44	63	37	71	29
60	63	37	67	33	75	25	86	14
70	73	27	78	22	88	12	—	—
80	83	17	89	11	—	—	—	—
90	94	6	—	—	—	—	—	—

Для приготовления 100°-ного (абсолютного) спирта в 96°-ный спирт добавляют обезвоженный медный купорос. Обезвоженный медный купорос можно приготовить из кристаллического, прокаливая последний в фарфоровой чашке при непрерывном помешивании. Прокаленный медный купорос должен иметь вид серовато-белого порошка. Пожелтение купороса указывает на то, что его перекалили и такой реактив использовать нельзя. Голубоватый цвет купороса указывает на неполное обезвоживание его. Готовый безводный купорос всыпают в бутылку с притертой пробкой примерно на  $\frac{1}{4}$  объема, доливают доверху 96°-ным спиртом и взбалтывают. Через 2—3 дня абсолютный спирт готов к употреблению.

**Метилловый спирт.** Метилловый спирт используют для фиксации мазков крови. При отсутствии его можно пользоваться смесью равных частей абсолютного этилового спирта и эфира (смесь Никифорова) или чистым эфиром. В обоих случаях срок фиксации удлиняется до 10—20 мин.

**Формалин 4%-ный.** Его получают путем разбавления 40%-ного продажного формальдегида в 10 раз, т. е. к 1 части 40%-ного формалина добавляют 9 частей дистиллированной воды.

**Жидкость Барбагалло.** Она состоит из 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, 30 см<sup>3</sup> 40%-ного формалина, 7 см<sup>3</sup> хлористого натрия.

**Жидкость Шаудина.** Для приготовления жидкости Шаудина необходимо иметь насыщенный раствор сулемы (в 500 см<sup>3</sup> горячей воды растворяют 35 г сулемы) и 96%-ный или лучше абсолютный спирт. Дают раствору сулемы остыть. На дне сосуда должны выпасть кристаллы сулемы. Затем берут две части насыщенного раствора сулемы в одну часть спирта. Хранят жидкость Шаудина в посуде с плотной пробкой. Обращаться с этим фиксатором необходимо 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.

**Жидкость Калецкой.** 17 г желатина заливают 25 мл воды, после набухания подогревают на водяной бане, добавляют 50 г хлоралгидрата и 10 мл глицерина. Смесь ставят на 2 сут в термостат при 35—37°C.

### Краски

**Железный гематоксилин.** 0,5 г кристаллического гематоксилина растворяют в 10 мл 96%-ного спирта, а затем разбавляют 90 мл дистиллированной воды, выливают в колбу и закрывают ватной пробкой. Раствор должен созреть в течение 3—4 нед. Перед употреблением его разбавляют дистиллированной водой в отношении 1:1.

**Железоаммонийные квасцы.** Их используют для протравливания препаратов. Готовят 3%-ный раствор квасцов в дистиллированной воде. Квасцы должны иметь слабо-фиолетовый цвет, кристаллы с желтоватым оттенком для работы непригодны.

**Квасцовый кармин.** 10 г алюмокалиевых квасцов растворяют в 200 мл дистиллированной воды, прибавляют 1 г мелкорастертого кармина, кипятят в течение 10—15 мин, после охлаждения фильтруют. Чтобы не допустить развития плесени, добавляют небольшой кристаллик тимолола.

**Уксуснокислый кармин.** Сухой порошок кармина растворяют при кипячении в 40%-ной уксусной кислоте. После охлаждения раствор фильтруют.

**Реактив Май-Грюнвальда.** В продаже имеется готовый реактив. При отсутствии готового красителя-фиксатора 0,3—0,5 г сухой краски Май-Грюнвальда растворяют в 100 мл чистого метилового спирта с добавлением (или без него) 50 мл чистого глицерина. В обоих случаях краситель созревает при комнатной температуре в течение 4 сут.

**Окраска по Романовскому.** Она применяется для окраски мазков крови. В продаже имеются готовый раствор краски Романовского, а также сухая краска Романовского — Гимзы, из которой готовят раствор: 3,8 г сухой краски Романовского растворяют в 250 мл чистого метилового или этилового (хуже) спирта. Раствор оставляют на 3—5 сут, часто взбалтывая для лучшего растворения краски. Затем прибавляют 250 мл чистого глицерина и вновь оставляют на 3—5 сут, периодически взбалтывая. Перед употреблением готовый раствор краски разводят из расчета 1—2 капли на 1 мл забуференной дистиллированной воды.

### Среды для заключения препаратов

**Глицерин-желатин.** Его используют для фиксации моногеней и микоспоридий. 7 г чистого желатина размачивают в течение 2—3 ч в 42 мл дистиллированной воды, добавляют 50 г чистого глицерина и 0,5 мл карболовой кислоты. Раствор нагревают в водяной бане при постоянном помешивании, фильтруют и охлаждают. Готовый глицерин-желатин удобно хранить в пенициллиновых флаконах. Чтобы удобно было брать мелкие кусочки препарата, флакон следует заполнять не доверху и охлаждать, наклонив его, чтобы образовалась скошенная поверхность.

**Бальзам канадский, или кедровый.** Кусочек бальзама опускают во флакон с ксилолом (удобнее флакон с притертой пробкой) с таким расчетом, чтобы

готовая смесь имела консистенцию сиропа и капля легко наносилась на предметное стекло.

Замаску из канифоли и воска применяют для обведения краев покровного стекла глицерин-желатиновых препаратов, что предохраняет их от высыхания. Для ее приготовления 7 г канифоли расплавляют в фарфоровой чашке с 2 г воска. Замаску на стекло наносят в разогретом виде с помощью тонкой палочки, спички или препаровальной иглы.

**Клей.** Клей для наклеивания этикеток на препараты используют казеиновый (лучше БФ-2, БФ-6 и др.).

## Приложение 17

### Методика приготовления растворов формалина

В лечебных целях часто употребляют формалин различной концентрации. Его готовят из 40%-ного раствора формальдегида путем добавления его в воду в нужном соотношении (см. таблицу).

мл/л	ppm	Соотношение формалина и воды	мл/л	ppm	Соотношение формалина и воды
0,001	1	1:1 000 000	0,010	10	1:100 000
0,002	2	1:500 000	0,015	15	1:66 666
0,003	3	1:333 333	0,020	20	1:50 000
0,004	4	1:250 000	0,025	25	1:40 000
0,005	5	1:200 000	0,100	100	1:10 000
0,006	6	1:166 666	0,166	166	1:6000
0,007	7	1:142 857	0,200	200	1:5000
0,008	8	1:125 000	0,250	250	1:4000
0,009	9	1:111 111	1,000	1000	1:1000

**П р и м е ч а н и е.** ppm (parts per million) — принятое в зарубежной литературе обозначение концентрации растворов, т. е. соотношения одной весовой части вещества на 1 млн. частей воды.

$1 \text{ ppm} = 1 : 1\,000\,000 = 1 \text{ мг/л} = 0,0001\% = 0,001\text{‰}$ .

$\text{мг/л} \neq 1 \text{ мл/л}$ , если  $q$  — плотность вещества не равна 1 ( $1 \text{ мг} = q \cdot 1 \text{ мл}$ ).

## СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атлас вирусной цитопатологии/под ред. В. М. Жданова. — М., 1975. — 260 с.
2. Банина Н. Н. Систематика инфузорий рода *Ariasona*. — Известия ГосНИОРХа, 1977, т. 119, с. 81—100.
3. Бауер О. Н. Экология паразитов пресноводных рыб. — Известия ГосНИОРХа, 1959, т. 49, с. 5—206.
4. Бауер О. Н., Мусселиус В. А., Стрелков Ю. А. Болезни прудовых рыб. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. — 320 с.
5. Бауер О. Н., Мусселиус В. А., Николаева В. М. Ихтиопатология. — М.: Пищевая промышленность, 1977. — 431 с.
6. Билай В. И. Основы общей микологии. — Киев: Вища школа, 1980. — 260 с.
7. Быховская-Павловская И. Е. Паразитологические исследования рыб. — Л.: Наука, 1969. — 108 с.
8. Быховский Б. Е. Моногенетические сосальщики, их система и филогения. — М.: Изд-во АН СССР, 1957. — 509 с.
9. Ванятинский В. Ф., Мирзоева Л. М., Поддубная А. В. Болезни рыб. — М.: Пищевая промышленность, 1979. — 232 с.
10. Ведемейер Г. А., Мейер Ф. П., Смит Л. Стресс и болезни рыб: перевод с англ., 1976, США. — М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. — 127 с.
11. Гаевская А. В., Ковалева А. А. Болезни промысловых рыб Атлантического океана. — Калининградское книжное изд-во, 1975. — 124 с.
12. Гинецинская Т. А. Трематоды, их жизненные циклы, биология и эволюция. — Л.: Наука, 1968. — 406 с.
13. Гончаров Г. Д. Лабораторная диагностика болезней рыб. — М.: Колос, 1973. — 119 с.
14. Головина Н. А. Методы гематологических исследований в ихтиопатологической практике. — В кн.: Экспресс-информация. Рыбохозяйственное использование внутренних водоемов. № 4, 1979, с. 8—18.
15. Голодец Г. Г. Лабораторный практикум по физиологии рыб. — М., Пищепромиздат, 1955. — 90 с.
16. Голубев Д. Б., Соминина А. А., Медведева М. Н. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии. — Л.: 1976. — 224 с.
17. Догель В. А. Общая паразитология. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1962. — 461 с.
18. Дубинина М. Н. Ремнецы *Cestoda Ligululidae* фауны СССР. — М.: Л.: Наука, 1966. — 259 с.
19. Иванова Н. Т. Материалы к морфологии крови рыб (учебное пособие). — Ростов-на-Дону, 1970. — 136 с.
20. Иванова Н. Т. Атлас клеток крови рыб. — М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. — 300 с.
21. Канаев А. И. Ветеринарная санитария в рыбоводстве. — М.: Колос, 1973. — 224 с.
22. Кац А. М., Канторович А. С. Руководство по приборам и оборудованию для медико-биологических исследований. — Л.: Медицина, 1976. — 255 с.
23. Кашкин П. Н., Хохряков М. К., Кашкин А. П. Определитель

патогенных, токсигенных и вредных для человека грибов. — Л.: Медицина, 1979. — 269 с.

24. Краткий определитель бактерий Берги: перевод с англ./под ред. Г. А. Заварзина. — М.: Мир, 1980. — 444 с.

25. Руководство к практическим занятиям по технике лабораторных работ/Г. М. Крючкова, А. Я. Любина, Ю. М. Неменова, М. Э. Полеев. — М.: Медицина, 1977. — 232 с.

26. Курасова В. В., Костин В. В., Малиновская Л. С. Методы исследования в ветеринарной микологии. — М.: Колос, 1971. — 312 с.

27. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. — М.: Медицина, 1978. — 392 с.

28. Лурия С., Дарнелл Дж., Балтимор Д., Кэмпбелл Э. Общая вирусология. — М.: Мир, 1981. — 680 с.

29. Ляйман Э. М. Курс болезней рыб. — М.: Высшая школа, 1966. — 331 с.

30. Маркевич А. П. Паразитические веслоногие рыб СССР. — Киев: Изд-во АН УССР, 1956. — 257 с.

31. Методы вирусологии и молекулярной биологии: перевод с англ. Л. Б. Меклера. — М.: Мир, 1972. — 444 с.

32. Мусселиус В. А. Паразиты и болезни растительноядных рыб дальневосточного комплекса в прудовых хозяйствах СССР. — Труды ВНИИПРХа, 1973, т. 22, с. 4—129.

33. Мусселиус В. А., Головин П. П. Газопузырьковая болезнь рыб в хозяйствах индустриального типа. — Рыбное хозяйство, 1977, № 5, с. 33—36.

34. Никитин В. М. Справочник серологических реакций. — Кишинев: Штиинца, 1977. — 206 с.

35. Новые методы культуры животных тканей: перевод с англ./под ред. Ю. М. Оленова. — М.: Мир, 1976. — 256 с.

36. Определитель паразитов пресноводных рыб СССР/под ред. Б. Е. Быховского. — Л.: изд-во АН СССР, 1967. — 772 с.

37. Определитель паразитов позвоночных Черного и Азовского морей/под ред. В. Н. Грезе, С. Л. Делямуре, В. М. Николаевой. — Киев: Наукова думка, 1975. — 552 с.

38. Практическая вирусология: перевод с нем./под ред. В. Н. Сюрина. — М.: Колос, 1970. — 352 с.

39. Руководство по микробиологической диагностике инфекционных болезней/под ред. К. И. Матвеева и М. И. Соколова. — М.: Медицина, 1964. — 682 с.

40. Справочник по болезням рыб/под ред. В. С. Осетрова. — М.: Колос, 1978. — 351 с.

41. Справочник по клиническим и лабораторным методам исследования. — 2-е изд., перераб. и доп./под ред. Е. А. Кост. — М.: Медицина, 1975. — 383 с.

42. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования/под ред. М. О. Биргера. — М.: Медицина, 1973. — 433 с.

43. Судариков В. Е. Новая среда для просветления препаратов гельминтов. — Труды гельминтологической лаборатории АН СССР, 1965, т. XV, с. 156—157.

44. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. — М., 1975. — 324 с.

45. Факторович К. А. О явлении липоидной дегенерации печени форели в связи с применением искусственных кормов. — Труды совещ. ихтиологической комиссии, 1959, вып. 9, с. 69—73.

46. Шигин А. А. Метасперкарии рода *Diplostomum* фауны СССР. — Паразитология, 1976, вып. 4, с. 346—351.

47. Шульман С. С. Микроспоридии фауны СССР. — М.; Л.: Наука, 1966. — 507 с.

48. Шульц Р. С., Гвоздев Е. В. Основы общей гельминтологии. — М.: Наука, 1970, т. I. — 492 с.

49. Щербина А. К. Болезни рыб—2-е изд. перераб. и доп.— Киев: Урожай, 1973. — 403 с.

50. Эпизоотология/под. ред. Р. Ф. Сосова. — М.: Колос, 1974. — 356 с.
51. Юхименко Л. Н. Экспресс-метод выделения аэромонад, псевдомонад и вибрионов. В сб. «Экспресс-информация». Рыбохозяйственное использование внутренних водоемов. М., 1980, № 10, с. 10—14.
52. Fish Health Blue Book. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. Ed. D. McDaniel, 1975, copyright 1979 by American Fisheries Society.— 118 p.
53. Hill B. J. Procedures for the isolation and identification of IPN, VHS, IHN and SVC viruses from diseased fish. Fisheries Research Technical Report, No 27, MAFF, 1976. — 14 p.
54. Ruf M., Reichenbach-Klinke H. H. Untersuchungen über die akute Form der infektiösen Bauchwassersucht bei Cypriniden (*Cyprinus carpio*, *Ctenopharyngodon idella*). München, 1979, — 112 S.
55. Schäperclaus W. Fisch-krankheiten. Akademie-Verlag. Berlin, 1979, T. I—II, 1090 s.
56. Wolf K. Guidelines for virological examination of fishes. Symposium on diseases of fishes and shellfishes, Amer. Fish. Soc. Special Publ. 1970, No 5.— 526 p.
57. Wolf K., Quimby M. C. Fish cell and tissue culture. In: Fish Physiology. Ed. by W. Hoar and D. J. Randall. Academic Press New York, 1969, vol III, p. 253—305.
58. Wolf K., Quimby M. C. Procedures for subculturing fish cells and propagating fish cell lines. TCA Manual, 1976, v. 2, No 4, p. 471—474.

## ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Агранулоциты 39  
Алиментарные болезни 254  
Амебидный зародыш 201, 202  
Амбифрии 208, 210  
Анамнез 21  
Анастомозы 175, 177  
Анемия 29  
Аппарат Панченкова 37  
Апизома-208, 210  
Антенны 245  
Антеридий 176, 179, 180, 181  
Антибиотики 124  
Антиген 148—150  
Антитела 43, 45, 46, 149  
Аэромонады 105, 107, 109  
Базофилы 79  
Бактериальная геморрагическая септицемия 96, 105  
Биопроба 125, 172  
Бляшки 146  
— бляшкообразующая единица 146  
Ботридии 227  
Бранхиомикоз 174  
Вакуоли 193, 206, 208, 210  
Вакуолизация 40  
Вертеж лососевых 194  
Вибриоз 96, 116  
Вирионы 159, 160, 171  
— капсид 159, 171  
— капсомеры 159, 160  
— морфология 158  
— нуклеиновая кислота 159, 171  
— тип симметрии 159  
Вирулентность 126  
Вирус 131, 142  
— выделение на культурах клеток 142—145  
— идентификация 148, 153, 156  
— метод флюоресцирующих антител 153  
— реакция нейтрализации 148  
— размножение 143, 144  
— титр 145  
— тропизм 141  
— цитопатогенное действие 143, 145, 147, 148, 151  
— чувствительность 156  
— к кислоте с pH 3,0 158  
— нагреванию 158  
— хлороформу 157  
— эфиру 157  
Газопузырьковая болезнь 254, 257  
Гвоздичник 227, 228, 229  
Гексамита 194, 195, 196  
Гельминтозы 186, 187, 213, 214  
Гематокрит 33  
Гемоглобин 33  
Гемогрегарины 199, 200  
Гемометр Сали 34  
Гемофилез 94, 105, 123  
Геннегвия 202, 203, 204  
Гепатома 254, 255  
Гиперсегментация ядра 39  
Гиродактилюсы 221, 223, 224  
Гифа 175, 186  
Глохидий 252  
Гранулоциты 38  
Грибница 175  
Дактилогирусы 221, 223  
Дегенерация 144  
— специфическая 144  
— неспецифическая 144  
Дезинфекция 78  
Деконтаминация 141, 142  
Диспергирование 137

- диспергирующий раствор 137, 139
- Жгутиковые** 194, 195
- Зооспоры** 179, 180
- Зооспорангий** 176, 179, 180
- Зигоспора** 179, 180, 184
- Инвазионные болезни** 186, 187
- Индекс нейтрализации** 151
- Инкубационный период** 173, 174
- Инокулюм** 184, 186
- Интеркапсулярный отросток** 201, 205
- Инфекционная единица** 145  
— доза 145
- Иммунитет** 43, 44
- Импрегнация** 211
- Ихтиободо** 194, 196
- Ихтиофтириус** 208, 210, 211
- Камера Горяева** 35
- Кариолиз** 39
- Карпорексис** 40
- Кишечнополостные** 187, 250, 251
- Кокцидии** 199
- Колочеголовые** 187, 235, 236
- Компрессионный способ** 189
- Конидии** 179, 181, 184
- Коремия** 179, 181, 182
- Коринебактериоз** 94, 105
- Криптобии** 196, 198
- Крустацеозы** 187, 243, 244
- Культура клеток** 131  
— первично-трипсинизированная 131, 132, 136  
— перевиваемая 137—140
- Лаборатория ихтиопатологии** 5, 6, 7, 8, 9  
— структура 5, 6, 7  
— материально-техническое обеспечение 5, 6, 7, 8, 9  
— общие правила работы 6, 7, 74
- Лейкоциты** 38
- Лейкоцитарная формула** 40
- Лейкоцитарный профиль** 41
- Лимфоциты** 39
- Мерозоиты** 199
- Метацеркарий** 216, 217
- Метод флюоресцирующих антител (МФА)** 153
- Микоз плавательного пузыря** 183
- Микроспоридии** 194, 205
- Миксобактериоз** 96, 105, 118
- Миксосома** 202, 203, 204
- Микоспоридии** 201
- Мицелий** 175, 184, 186  
— септированный 175, 181  
— несептированный 175, 180, 181
- Моногенен** 187, 220, 221, 222
- Монослой** 136, 137, 139, 143
- Моноциты** 39
- Негативное контрастирование** 161, 162, 171
- Нейтрофилы** 39
- Нематоды** 231, 232
- Обездвиживание** 25, 26
- Оидии** 178, 182
- Окраска бактерий** 85, 86
- Окраска жгутиков бактерий** 87, 88
- Окраска капсул** 86
- Огоний** 176, 179, 180, 181
- Оспора** 179, 180
- Оптический стандарт мутности** 128
- Патологический материал** 99, 140—142, 172, 174
- Пигментные глазки** 222, 223
- Пикнида** 179, 180, 181, 182
- Пикноз** 40
- Питательные среды** 80, 104, 106
- Пиявки** 187, 240, 241
- Глериоцеркоид** 228
- Полярные капсулы** 201, 202, 203
- Прикрепительный диск** 221
- Присоски** 215, 221, 227
- Присосковидные органы** 245
- Промежуточный хозяин** 214, 216, 227, 233, 236
- Протозойные болезни** 193
- Псевдобазофилы** 39
- Псевдомонозы** 110
- Псевдозооинофилы** 39
- Ракообразные** 243, 244  
— веслоногие 244, 245  
— жаброхвостые 244, 245  
— равноногие 246
- Ризонды** 176, 177, 182

- Сапролегниоз 174, 180, 182  
Серологические методы 44  
— реакции 44, 46  
— — агглютинации бактерий 51  
— — преципитации 58  
— — гемагглютинации 63  
Склеротий 176, 178, 182  
Сколлекс 227  
Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) 36  
Скребни 235  
Спикулы 231  
Спорангии 177, 178, 180, 182  
Спорангиоспоры 178, 179, 181, 182  
Споры экзогенные 179, 182  
— эндогенные 179, 182  
Стерилизация 14, 78, 79  
Столон 250  
Стрекательная нить 201, 206, 207  
Стробила 227  
Сыворотка крови  
— — получение 47  
— — хранение и транспортировка 48  
— — обработка для проведения реакций 47  
— — разведение при постановке реакций 47  
— — получение иммунной сыворотки 54  
Таллом 175  
Тканевая цитопатическая доза 146, 147, 148  
Трематоды 186, 187, 215  
Трипсинизация 134  
Триходина 208, 209, 210, 213  
Трихофрия 208, 210  
Ультратонкие срезы 161, 168  
Фагоцитоз 43, 70  
Фильтрация 134, 142  
Фиксация 19, 161, 163, 198  
Флюоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ) 154  
Флюоресценция 154  
— специфическая 154  
— неспецифическая 154  
Флуорохромы 153  
Фурункулез 94, 105, 107  
Хилодонеллы 208, 209, 210, 213  
Хламидоспоры 176, 178, 181, 182  
Хлоромиксум 202, 204  
Хоботок 236, 237, 238  
Хроматинолиз 39  
Цементные железы 236  
Церкарий 216  
Цероидная дегенерация печени 255, 257  
Цестоды 186, 187, 226, 227  
Цитолиз 40  
Цитохромоксидаза 95, 103, 104  
Шизонт 199  
Эдвардсиеллез 105, 121, 122  
Электронная микроскопия 158, 160  
— — просвечивающая 160  
— — сканирующая 160  
Эозинофилы 39  
Эпистилис 209, 210  
Эритроциты 28, 31, 36, 65, 66, 67, 68  
— получение 65, 66  
— приготовление взвесей 67  
— обработка антигеном 68

## ОГЛАВЛЕНИЕ

От авторов . . . . .	3
<b>ГЛАВА I. Общие методы ихтиопатологических исследований . . . . .</b>	<b>5</b>
Лаборатория ихтиопатологии, ее структура и материально-техническое обеспечение . . . . .	<b>5</b>
Занятие 1. Структура и материально-техническое обеспечение лаборатории ихтиопатологии, общие правила работы в лаборатории . . . . .	6
Занятие 2. Лабораторное оборудование, применяемое в ихтиопатологических исследованиях . . . . .	10
Методы эпизоотологического, клинического и патологоанатомического исследований . . . . .	20
Занятие 3. Эпизоотологическое обследование хозяйства . . . . .	20
Занятие 4. Контроль за эпизоотическим состоянием рыбоводных хозяйств и статистическая отчетность . . . . .	22
Занятие 5. Проведение клинического и патологоанатомического обследования рыб . . . . .	24
Методы гематологических исследований . . . . .	28
Занятие 6. Изучение гематологических показателей у рыб и их диагностическое значение . . . . .	28
Занятие 7. Изучение морфологии лейкоцитов и их диагностическое значение . . . . .	37
Методы изучения иммунитета . . . . .	43
Занятие 8. Серологические методы исследований . . . . .	44
Занятие 9. Реакция агглютинации бактерий . . . . .	51
Занятие 10. Реакция преципитации . . . . .	58
Занятие 11. Реакция иммунной гемагглютинации . . . . .	63
Занятие 12. Фагоцитарная реакция . . . . .	70
<b>ГЛАВА II. Методы изучения инфекционных болезней рыб . . . . .</b>	<b>72</b>
Методы изучения бактериальных болезней рыб . . . . .	73
Занятие 13. Бактериологическая лаборатория . . . . .	73
Занятие 14. Методы бактериологических исследований . . . . .	82
Занятие 15. Изучение возбудителей бактериальных болезней рыб . . . . .	93
Занятие 16. Взятие и транспортировка патологического материала . . . . .	98
Занятие 17. Схема диагностики бактериальных заболеваний . . . . .	103
Занятие 18. Фурункулез и другие аэромоназы . . . . .	107
Занятие 19. Псевдомонозы . . . . .	110
Занятие 20. Вибриоз . . . . .	116
Занятие 21. Миксобактериозы . . . . .	118
Занятие 22. Эдвардселлез, гемофилез . . . . .	121
Занятие 23. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам . . . . .	123
Занятие 24. Определение патогенных свойств бактерий (биологическая проба) . . . . .	125
Методы изучения вирусных болезней рыб . . . . .	131
Занятие 25. Первичнотрипсинизированная культура клеток . . . . .	131

Занятие 26. Перевиваемые культуры клеток . . . . .	137
Занятие 27. Взятие и обработка патологического материала . . . . .	140
Занятие 28. Выделение вируса на культурах клеток . . . . .	142
Занятие 29. Титрование вируса . . . . .	145
Занятие 30. Реакция нейтрализации на культуре клеток . . . . .	148
Занятие 31. Метод флюоресцирующих антител . . . . .	153
Занятие 32. Физико-химические свойства вируса . . . . .	156
Занятие 33. Применение электронной микроскопии для изучения анатомии и морфологии вирусов . . . . .	158
Занятие 34. Биологическая проба (биопроба) . . . . .	172
<b>Методы изучения микозов рыб . . . . .</b>	<b>174</b>
Занятие 35. Основные понятия в микологии . . . . .	175
Занятие 36. Микологические исследования при диагностике болезней рыб . . . . .	182
<b>ГЛАВА III. Методы изучения возбудителей инвазионных болезней рыб . . . . .</b>	<b>186</b>
<b>Методика полного паразитологического анализа рыб . . . . .</b>	<b>187</b>
Занятие 37. Паразитологическое вскрытие рыб . . . . .	187
<b>Методы изучения возбудителей протозойных болезней рыб . . . . .</b>	<b>193</b>
Занятие 38. Жгутиконосцы, паразитирующие у рыб . . . . .	194
Занятие 39. Кокцидии и гемогregarиины, паразитирующие у рыб . . . . .	199
Занятие 40. Микроспоридии, паразитирующие у рыб . . . . .	201
Занятие 41. Микроспоридии, паразитирующие у рыб . . . . .	205
Занятие 42. Инфузории, паразитирующие у рыб . . . . .	208
<b>Методы изучения возбудителей гельминтозов рыб . . . . .</b>	<b>213</b>
Занятие 43. Трематоды рыб . . . . .	215
Занятие 44. Моногенеи рыб . . . . .	220
Занятие 45. Цестоды рыб . . . . .	226
Занятие 46. Нематоды, или круглые черви, рыб . . . . .	231
Занятие 47. Скребни рыб . . . . .	236
Занятие 48. Пиявки рыб . . . . .	240
<b>Методы изучения возбудителей болезней, вызываемых другими группами животных . . . . .</b>	<b>243</b>
Занятие 49. Ракообразные паразиты рыб . . . . .	244
Занятие 50. Кишечнополостные, паразитирующие у рыб . . . . .	250
Занятие 51. Моллюски, паразитирующие у рыб . . . . .	251
<b>ГЛАВА IV. Методы изучения незаразных болезней рыб . . . . .</b>	<b>253</b>
Занятие 52. Незаразные болезни рыб . . . . .	254
Приложения . . . . .	259
Приложение 1. Ветеринарное свидетельство (форма № 1) . . . . .	259
Приложение 2а. Журнал эпизоотического состояния и учета лечебно-профилактических мероприятий . . . . .	260
Приложение 2б. Ихтиопатологический журнал рыбоводного хозяйства . . . . .	261
Приложение 2в. Статистическая отчетность форма № 3-вет . . . . .	267
Приложение 2г. Статистическая отчетность (форма № 3-рх) . . . . .	268
Приложение 3. Численные выражения и размерности лабораторных тестов в новой (Международной) и старой системах единиц . . . . .	270
Приложение 4. Обработка предметных стекол для мазков крови . . . . .	271
Приложение 5. Приготовление растворов для окраски мазков крови по Паппенгейму . . . . .	271
Приложение 6. Нейтрализация дистиллированной воды буферными смесями . . . . .	271
Приложение 7. Приготовление забуференного изотонического раствора хлористого натрия . . . . .	271
Приложение 8. Протоколы учета серологических реакций. Протокол учета ОРАБ . . . . .	273
Приложение 9. Приготовление раствора Олсвера . . . . .	274

Приложение 10. Рецепты красителей и реактивов для бактериологических исследований . . . . .	274
Приложение 11. Индикаторы . . . . .	276
Приложение 12. Рецепты основных питательных сред . . . . .	277
Приложение 13. Связь центробежного ускорения с параметрами ротора центрифуги . . . . .	282
Приложение 14. Приготовление буферных растворов для определения чувствительности вируса к кислоте с рН 3,0 . . . . .	282
Приложение 15. Рецепты приготовления реактивов для заливки образцов в эпоксидные смолы . . . . .	283
Приложение 16. Рецепты фиксаторов и красителей, наиболее часто употребляемых в ихтиопаразитологии . . . . .	284
Приложение 17. Методика приготовления растворов формалина . . . . .	286
Список рекомендуемой литературы . . . . .	287
Предметный указатель . . . . .	290

Вера Александровна Мусселиус,  
Василий Федорович Ванятинский,  
Арнольд Анатольевич Вихман,  
Нина Александровна Головина,  
Павел Петрович Головин,

Александр Михайлович Марченко,  
Татьяна Ивановна Щелкунова,  
Игорь Степанович Щелкунов,  
Людмила Николаевна Юхименко

## Лабораторный практикум по болезням рыб

Редактор С. Н. Шестак  
Художественный редактор В. В. Зеркаленкова  
Технический редактор Т. С. Пронченкова  
Корректоры Т. А. Лашкина, Г. А. Казакова

ИБ № 1443

Сдано в набор 17.05.82. Подписано в печать 30.11.82. Т-22007. Формат 60×90<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага типографская 1. Литературная гарнитура. Высокая печать. Объем 18,5+0,5 вкл.=19,0. Усл. п. л. 18,5+0,5 вкл.=19,0. Усл. кр.-отт. 18,5+0,5 вкл.=19,0. Уч.-изд. л. 20,76+0,42 вкл.=21,18. Тираж 4700 экз. Заказ 1182. Цена 1 р. 10 к.

Издательство «Легкая и пищевая промышленность», 113035, Москва, М-35, 1-й Кадашевский пер., д. 12.

Ярославский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 150014, Ярославль, ул. Свободы, 97.