

ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ

04.10.99г. №13-4-2/1751

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по определению возбудителей гельминтозоонозов в пресноводных рыбах

1. Общие положения

1.1. Гельминтозоонозы - группа паразитарных болезней, возбудители которых в личиночной стадии обнаруживаются у различных видов рыб, а в половозрелой - у человека и животных.

1.2. Возбудители гельминтозоонозов проходят сложный цикл развития с участием промежуточных (моллюски, циклопы, диаптомусы и олигохеты), дополнительных (пресноводные рыбы) и окончательных (человек, кошка, собака, дикий кабан, волк, лисица, выдра и др.) хозяев.

1.3. Личиночные стадии возбудителей гельминтозоонозов по отношению к дополнительным хозяевам имеют определенную приуроченность и характерные места локализации (приложение 1).

2. Исследование рыб

2.1. Для исследования отбирают 10-15 экземпляров живых или свежееуснувших рыб обследуемого вида, регистрируют с указанием даты исследования, вида рыб и места вылова.

2.2. Рыб взвешивают, измеряют длину от вершины рыла до начала лучей хвостового плавника. Осматривают плавники, чешую, жабры. Участки с изменениями просматривают под лупой и микроскопом (увеличение 2x8). Ножницами разрезают брюшко по средней линии от анального отверстия до области сердца. С помощью лупы просматривают сердце, гонады, печень, селезенку, почки, стенки желудка, кишечник, серозные покровы. Каждый орган отдельно помещают в чашки Петри или на часовые стекла. Из органов и тканей нарезают полоски длиной до 10 мм и толщиной 3-4 мм, помещают в компрессориум или между стеклами 9x12 см и микроскопируют. Мышцы осматривают, разрезая на продольные и поперечные полоски, и исследуют под микроскопом.

2.3. В мускулатуре рыб встречаются метацеркарии трематод, патогенные и непатогенные для человека и животных. Последних в половозрелой стадии обнаруживают в кишечнике

рыбоядных птиц (чайки, цапли) и хищных рыб (щука). Для дифференциации этих личинок гельминтов у рыб пользуются таблицей (приложение 2).

2.4. Для патогенных человеку и животным метацеркарии трематод из сем. *Opisthorchidae* (описторхисы, меторхисы, псевдамфистомы, клонорхисы) при осмотре под микроскопом характерно наличие двух круглых одинакового размера присосок, которые окрашены светлее тела личинки и черного экскреторного пузыря овальной или грушевидной формы, занимающего 1/3-1/4 тела личинки (рис. 1-2). Для живых личинок характерно активное движение в цисте.

2.5. Из непатогенных для человека и животных метацеркарии трематод близкое строение к описторхидам имеют личинки из рода буцефал и рипидокотил, для которых характерно наличие одной крупной ротовой присоски чашеобразной формы с пальцеобразными выступами, экскреторного пузыря зигзагообразной формы, занимающего 2/3 тела личинки (рис. 3) и слабой подвижности живых личинок в цисте.

2.6. Для метацеркарии параценогонимусов характерна большая черная экскреторная система с 3 белыми щелевидными пространствами (рис. 4). Другие личинки, встречающиеся у рыб, определяют, пользуясь табл. 2.

### 3. Определение жизнеспособности личинок

3.1. Извлеченных из органов и тканей рыбы (из цисты) плероцеркоидов помещают в подогретый (до 40°C) физиологический раствор или в искусственный желудочный сок (100 мл 0,5%-ного раствора поваренной соли, 0,5 г пепсина, 0,75 мл 35%-ного раствора соляной кислоты). Под лупой осторожно раздражают личинку препаровальной иглой. Наличие даже слабых движений указывает на жизнеспособность плероцеркоида.

3.2. Личинки из органов рыб освобождают от остатков ткани под контролем лупы. На препарат наносят 2 капли 3%-ного раствора розоловой кислоты на 70%-ном спирте на 2 минуты, добавляют каплю 0,1%-ного раствора едкого калия, оставляют на 2 минуты. Излишек краски смывают физиологическим раствором, препарат высушивают полоской фильтровальной бумаги, накрывают покровным стеклом и просматривают под микроскопом. Мышечная ткань и мертвые личинки окрашиваются в розовый цвет, живые личинки не окрашиваются.

3.3. Жизнеспособность личинок трематод можно определять, используя микроскоп с

подогревательным столиком. Выделенных паразитов переносят на столик (при 36-37°C), добавляют 2-3 капли желчи или 0,5%-ного раствора трипсина. Живые личинки через 5-10 минут выходят из цист.

3.4. Цисту, извлеченную из ткани рыб, под микроскопом в капле физиологического раствора препаровальными иглами освобождают от наружной оболочки. При легком надавливании иглой на покровное стекло, под которое помещают препарат, внутренняя оболочка разрывается. Наличие движений у личинки указывает на ее жизнеспособность.

#### 4. Определение видовой принадлежности личинок

4.1. В сомнительных случаях, если не удается сразу установить вид метацеркарий трематод, обнаруженных в пробе, рекомендуется произвести освобождение личинок от оболочек механически (п. 3.4.) или химическим способом (п. 3.2. и п. 3.3.).

4.2. Измельченные кусочки поверхностного слоя спинных мышц (0,3 x 0,5 см) в количестве 10-15 г помещают в искусственный желудочный сок в соотношении 1:10. Выдерживают в термостате при 37-40°C 2-3 часа, процеживают через марлю. Осадок переносят в чашку Петри, цисты вылавливают пипеткой при проходящем свете под лупой или под микроскопом, или, добавив физиологический раствор, круговыми движениями чашки отмывают, при этом цисты концентрируются в центре чашки. Раствор с края осторожно удаляют резиновой грушей. Промывку повторяют до полного удаления остатков непереваренной мышечной ткани. Для освобождения от внутренней оболочки цисты помещают в теплый (22-24°C) раствор трипсина и поваренной соли (на 100 мл 1%-ного раствора поваренной соли берут 1 г трипсина).

4.3. Личинки гельминтов, освобожденные от оболочек, имеют характерные признаки, по которым их можно отнести к определенному виду. Определяют видовую принадлежность личинок, используя приложение 2.

4.4. Видовую принадлежность личинок гельминтов определяют также, используя биологическую пробу. Для этого подопытным животным (предпочтительно - котяткам, в крайнем случае - щенкам, морским свинкам, хомякам) скармливают мясо рыб с личинками гельминтов или мелкую инвазированную рыбу. Определение вида паразита проводят через 3-4 недели после начала опыта по обнаруженным в фекалиях животных яйцам или по половозрелым гельминтам в печени,

желчном пузыре, кишечнике (в зависимости от вида гельминта) при вскрытии подопытных животных.

#### 5. Меры профилактики

5.1. При работе с патологическим материалом необходимо соблюдать меры личной профилактики.

По окончании исследования следует тщательно мыть руки с мылом и щеткой, а место работы

обрабатывают 2%-ным раствором кальцинированной соды.

5.2. Выловленная из водоема рыба, где обнаружены возбудители гельминтозоозов, считается условно годной и подлежит переработке в соответствии с Инструкцией по санитарно-гельминтологической оценке рыбы, зараженной личинками дифиллоботриид (возбудителями дифиллоботриозов) и личинками описторхисов (возбудителями описторхоза) и ее технологической обработке.

С утверждением настоящих Методических указаний утрачивает силу «Методика определения возбудителей гельминтозоозов в пресноводных рыбах», утв. ГУВ МСХ СССР 21.03.83 г., № 115-6а .

#### Приложение № 1

к Методическим указаниям по определению возбудителей гельминтозоозов в пресноводных рыбах, утв. \_\_\_\_\_ 1999 г.

Поражаемые виды рыб и места локализации личинок - возбудителей гельминтозоозов

	Поражаемые виды рыб	
<b>Opisthorchis felineus, Metorchis albidus, Pseudamphistomum truncatum</b>	В наибольшей степени язь, елец, линь, меньше - плотва, усач, лещ, густера, жерех, пескарь, сазан, красноперка, уклея, сырть, подуст, голянь, вобла, овсянка и др.	Поверхностно, 2-3,4 см (в плавниках), обнаруживаются в жабрах, сте...
<b>Clonorchis sinensis</b>	Сазан, черный и белый амур, толстолобик, верхогляд, карась, окуневые, бычковые и др.	Тоже
<b>Metagonimus yokogawai</b>	Преимущественно карповые	Плавники, ...
<b>Diphyllobotrium latum</b>	Щука, окунь, ерш, налим	Икра, молоки, мышцы (бе...
<b>D.dendriticum</b>	Хариус, омуль, сиг, корюшка, окунь, ряпушка, голец, муксун, форель	Мышечная ткань, серозные п...

<b>Nanophyetes schikchobalowi</b>	Ленок, таймень, амурский сиг, кета, горбуша, амурский хариус	Мышцы пл мышцы тел
<b>Rossicotrema donicum</b>	Окунь, ерш, судак	Плавники,
<b>Echinochasmus perfoliatus</b>	Щука, линь, сазан, лещ, язь, густера, вобла, красноперка, плотва, тарань, жерех, белоглазка, синец, карась, уклея, окунь, судак, ерш, вьюн, сом, карп	Жаберные
<b>Dioctophyme renale</b>	Язь, плотва, щука, шемая, лопатонос, усач, сом	Стенки киш (в виде цис

Приложение № 2  
к Методическим указаниям по определению  
возбудителей гельминтозоонозов в пресноводных  
рыбах,  
Дифференциальная таблица личинок гельминтов, обнаруживаемых у  
пресноводных рыб

Вид паразита	Размер (мм), форма цист личинок	Оболочки цист, цвет, расположение	Форма, размер экскреторного пузыря	Количество, форма и величина присосок (РП-ротовая, БП-брюшная присоси) (размер в мм)	П
1	2	3	4	5	
<b>Метацеркарии трематод, патогенных для теплокровных</b>					
<b>Opbsthorchis ilineus</b>	0,28-0,38x0,18-0,28 овальная, реже круглая	Наружная равномерно прилегает к внутренней	Черный, округлый, почковидный, занимает не более 1/3 тела личинки	Присоски круглые, РП - 0,088; БП - 0,077	Д э
<b>Pseudamphistomum truncatum</b>	0,21-0,38x0,14-0,24	Тоже	Тоже	Круглые, одинакового размера	Д з

<b>Metorchis albidus</b>	<b>0,32-0,46, 0,26-0,40 без капсулы -0,30-0,44х круглые 0,24-0,38</b>	<b>Тонкие, рядом, без утолщений</b>	<b>Черный округлый, овальный; занимает 1/3 тела личинки</b>	<b>РП и БП одинакового размера 0,08x0,01</b>	<b>Т</b>
<b>Clonorchis sinensis</b>	<b>0,150-0,180 х 0,150-0,165, круглая, овальная</b>	<b>Равномерно прилегают друг к другу</b>	<b>Черный грушевидный, занимает 1/4 тела; гранулы 10 мкм плотно расположены</b>	<b>РП - 0,54-0,56 х 0,51-0,60, БП -0,66-0,75 х 0,63-0,72</b>	<b>С Д</b>