

22.09.98г. №13-4-2/1404

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по определению возбудителей
диплостомозов пресноводных рыб**

1. Общие положения

1.1. В фауне России и сопредельных государств выявлено 17 видов рода метацеркарий трематод рода *diplostomum* (отряд *strigeidida*, семейство *diplostomidae*), каждый из которых вызывает самостоятельную форму заболеваний. Для их обозначения к названию «диплостомоз» добавляется соответствующая данному виду возбудителя литера латинского алфавита (Приложение 1).

1.2. Видовая принадлежность возбудителей и вызываемых ими форм диплостомозов определяется по инвазионным метацеркариям и при строгом соблюдении описанной ниже методики сбора и фиксации, приготовления постоянных препаратов и морфометрического анализа, а также с учетом гостальной специфичности (приуроченности к определенной более или менее узкой группе хозяев) метацеркарий, а также их строгой приуроченности к обитанию в определенных органах рыбы (глаза, головной мозг) или отдельных составных частей глаза (хрусталик, стекловидное тело, внутренние оболочки и жидкие среды глаза).

2. Исследование рыб

2.1. Для исследования берут 10-15 экземпляров свежееуснувших рыб обследуемого вида и составляют протокол их исследования, в котором регистрируется дата исследования, вид рыбы и место ее вылова.

2.2. Каждую рыбу взвешивают, измеряют длину от вершины рыла до основания лучей хвостового плавника, проводят визуальный осмотр рыбы с обращением особого внимания на наличие патологических изменений глаз (изменение формы и размеров зрачка, патология глазного яблока), а также точечных кровоизлияний на жаберных крышках и в основании плавников. Выявленные патологии описывают и заносят в протокол обследования рыб.

2.3. На наличие метацеркарий рода *diplostomum* обследуют глаза и головной мозг рыб и круглоротых.

2.4. Глаза извлекают из орбит и вскрывают с помощью ножниц или препаровальных игл на часовом стекле или чашке Петри в тонком слое воды. Хрусталики

и стекловидное тело глаза переносят на отдельные часовые стекла с речной водой, а с внутренних стенок глазного яблока делают соскоб пинцетом.

2.4.1. Хрусталики и стекловидное тело сразу же (пока они не потеряли своей прозрачности) просматривают под биноклем, а при наличии в них паразитов разрезают препаровальными иглами на мелкие части и на 0,5 - 1,0 час оставляют в воде. За это время находящиеся в тканях этих органов метацеркарии сами выйдут в воду и могут быть собраны тонко оттянутой пипеткой. Молодые, еще неинвазионные метацеркарии при этом успевают погибнуть, а инвазионные сохранятся в живом виде.

2.4.2. Соскоб с внутренних стенок глаза обследуют компрессорно под биноклем. Обнаруженных метацеркарий аккуратно извлекают из содержимого глазного яблока, отмывают в пресной воде. Если метацеркарий в содержимом глазного яблока очень много (десятки и сотни), отмывку их удобнее производить в 0,2л стаканчике методом отмучивания и последовательных сливов.

2.5. Головной мозг извлекают пинцетом из черепной коробки через вскрытую крышу черепа, помещают на часовое стекло с водой и обследуют визуальным способом наличие кровоизлияний на сосудистой оболочке мозга и в мозговой ткани. Для выявления метацеркарий рода *diplostomum* головной мозг исследуют под биноклем компрессорным способом, либо - если метацеркарий очень много, - методом отмучивания и последовательных сливов.

2.6. Собранных метацеркарий подсчитывают (отдельно инвазионных и неинвазионных), отмывают водой, а перед фиксацией изучают прижизненно.

3. Изучение живых метацеркарий

3.1. По живым метацеркариям уточняют их принадлежность к роду *diplostomum* и выявляют некоторые специфические особенности их морфологии. Для этого собранных метацеркарий помещают на предметное стекло с лупкой и исследуют их под малым увеличением микроскопа, обращая основное внимание на форму, количество и характер расположения известковых телец в теле метацеркарий.

3.2. По форме и размерам известковых телец дифференцируют метацеркарий рода *diplostomum* от таковых рода *tylodelphys*: у первых известковые тельца имеют шаровидную форму и разные размеры, у вторых они овальные и практически одинаковые по размерам.

3.3. Количество и характер расположения известковых телец в теле метацеркарий рода *diplostomum* один из важных морфологических критериев вида метацеркарий (Рис. 1.). Отмечают, к каким из изображенных на указанном рисунке видам обнаруженные метацеркарий наиболее близки по числу

известковых телец и характеру их расположения. В глазах одной и той же особи рыбы могут одновременно паразитировать несколько видов рода *diplostomum*.

3.4. Отсутствие известковых телец в теле метацеркарий рода *diplostomum* свидетельствует о том, что эти метацеркарии либо еще молодые и не достигли инвазионной стадии развития (чаще встречаются у молодых рыб), либо уже старые, утратившие свою инвазионность (чаще обнаруживаются у рыб старше пяти лет).

4. Фиксация и окраска метацеркарий, приготовление постоянных препаратов

4.1. Фиксацию и окраску метацеркарий проводят уксуснокислым кармином путем добавления краски к живым метацеркариям в минимальном количестве воды. Делать это удобнее всего в биологической пробирке объемом не более 4-5 мл. Соотношение объема краски и воды в пробирке должно быть не менее 10:1. Все последующие манипуляции по подготовке метацеркарий для монтажа в постоянном препарате осуществляют в той же пробирке путем последовательной смены в ней реактивов тонко оттянутой пипеткой.

4.2. Через 15-20 минут краску слить и заменить на 5-10 минут таким же объемом 1% раствора соляной кислоты в 70° этиловом спирте (дифференцировка окраски).

4.3. Обезжизвение окрашенных метацеркарий производят спиртами возрастающей крепости (85° и двойная смена 96° этилового спирта), просветлению - диметилфталатом (диметиловый эфир фталевой кислоты). Диметилфталат вносят в пробирку специальной «диметилфталатовой» пипеткой, медленно выпуская его по стенке пробирки, непосредственно в спирт. Метацеркарии при этом оказываются на границе более легкого спирта и диметилфталата. Просветление считается законченным, когда метацеркарии опустятся на дно пробирки. После этого поверхностные слои спирта и смеси спирта с диметилфталатом удаляют и заменяют чистым диметилфталатом.

4.4. Монтаж препарата производят на предметном стекле. Для этого в центр предметного стекла помещают каплю диметилфталата с метацеркариями, излишки диметилфталата насколько возможно удаляют и наносят каплю жидкого бальзама, расправляют ее препаратной иглой, а метацеркарий равномерно (лучше рядами) размещают на стекле. Через 1-3 часа, когда препарат слегка подсохнет, на него наносят одну-две капли жидкого бальзама и накрывают покровным стеклом. Препарат этикетировывают и хранят в течение первого года (пока не высохнут) на лежащих лоточках.

4.5. Если нет возможности завершить процесс изготовления препарата сразу, то его можно прервать

на неограниченно долгое время на двух этапах: после дифференцировки окраски, поместив метацеркарий в пробирку с 70° спиртом, или оставить метацеркарий в пробирке с диметилфталатом.

4.6. Приготовление уксуснокислого кармина: в 100мл 45%-ной уксусной кислоты растворить (на водяной бане!) 3-4 г мелко растертого порошка кармина; остывший раствор отфильтровать и разбавить 45%-ной уксусной кислотой в соотношении 1:1. Хранить в плотно закрытой стеклянной посуде.

5. Определение родовой и видовой принадлежности возбудителей диплостомозов пресноводных рыб.

5.1. В отличие от большинства метацеркарий трематод, встречающихся в глазах и головном мозге рыб и круглоротых, метацеркарий рода *diplostomum* ведут активный (подвижный) образ жизни, никогда не образуя вокруг себя ни цист, ни капсул. В этом отношении они близки только к метацеркариям рода *tyiodelphys*, от которых, как уже отмечалось, четко отличаются формой и размерами известковых телец (см. п. 3.2.).

5.2. Для видовой диагностики возбудителей диплостомозов рыб используют помимо уже отмеченных выше биологических (гостальная специфичность и приуроченность к обитанию и строго определенных органах рыбы) и морфологических (число известковых телец) признаков целый ряд морфометрических критериев вида, а именно: длину (А в мкм), ширину (В в мкм) и произведение длины на ширину (А В) тела, роговой и брюшной присосок, органа Брандеса; расстояние от переднего конца тела до центра брюшной присоски (О в мкм); отношения АВ тела к А В органа Брандеса и к АВ брюшной присоски; АВ органа Брандеса и АВ ротовой присоски к А В брюшной присоски; выраженное в процентах отношение В и О к А тела (Рис. 2).

5.3. Определение видовой принадлежности метацеркарий проводят по определительной таблице (Приложение 2).

6. Меры безопасности и личной гигиены

6.1. Лица, проводящие исследования рыб на их зараженность возбудителями диплостомозов, сбор, фиксацию и окраску метацеркарий, а также приготовление реактивов и постоянных препаратов из метацеркарий, должны работать в халатах и соблюдать правила работы с ядовитыми (ледяная уксусная кислота) и огнеопасными (этиловый спирт, диметиловый эфир фталевой кислоты) веществами.

6.2. Приготовление (варка) уксуснокислого кармина должно производиться в вытяжном шкафу и только на водяной бане.

6.3. После окончания работы вымыть руки и лицо теплой водой с мылом, а место работы обработать 2%-ным раствором кальцинированной соды.

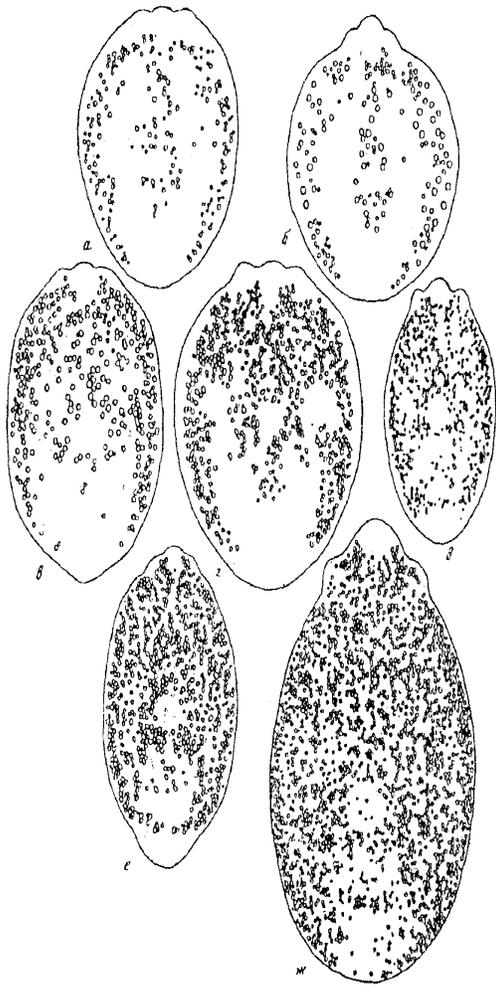


Рис. 1. Число и расположение известковых телец у метацеркарий некоторых видов рода *diplostomum*: а - *d. rutili*; б - *d. chromatophorum*; в - *d. helveticum*; г - *d.*

; д - *d. phoxini*; е - *d. mergi*; ж - *d. pungitii* (по Шигину, 1986)

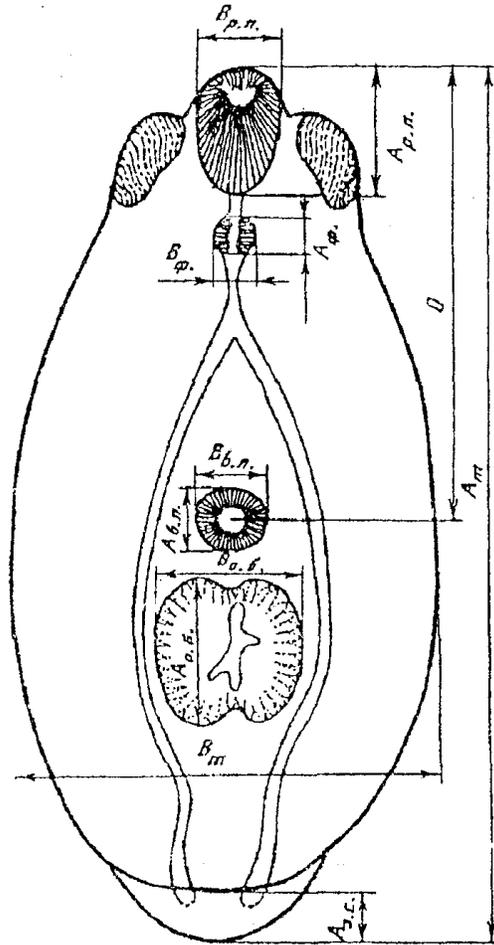


Рис. 2. Схема измерений метацеркрий рода *diplostomum*.
 Обозначения: ам - длина тела; Вт - ширина тела; Ап -
 длина ротовой присоски; Врп - ширина ротовой
 присоски; Абп -длина брюшной присоски; Вбп - ширина
 брюшной присоски; Аоб -длина органа Брандеса; Воб -
 ширина органа Брандеса; Аф - длина фаринкса; Вф -
 ширина фаринкса; аз.с. - длина заднего сегмента; 0 -
 расстояние от переднего конца тела до центра брюшной
 присоски (по Шигину,1986).