УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

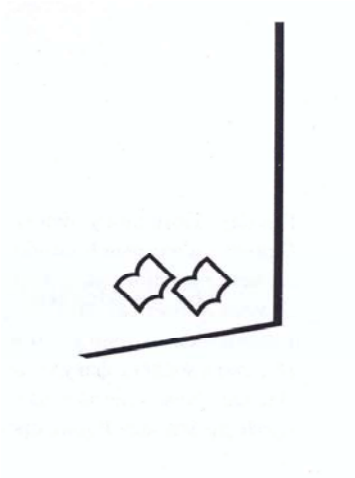
БОЛЕСТИ РИБА И АКВАТИЧНИХ ОРГАНИЗАМА ПРАКТИКУМ

Проф. др Николина Новаков

БОЛЕСТИ РИБА И АКВАТИЧНИХ ОРГАНИЗАМА — ПРАКТИКУМ

Проф. др Николина Новаков

2



БОЛЕСТИ РИБА И АКВАТИЧНИХ ОРГАНИЗАМА - ПРАКТИКУМ

Проф. др Николина Новаков



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

НОВИ САД, 2022

ЕДИЦИЈА ПОМОЋНИ УЏБЕНИК

Оснивач и издавач едиције

Пољопривредни факултет, Нови Сад,
Трг Доситеја Обрадовића 8, 2100 Нови Сад

Година оснивања
1954

Главни и одговорни уредник едиције

Др Недељко Тица, редовни професор
Декан пољопривредног факултета

Чланови комисије за издавачку делатност

Др Бранислав Влаховић, *редовни професор - председник*
Др Ивана Давидов, *ванредни професор - члан*
Др Дејан Беуковић, *доцент - члан*
Др Ксенија Мачкић, *доцент - члан*

CIP - Каталогизација у публикацији
Библиотека Матице српске, Нови Сад

НОВАКОВ, Николина, **1982-**
Болести риба и акватичних организама - Практикум / Николина Новаков. - Нови Сад : Пољопривредни факултет, 2022 (Нови Сад :). - 115 стр. : илустр. ; 30 cm. - (Едиција Помоћни уџбеник)

Тираж 20. - Библиографија.

ISBN 978-86-7520-554-8

а) Интензивна производња у аквакултури - Практикум
COBISS.SR-ID

Аутор:
Др Николина Новаков, ванредни професор
Пољопривредни факултет Нови Сад

БОЛЕСТИ РИБА И АКВАТИЧНИХ ОРГАНИЗАМА - ПРАКТИКУМ

Главни и одговорни уредник:
Проф. др Недељко Тица, Декан Пољопривредног факултета

Уредник:
Проф. др Николина Новаков

Технички уредник:
Проф. др Николина Новаков

Рецензенти:
Проф. др Нада Плавша, Болести животиња и хигијена анималних производа, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду
Проф. др Ивана Давидов, Патологија, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду

Издавач:
Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет Нови Сад
Забрањено прештампавање и фотокопирање. Сва права задржава издавач.

Штампа:
Штампарија

Штампање одобрио:
Комисија за издавачку делатност, Пољопривредни факултет, Нови Сад.

Тираж:
20

Одлуком наставно-научног већа Пољопривредног факултета у Новом Саду рукопис је одобрен за издавање као помоћни уџбеник.

ПРЕДГОВОР

Помоћни уџбеник **„Болести риба и акватичних организама - Практикум“** намењен је студентима Департмана за ветеринарску медицину Пољопривредног факултета Универзитета у Новом Саду, ради потреба савладавања практичне наставе у оквиру предмета Болести риба и акватичних организама. Планом и програмом предмета, као и садржајем овог практикума предвиђено је да студенти стекну знања из дијагностике болести риба различите етиологије, профилаксе и терапије.

Практикум је написан уз коришћење искуства и великог броја резултата из сопственог рада и истраживања, а које је аутор стицала током дугогодишњег рада у овој области. Приликом писања коришћени су и доступни литературни подаци из наше земље и света.

Практикум је писан на једноставан, лак и разумљив начин са циљем да се ова проблематика приближи потребама студената како би што боље и успешније савладали испит и припремили се за стручни и практични рад.

Поред ове основне намене, аутор сматра да ће практикум користити и студентима других академских усмерења на основним студијама, али и ветеринарима и практичарима из других области који се баве гајењем дијагностико, болести риба и акватичних организама.

Овом приликом захваљујем се свима онима који су својим саветима и сугестијама допринели квалитету уџбеника а посебно се захваљујем рецензентима проф. др Нади Плавши и проф. др Ивани Давидов на несебичној и свесрдној помоћи.

Молим све добронамерне кориснике ове књиге да својим примедбама и сугестијама допринесу да следећа издања буду још квалитетнија.

У Новом Саду,
22.02. 2022. године

Аутор

САДРЖАЈ

1.0. АНАТОМИЈА РИБА 1

1.1. Спољашна анатомија 1

1.2. Анатомија унутрашњих органа 3

1.3. Радни задатак - дисекција риба 5

2.0. ФИЗИЧКИ И ХЕМИЈСКИ АСПЕКТИ КВАЛИТЕТА ВОДЕ 7

2.1. Физички параметри 7

2.2. Хемијски параметри 9

2.3. Мониторинг физичко хемијских параметара воде 13

2.4. Радни задатак – физичко хемијски параметри воде 15

3.0. УЗОРКОВАЊЕ И ТРАНСПОРТ РИБА У СВРХУ ДИЈАГНОСТИКЕ БОЛЕСТИ 17

3.1. Транспорт живе рибе 17

3.2. Транспорт рибе на леду 19

3.3. Транспорт смрзнуте рибе 20

3.4. Транспорт рибе фиксиране у формалину/алкохолу 20

3.5. Радни задатак – узорковање и транспорт риба 23

4.0. ОБДУКЦИЈА И ОБДУКЦИОНЕ ТЕХНИКЕ КОД РИБА 24

4.1. Општи поступак обдукције 24

4.2. Спољашњи преглед рибе 24

4.3. Преглед унутрашеих органа рибе 26

4.4. Радни задатак – обдукција риба 32

5.0. УЗИМАЊЕ МАТЕРИЈАЛА ЗА ЛАБОРАТОРИЈСКУ ДИЈАГНОСТИКУ 33

5.1. Узимање узорака крви за хематологију, серологију и прављење крвног размаза 33

5.2. Узимање узорака за паразитологију 35

5.3. Узимање узорака за хистопатологију 36

5.4. Узимање узорака за бактериологију 36

5.5. Узимање узорака за вирусологију 36

5.6. Радни задатак – узимање материјала за даље анализе 38

6.0. ДИЈАГНОСТИКА ПАРАЗИТСКИХ БОЛЕСТИ 39

6.1. Преглед рибе на присуство паразита 39

6.2. Паразитолошке технике и формуле: 43

6.3. Практични кључеви за детерминацију протозоа у нативним препаратима 45
6.4. Радни задатак – дијагностика паразитских болести 48
7.0. ДИЈАГНОСТИКА БАКТЕРИЈСКИХ БОЛЕСТИ 49
7.1. Методе испитивања 49
7.2. Радни задатак – дијагностика бактеријских болести 55
8.0. ДИЈАГНОСТИКА ВИРУСНИХ БОЛЕСТИ 56
8.1. Узимање узорака рибе за вирусолошки преглед 56
8.2. Изолација вируса на ћелијским културама 57
8.3. Електронска микроскопија 61
8.4. Радни задатак – дијагностика вирусних болести 62
9.0. ДИЈАГНОСТИКА ГЉИВИЧНИХ БОЛЕСТИ 63
9.1. Методе изолације 63
9.2. Методе узгоја 63
9.3. Радни задатак – дијагностика гљивичних болести 68
10.0. ДИЈАГНОСТИКА БОЛЕСТИ РИБА ПРИМЕНОМ МОЛЕКУЛАРНИХ ТЕХНИКА ... 70
10.1. In situ хинридизација 71
10.2. Ланчана реакција полимеразе (PCR) 72
10.3. Квантитативни PCR – TaqMan Real-time PCR тест 73
10.4. Радни задатак – молекуларна дијагностика 75
11.0. СЕРОЛОШКИМ ДИЈАГНОСТИКА 76
11.1. Припрема антисерума 76
11.2. Припрема пречишћених специфичних глобулина 76
11.3. Аглутинација 77
11.4. Имунофлуоресценција 78
11.5. ELISA (engl. Enzyme-linked immunosorbent assay) 79
11.6. Радни задатак – серолошка дијагностика 80
12.0. ДИЈАГНОСТИКА ИНТОКСИКАЦИЈА 81
12.1. Дијагностиковање тровања рибама 82
12.2. Испитивање in situ 83
12.3. Хидрохемијско испитивање 84
12.4. Испитивање седимената 85
12.5. Хидробиолошко испитивање 85

12.6. Испитивање перифита 85
12.7. Биолошки тест за испитивање токсичности воде 86
12.8. Преглед рибе 87
12.9. Радни задатак –дијагностика интоксикација 89
13.0. ПРЕВЕНЦИЈА БОЛЕСТИ РИБА 90
13.1. Обезбеђивање извора воде без патогена 90
13.2. Заштита од преноса патогена 91
13.3. Дезинфекција рибњака и опреме; зимско смрзавање и летње исушивање објеката 92
13.4. Оптимизација услова средине 93
13.5. Редовна контрола здравственог стања и превентивно третирање риба 93
13.6. Радни задатак –превњнција болести 94
14.0. СПРОВОЂЕЊЕ ТЕРАПИЈЕ У АКВАКУЛТУРИ И НАЈВАЖНИЈИ ЛЕКОВИ У УПОТРЕБИ 95
14.1. Примена терапеутских супстанци и препарата у воденој средини 95
14.2. Примена терапијских супстанци у сточној храни 101
14.3. Примена терапијских супстанци преко сонде 103
14.4. Давање терапеутских супстанци путем ињекција 104
14.5. Радни задатак – спровођење терапије и израчунавање концентрације лекова ... 105
15.0. ПРИМЕНА ВАКЦИНА КОД РИБА 107
15.1. Мртве вакцине 108
15.2. Атенуиране вакцине 108
15.3. ДНА вакцине 108
15.4. Рекомбинантне векторске вакцине 108
15.5. Субјединичне вакцине 109
15.6. Генетски модификоване вакцине 109
15.7. Синтетске пептидне вакцине 109
15.8. Начини администрације вакцина 109
15.9. Радни задатак – вакцинација 112
ОДАБРАНА ЛИТЕРАТУРА 113
ПРИЛОГ 114

1.0. АНАТОМИЈА РИБА

Рибе су највећа група кичмењака које живе у слаткој и сланој води. Преко 25.000 врста риба чине око 50% популације кичмењака. Део разлога за велики број риба је и због своје добре прилагођености на живот у воденој средини.

1.1. Спољашна анатомија

Облик тела

Облик тела рибе, као и облик и величина одређених спољашњих карактеристика, могу нам много рећи о тој риби. На пример, облик тела рибе може да укаже где та риба живи у води и какав би то пливач могао бити. Тело већине риба је вретенасто издужено, билатерално симетрично и латерално спљоштено и служи да се лако пробијајају кроз воду. Поред тога, облик репне пераје такође означава брзину пливања рибе. Оштро рачваст реп, подразумева брзог пливача, а заобљени реп значи да се риба добро окреће.

Пераја

Све рибе имају пераја. Пераја омогућавају риби да балансира и управља пливање. Пераја су набори коже подупрти окошталим зрацима – жбицама, којих има различит број у различитих пераја и код различитих врста риба. Пераја се деле на парна, које одговарају удовима виших кичмењака, и непарна. У парна пераја спадају грудна – *p. pectorales* и трбушна – *p. ventrales*. Непарне су: леђно пераје – *p. dorsalis*, анално – *p. analis* и репно – *p. caudalis*. Леђно пераје помаже у управљању, али његова главна функција је заштита, а неке врсте имају веома оштра, бодљикава леђна пераја. Грудна пераја помажу риби да балансира, плива у месту и окреће се. Трбушна и анална пераја се налазе на стомаку и помажу при управљању, као и равнотежи. Репно пераје, које се такође назива и каудално помаже риби да се риба помера унапред и оно је најважнијнија локомоторна пераја.

Шкрге

Шкрге су смештене са обе стране главе рибе и састоје се од четири функционална шкржна лука са сваке стране. Шкрге служе за респирацију и пренос кисеоника из воде у крвоток риба и угљен диоксида из крвотока у воду. Шкрге су прекривене флексибилном коштаном плочом која се зове оперкулум. Неке рибе имају бодље које се налазе на оперкулуму као одбрамбени механизам за заштиту од предатора.

Бочна линија

Бочна линија се протеже дуж тела рибе, латерално. Састоји се од низа микроскопских каналића које се налазе непосредно испод крљушти рибе. Основу чине осетни органи – неуромасти, који су скупине сензитивних ћелија са длачицама. Неуромасти су малим каналићима повезани са спољном средином. Каналић бочне линије испуњен је ретком слузи на чији помак приликом промене притиска воде чулно реагују неуромасти. Бочна линија је једна од примарних чулних органа рибе, може да осети ниске вибрације у води и способна је да одреди правац њиховог извора.

Ноздрве

Све рибе имају чуло мириса. Упарене рупе које се називају ноздрве, користе се за откривање мириса у води, а налазе се на носној регији главе рибе. Обложене су мукозно-цилиндричним епителом, између којих су распоређене групе олфактивних ћелија. Чулом мириса рибе налазе храну, своје јато, осећају алармне мирисе и др. Неке рибе, као што су неке врсте ајкула, сом и јегуље, имају веома оштар мирис.

Очи

Очи су у већини риба постављене постранце, што значи да свако око гледа самостално. Помоћу очију, рибе се оријентишу, траже храну и др. Величина очију зависи од начина живота и исхране. Крупне очи имају штука и смуђ, и ове рибе добро виде, док сом, који живи при дну, у тами слабије користи ово чуло и очи су му ситне. Уопште, рибе имају умерено развијен вид, јер је видљивост у води мања него на копну. Већина риба види добро на удаљености до 1 m, а највише 15- 20 метара. Како сочиво делимично пролази кроз дужицу, риба има веома велики угао гледања, чак и до 180^{o}.

Крљушт и слуз

Већина риба има крљушт које покривају дужину њиховог тела. Крљушт штите рибу од повреда. Крљушти су су калцификоване еластичне плоче и према грађи се разликују: плакоидне љуске (*Selachia*), ганоидне (*Ganoidea*) и елазмоидне крљушти карактеристичне за кошљорибе. Међу елазмоидним постоје округласте, циклоидне љуске (*Cyprinidae, Salmonidae*) и ктеноидне са назубљеним задњим крајем (*Percidae*) које се налазе у виших *Teleostea*. На врху крљушти налази се слузни омотач познат као слој слузи. Слуз штити рибу од продора бактерија и паразита у води. Риболовци треба да буду опрезни да не уклањањају слуз при руковању рибом. Слузни омотач при кретању смањује трење тела са водом, штити организам од патогених агенса, помаже осмотске процесе, таложи суспендоване честице муља у води и даје риби карактеристичан мирис.

Уста

Уста риба се разликују по величини и изгледу, могу и не морају садржати зубе. Локација и положај уста на рибљем телу такође нам могу дати нформацију о исхрани рибе. Уста окренута нагоре, значе да ће риба јести храну која се налази изнад ње и такав положај имају плантофагне врсте риба, док врсте са уснама окренутим ка доле, спадају у бентофагне које узимају храну са дна.

1.2. Анатомија унутрашњих органа

Срце

Овај орган пумпа крв по целом телу испоручујући кисеоник и хранљиве материје за ћелије разних 85

срцем које се састоји од једне преткоморе и једне коморе, за разлику од типичног срца са по 2 коморе и преткоморе које се налази код копнених животиња попут сисара и птица. Атријумска крв се пумпа у вентрикус срца. Кроз срце протиче само венска крв. Из коморе, крв се пумпа у шкрге где се одвија размена гасова у шкржним филаментима. Угљен диоксид (CO_2) се избацује и кисеоник (O_2) се уноси. Ова поново оксигенисана крв (артеријска) затим тече до остатка ћелија и ткива у телу. Венска крв, засићена гљен диоксидом се коначно пумпа назад у атријум срца где процес поново почиње.

Јетра

Јетра има многе функције за варење и складиштење. Једна од функција је и производња жучи, која емулгује масти у цревима. Јетра такође складишти масти и угљене хидрате, уништава старе крвне ћелије, одржава правилну хемију крви и игра улогу у уклањање азотног отпада.

Гонаде

Гонаде су полни органи. Мужјаци имају упарене тестисе који производе млеч, а женке имају упарене јајнике који производе икру. У већини случајева, оплодња јаја се врши споља, током периода мреста риба.

Рибљи мехур

Рибљи мехур испуњен је ваздухом, са својим еластичним зидом, једини је чулни орган за промену притиска у води и карактеристичан је за већину кошљориба. Поред хидростатичке функције, он служи и као пријемник притиска звука, а код неких врста учествује у дисању. Рибљи мехур је смештен између бубрега и органа за варење, а може бити једноставан, као у салмонида, или подељен на 2 дела, као код ципринида. Мехур се пуни у првим данима живота гутањем ваздуха са површине воде. Уколико ларве шарана, после 24-36 часова, не напуне своје мехуре ваздухом покрети су им некоординирани и отежани, заостају у порасту и врло брзо угињавају. Многе рибе су у стању да контролишу размену

гасова или количину гаса у свом рибљем мехуру кроз капиларе који се налазе тамо где је мембрана рибљег мехура веома танка. Када риба превише плута и почне да плута нагоре, гас дифундује из рибљег мехура у крв. Гас у крви се уклања на шкржним филаментима и избацује. Насупрот томе, ако риба почиње да тоне, ваздух улази у рибљи мехур преко гасне жлезде. Понекад ако се риба ухвати и брзо избаци на површину из дубоке воде, њен рибљи мехур се може проширити тако брзо да се надува или чак пукне што обично убија рибу. Код шарана и сома рибљи мехур је смештен близу њиховог унутрашњег уха те им то даје бољу слушну способност. Риба са малим рибљим мехуром или без његга, као што су стрелице и равне рибе попут иверка, тону на дно ако престану да пливају и имају смањену способност слуха.

Желудац и црева

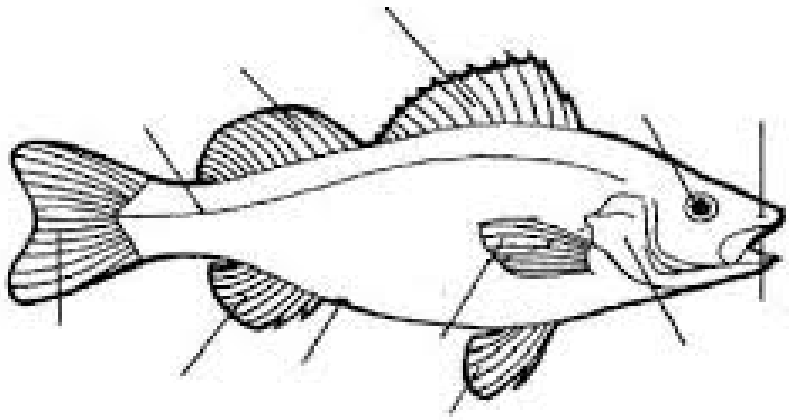
Желудац је добро развијен, еластичан орган и служи за складиштење и варење хране, претежно протеинског порекла. Циприниде немају желудац већ је предњи део црева проширен у интестинални булбус. Епител слузокоже је набран и богат слузним ћелијама и специјалним једноћелијским жлездама које истовремено луче ензим пепсин и сону киселину. На преласку желуца у црево, у већини риба се налази глатко мишићни престен – пилорус којим храна повремено одлази у црево а који има избочине налик на прсте који се називају пилорични наставци. Сматра се да путем лучења ензима пилорус помаже у разградњи хране и апсорбује потребне хранљиве материје, али функција овог органа још увек није добро истражена. Рибе карниворе имају прилично кратка црева јер такви храна се лако хемијски разлаже и вари. Рибе које су хербиворе захтевају дужа црева јер је биљна материја обично жилава и влакнаста, те се теже и спорије вари.

Бубрези

Бубрези су главни орган за излучивање мокраће код риба и за хематопоезу. Смештени су ретроперитонеално, испод кичменог стуба. Протежу се целом дужином телесне шупљине, у облику једне или две тамно црвене траке. Најчешће се на бубрегу разликује предњи бубрег, који сачињавају хематопоетски и ендокрини елементи, средњи бубрег, који је режњевит, док код неких врста (штука) постоји и задњи бубрег. Бубрези су органи који филтрирају течни отпад из крви. Бубрег је такође изузетно важан у регулисању концентрације воде и соли у телу рибе, што извесним врстама омогућава да опстају у слаткој или сланој води.

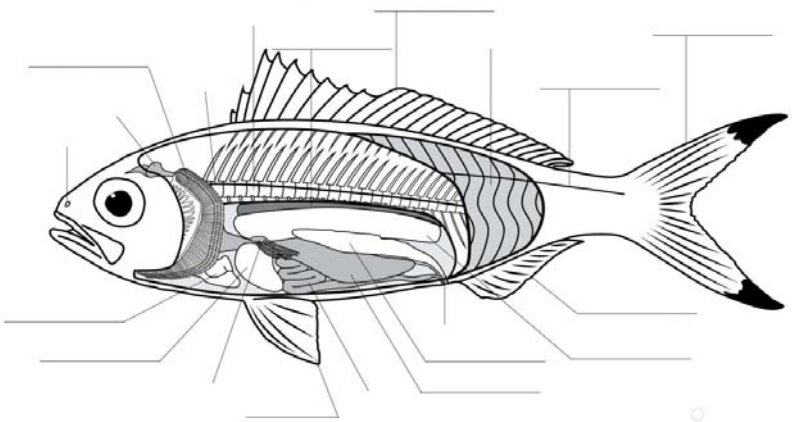
1.3. Радни задатак - дисекција риба

На доњој слици идентификујте следеће делове: уста, бочна линија, око, ноздрву, оперкулум, анално пераје, леђна пераја, грудна пераја, репно пераје и анус.



Слика 1. Спољашња анатомија рибе.

На слици испод идентификујте и напишите делове тела рибе на означене линије.



Слика 2. Анатомија утрашњих органа рибе.

Питања:

1. Која је функција рибљег мехура и како он функционише?

   _____

   _____

2. Која је сврха бочне линије?

   _____

   _____

3. Како се срце разликује између риба и сисара?

   _____

   _____

4. Наведите два органа које рибе имају а животиње немају?

   _____

5. Споји следеће органе/структуре са одговарајућим функцијама:

____ Шкрге	1. Штити рибе од бактерија и паразита из воде
____Бочна линија	2. Филтрира токсине из крви и избацује их у спољашњу средину
____Пилорични наставци	3. Испуњен ваздухом и помаже риби кретање на горе и доле у води
____Слуз	4. Помаже у процесу варења
____Јетра	5. Омогућава риби да осети вибрације воде
____Рибљи мехур	6. Лучи жуч и помаже варење
____Бубрези	7. Омогућавају риби да дише у води

2.0. ФИЗИЧКИ И ХЕМИЈСКИ АСПЕКТИ КВАЛИТЕТА ВОДЕ

2.1. Физички параметри

Температура

Рибе имају горњу и доњу границу топлотне толеранције и оптималне температуре за раст, инкубацију икре, конверзију и отпорност на специфичне болести. Ове оптималне вредности варирају у зависности од врсте и могу се разликовати за различите параметре као што су парцијални притисак кисеоника и pH вресност воде. Слатководне воде су подложне температурним флуктуацијама у зависности од географске ширине, годишњег доба, надморске висине, доба дана, дубине и других фактора. Опсег промене температуре морске воде је знатно мањи, због циркулације воде у морима и океанима и велике количине воде. Многе болести риба су температурно модулиране, где је патогеност блиско повезана са специфичном температуром. Вирусни патогени код риба се репликују у одређеном температурном опсегу воде. У многим системима домаћин - патоген постоји равнотежа између одбране домаћина и инвазивности патогена, али то се лако мења променом температуре. Температура воде такође утиче на друга својства акватичног окружења важног за здравље риба. Растворени гасови генерално смањују растворљивост са повећањем температуре, док растворљивост токсичних једињења, који су само слабо растворљиви у води, као нпр. сирове нафте и пестицида, расте са порастом температуре. Токсичност неких супстанци, попут тешких метала, такође расте са температуром.

Светлост

Светлост је сложен еколошки фактор чије компоненте укључују спектар боја (квалитет), интензитет (количина) и фотопериод (периодичност). Водена средина има специфичне и изузетно променљиве карактеристике, те је рецептивност риба на промене светла мења у зависности од врсте и категорије риба. У отвореним водама и интензивним фармским системима, светлосни нивои се могу мењати само индиректно помоћу метода као што су повећање дубине воде и контролисање једноћелијских алги, макрофита и хлада од дрвећа. Слаб продор светлости узрован абсорбујућим или рефлектујућим загађивачима, као што су глине, прање угља и папирни отпад, смањује продуктивност алги и може смањити доступне количине хране за рибе. У интензивним системима лакше се контролише режим светлости-интензитет, фотопериод, осенчена подручја и апсорпцију светлости. Сви ови параметри могу допринети аспектима раста и сазревања риба.

Код многих гајених врста потребни су одговарајући циркадијални периоди мрака и светлости за правилно одређивање времена и завршетак одрђених процеса, као што су полно сазревање, а добробит и хомеостаза често зависе од одговарајућих фотопериода.

Фотосинтеза

Фотосинтеза је једна од најважнијих биолошких активности у аквакултури стајаћих вода. Многи параметри квалитета воде као што су растворени кисеоник, угљен-диоксид, pH и азотни отпадни производи су регулисани фотосинтетском реакцијом фитопланктона. Једноставно речено, фотосинтеза је процес којим фитопланктон користи сунчеву светлост да претвори угљен-диоксид у извор хране и да ослободи кисеоник као нуспроизвод. Поред снабдевања кисеоником у рибњацима, фотосинтеза такође уклања неколико облика азотног отпада, као што су амонијак, нитрати и уреа. Пигменти фитопланктонских биљака укључени у ову хемијску реакцију називају се хлорофилом. То су исти пигменти који се налазе у вишим биљкама као што је лишће дрвећа. Пошто се фотосинтетички процес покреће сунчевом светлошћу, највеће концентрације кисеоника се јављају када је сунце највише на хоризонту (обично 14-15 часова поподне).

Ноћу фотосинтеза престаје и фитопланктон првенствено дише. Дисање је обрнуто од фотосинтезе јер фитопланктон користи кисеоник за претварање хране у енергију, а угљен-диоксид се ослобађа као нуспроизвод. Дисање фитопланктона се такође дешава током дана, али на срећу узгајивача рибе, обично постоји вишак кисеоника који се производи да би се надокнадио губитак услед дисања. Изузетак је током дужих периода облачности, дисање које се јавља у одсуству фотосинтезе узрокује смањење нивоа кисеоника током целе ноћи. Као резултат тога, најниже концентрације кисеоника се примећују непосредно пре изласка сунца.

Суспендоване честице

Планктон, рибљи отпад, непоједена храна или честице глине суспендоване у води могу изазвати проблеме, посебно у рециркулацијским системима аквакултуре. Честице рибљег отпада могу бити главни извор лошег квалитета воде јер могу садржати до 70 % азотног оптерећења у систему и могу иритирати шкрге рибе. Замућеност узрокована честицама глине или земље може ограничити продирање светлости и ограничити фотосинтезу. Седиментација честица тла такође може уништити рибља јаја и корисне заједнице организама на дну као што су бактерије. Уклањање замућености глине може се постићи додавањем материјала који се везују за негативно наелектрисање честица глине, формирајући честице довољно тешке да се таложе на дно.

Превелике количине алги такође представљају проблем јер доводе до повећане стопе дисања током ноћи, што утиче на то да рибе троше више кисеоника. Прекомерно накупљање фитопланктона или "цветање" алги такође ће потрошити додатни кисеоник. Све велике промене између дневног и ноћног нивоа кисеоника могу довести до опасно ниске концентрације кисеоника.

2.2. Хемијски параметри

Јонски продукти воде

Вода се понаша као слаба база и киселина по томе што је способна да губи или добија протоне:

$$H_2O \leftrightarrow H^+ + OH^-$$

Константа развотеже за дисоцијацију воде додређује се следећом формулом:

$$Kw = \frac{C_{H^+} \times C_{OH^-}}{C_{H2O}}$$

Где су C_{H+} и C_{OH^-} одговарајуће концентрације јона. Експериментални докази су показали да у чистој води при 25°C, *K*w = 1.00 ×10^{-14}, а пошто су оба јона присутна у једнаким количинама,

$$C_{H^+} = C_{OH^-} = 1x10^{-7} \text{ g јона/литри}$$

Растворени кисеоник

Растворени кисеоник је далеко најважнији хемијски параметар у аквакултури. Низак ниво раствореног кисеоника је одговоран за више смртности код рибе, било директно или индиректно, него сви други проблеми заједно. Као и људима, рибама је потребан кисеоник за дисање. Количина кисеоника коју риба конзумира је функција њене величине, брзине храњења, нивоа активности и температуре. Мале рибе троше више кисеоника него велике рибе због њиховог већег метаболизма.

Растворљивост кисеоника се повећава како температура пада. У рибњацима, растворени кисеоник се може драматично променити током периода од 24 сата. Током дана се кисеоник производи фотосинтезом, процесом којим зелене биљке претварају воду и угљен-диоксид у присуству светлости у кисеоника и угљених хидрата. Током ноћи и дана кисеоник се троши дисањем, процесом којим биљке и животиње користе кисеоник за производњу угљен-диоксида како сагоревају угљене хидрате, али у току дана фотосинтеза обично производи више кисеоника него што се користи. Нивои кисеоника су најнижи непосредно пред зору, а највиши у касно поподне. Растворени кисеоник у рибњачким системима мора да се одржава изнад нивоа који се сматра стресним за рибу. Топловодне рибе могу толерисати ниже концентрације раствореног кисеоника од хладноводних риба. Растворени кисеоник треба одржавати изнад 4,0 mg/L код шаранских риба и

изнад 9,0 mg/L за хладноводну рибу (Табела 1). Продужена изложеност ниским, несмртоносним нивоима кисеоник представља хронични стрес и узрокује да рибе престану да се хране, смањује њихову способност конверзије унете хране у месо рибе и чини их подложнијим болестима. Интензивна производња рибе у различитим системима који укључују: класичне рибњаке, кавезне, проточне и рециркулационе системе захтевају аерацију или оксигенацију за одржавање растворененог кисеоник на безбедним нивоима.

Угљен диоксид

Угљен диоксид (CO_2) се обично налази у води као продукат фотосинтезе или у изворима воде који потичу из стена које садрже кречњак. Чести проблеми са угљен диоксидом јављају се када се користе подземне воде, при транспорту риба у високим густинама, или у рециркулационим системима.

У високим концентрацијама, угљеник диоксид доводи до тога да рибе изгубе равнотежу, постану дезоријентисане и вероватно угину. Рибе могу толерисати концентрације од 10 ppm под условом да су концентрације растворених кисеоника високе. Вода која подржава добре популације риба обично садржи мање од 5 ppm слободног угљен диоксида. У води која се користи за интензивну рибњачку производњу, нивои угљен-диоксида могу да варирају од 0 ppm пододне до 5-15 ppm у зору. Док у рециркулацијским системима нивои угљен диоксида могу редовно прелазити 20 ppm. Превише високи нивои угљен-диоксида (већи од 20 ppm) могу ометати коришћење кисеоника од стране риба.

Постоје неколико уобичајених начина за уклањање слободног угљен-диоксида. Прво, са бунарском или изворском водом из кречњачких стена, аерација може „оддувати“ вишак гаса. Друга опција је додавање неке врсте карбонатног пуферског материјала као што је калцијум карбонат ($CaCO_3$) или натријум бикарбонат (Na_2CO_3). Такви додаци ће у почетку уклонити сав слободни угљен диоксид и ускладиштити га у резерви као бикарбонатни и карбонатни пуфери.

Испитивање подземних вода пре употребе и коришћење аерације, смањиће угљен диоксид на прихватљив ниво. Пажљиво планирање, аерација или оксигенација и пуферовање воде ће задржати угљен диоксид на прихватљивом нивоу када се велики број риба узгаја у рециркулационимм системима.

Азот

Растворени гасови, посебно азот, обично се мере у смислу „процента засићења“. Свака вредност већа од количине гаса коју вода нормално држи на датој температури представља презасићење. Ниво презасићености гасом изнад 110% се обично сматра проблематичним.

Болест гасних мехурића је симптом презасићености гасом. Знаци болести мехурића гаса могу бити различити. Мехурићи могу доћи до срца или мозга, а рибе угину без икаквих видљивих спољашњих знакова. Други симптоми могу бити мехурићи непосредно испод површине коже, у очима или између жбица пераја. Лечење болести гасних мехурића укључује довољно проветравања да би се концентрација гаса смањила до засићења или ниже.

Амонијак

Рибе излучују амонијак и мање количине урее у воду као отпад. Два облика амонијака се јављају у системима аквакултуре, јонизовани и нејонизовани. Нејонизовани облик амонијака (NH_3) је изузетно токсичан, док јонизовани облик (NH_4^+) није. Оба облика су груписани заједно као "укупни амонијак". Кроз биолошке процесе, токсични амонијак се може разградити до безопасних нитрата.

У отвореним водама, као што су језера и реке, амонијак можда никада неће достићи опасне високе нивое због мале густине рибе, али узгајивач рибе мора да одржава високу густину рибе и стога се излаже ризику од токсичности амонијака. Нивои нејонизованог амонијака расту са порастом температуре и pH. Да би се одредила концентрација нејонизованог амонијака, помножи се укупна концентрација амонијака са процентом који је најближи посматраној температури и pH узорка воде.

Нивои токсичности за нејонизовани амонијак зависе од појединачне врсте; међутим, нивои испод 0,02 ppm се сматрају безбедним. Опасно високе концентрације амонијака обично су ограничене на систем рециркулације воде или резервоаре за извлачење где се вода непрекидно рециклира и у рибњачкој култури након одумирања фитопланктона. Међутим, познато је да се средњи облик амонијака - нитрита јавља на токсичним нивоима (болест смеђе крви) у рибњацима. Концентрације од 0,5 ppm смањују раст и негативно утичу на рибе. Рибе могу толерисати нитрате до неколико стотина ppm.

Када се рибе интензивно узгајају и хране храном богатом протеинима могу произвести високе концентрације амонијака у води. Амонијак и други метаболички отпад се постепено уклањају природним процесима у језерима или кроз употребу биолошких филтера у рециркулационим системима. Амонијак уклањају бактерије које га у почетку претварају у нитрит, а затим у нитрат.

Алкалитет и пуферски капацитет воде

Од суштинског значаја у аквакултури је адекватан пуферски систем који служи за контролу великих промена pH вредности воде. Без неких средстава која служе за депоновање угљен диоксида ослобођеног дисањем биљака и животиња, нивои pH могу флуктуирати у језерцима од приближно 4-5 до преко 10 током дана. У рециркулационим системима константно дисање рибе може подићи нивое угљен диоксида довољно високо да омета унос кисеоника рибама, поред тога што снижава pH воде. Алкалност је мерење карбонатних и бикарбонатних јона (јони су атоми или групе атома са негативним или позитивним наелектрисањем) растворених у води. Како количина угљен диоксида варира, pH воде се мења. Величина овога померање је одређено пуферским капацитетом воде или његовом способности апсорпције киселина и/или база.

Фотосинтетичка активност у слабо пуферованом рибњаку може довести до пораста pH вредности, можда од само шест ујутру до девет или чак више до касно поподне. У рибњаку са већом алкалношћу, pH се смањује. Погодан опсег алкалности је 20 до 300 ppm. Алкалност преко 300 ppm не утиче негативно на рибе, али омета деловање одређених хемикалија које се обично користе (нпр. бакар сулфат). Алкалност остаје релативно константна у рибњацима, али се стално

смањује у системима са рециркулацијом без допуне. Алкалност може бити повећана додавањем кречњака у језера или натријум бикарбонат у рециркулационе системе.

У топловодној аквакултури, на шаранским рибњацима, једно од веома важних средстава које има одличне пуферске особине и које балансира pH вредност је гашени и негашени креч, који може да се примењује у концентрацји од 2000-4000 kg/ha годишње.

pH вредност

Концентрација база и киселина у води одређује њен pH. Ниска pH је кисела, висока pH је базна; а pH од 7 је неутралан. Рибе преживљавају и најбоље расту у водама са pH између 6-9 (оптимално 6,5-8,5). Ако су pH вредности изван овога опсега, раст рибе је смањен. При вредностима испод 4,5 односно изнад 10, долази до смртности. У добро пуферизованим рибњацима (са алкалношћу преко 50-100 ppm), pH обично варира једну или две јединице дневно.

Ујутро, нивои угљен диоксида су високи а pH је низак као резултат дисања током ноћи (угљен-диоксид формира благу киселину када се раствори у води). Након изласка сунца, алге и друге зелене биљке стварају угљене хидрате и кисеоник из угљен диоксида и воде фотосинтезом. Како се угљен диоксид елиминише из воде, њен pH се повећава. Најнижи pH у дану је обично повезан са најнижим нивоом раствореног кисеоника. Највиши pH током дана обично је повезан са највишим нивоом раствореног кисеоника. У рециркулацијским системима, витрификација и респирација како риба тако и биофилтерских бактерије смањују pH. Често се додаје пуфер као што је натријум бикарбонат како би се спречило да pH падне превише.

Гворђе

Многе подземне воде садрже повишене нивое раствореног гвожђа. Када је изложено ваздуху, ово гвожђе ступа у интеракцију са кисеоником, постаје нерастворљиво и формира црвени талог. Стварају се мале грудвице гвожђа које се могу таложити на шкргама рибе, изазивајући иритацију и стрес. Проблеми се могу избећи ако је вода која садржи гвожђе изложена ваздуху, што резултира да накупине гвожђа буду уклоњене таложењем или филтрацијом пре него што вода уђе у акватични систем.

Хлориди

Вода се за контролу бактерија, обично у градским водоводма се третира хлором са 1,0 ppm. Ако се хлорисана вода користи за узгој рибе (првенствено је ово случај за акваријуме), остатак хлора се мора уклонити аерацијом, са хемикалијама као што је натријум тиосулфат, или филтрацијом кроз активни угаљ. Чак и низак ниво хлора од 0,02 ppm може изазвати стрес код рибе.

Тврдоћа воде

Јони калцијума и магнезијума чине тврдоћу воде. Поступци испитивања обично обукватају одређивање оба јона као „укупну тврдоћу“, изражену као ppm калцијум карбоната. У већини вода концентрације алкалности и тврдоће су сличне, али она може знатно да се разликује пошто алкалност мери негативне јоне (карбонат, бикабонат), а тврдоћа мери позитивне јоне (калцијум, магнезијум). Тврдоћа је важна, посебно у гајењу неких комерцијалних врста као што је сом. Ако је тврдоћа слабија, те врсте не расу добро. Тврдоћа треба да буде изнад 50 ppm, а ниске вредности тврдоће воде се могу подесити додатком креча или калцијума хлорида.

Водоник сулфид

Рибњаци са дном сиромашним кисеоником и акумулираним органским материјалом могу ослободити водоник сулфид када се подиже седимент. Супстрат испод јако храњених кавеза/мрежних обора може акумулирати отпад (нпр. непоједену храну, измет) и произвести гас водоник сулфид ако кисеоник постане дефицитаран. Гас водоник сулфид има мирис покварених јаја и изузетно је токсичан. Треба избегавати бити изузетно опрезан при руковању језерима у којима постоји висока концентрација овог гаса. Да би се проблем елиминисао, рибњаци могу бити исушени, изложени ваздуху и/или изорани и механички обрађени.

2.3. Мониторинг физичко хемијских параметара воде

Ако се рибе гаје у високој густини, температура, растворени кисеоник, амонијак, нитрити и pH треба да буду свакодневно или чешће праћени (нпр. континуирано праћење раствореног кисеоника у рециркулацијским системима). Бистрина воде, алкалност и тврдоћа се могу мерити ређе, можда једном или два пута недељно, јер не флуктуирају једнако брзо. Гвожђе и хлор би требало да се утврђују приликом првог испитивања потенцијалног извора воде па се корективне мере могу уградити у производни систем током фазе пројектовања или планирања.

Угљен диоксид треба измерити при првој употреби новог извора подземних вода и рутински у рециркулацијским системима. Када су присутни проблеми са водоник-сулфидом и угљен-диоксидом, системе треба пажљиво пратити и благовремено и адекватно реаговати. При мањој густини насељености, параметри квалитета водемогу се пратити ређе или никако. Без обзира на учесталост, праћење треба да се спроводи у стандардном времену и дубини на којој се налазе рибе. Време мерења и посматране вредности треба да се забележе; Добро вођење евиденције је од суштинског значаја за успешну аквакултуру. У интензивним рибњацима и кавезним системима пожељно је пратити растворени кисеоник рано ујутру (најмање вредности кисеоника), када су услови стресни за рибе. Насупрот томе, температуру и pH у рибњацима је најбоље мерити током касног поподнева.

Табела 1. Параметри квалитета воде, mg/L.

Алкалитет (као $CaCO_3$)	10-400
Алуминијум (Al)	<0.01
Амонијак (NH_3)	<0.02
Арсен (As)	<0.05
Баријум (Ba)	5
Калијум (K)	50-80
Угљен диоксин (CO_2)	0-10
Хлор (Cl)	<0,003
Хром (Cr)	0,03
Алкалитет 100 ppm	0,006
Растворени кисеоник (O_2)	>4 топловодне рибе
Водоник сулфид (H_2S)	<0,003
Гвожђе (Fe)	<0,1
Олово (Pb)	<0,02
Магнезијум (Mg)	<15
Манган (Mn)	<0,01
Жива (Hg)	<0,02
Нитрати (NO_3)	0-3
Нитрити (NO_3)	<0,1
Никл (Ni)	0,1
pH	6,5-8
Фосфор (P)	<5
Натријум (Na)	75
Сумпор (S)	<0,1
Цинк (Zn)	<0.05

2.4. Радни задатак – физичко хемијски параметри воде

Питања:

1. Зашто је важно одржавати pH вредност воде у нормалним границама и шта се дешава када се pH повећа изнад 9,5?

   _____

   _____

   _____

2. Како се са повећањем температуре воде креће концентрација растворених O_2?

   _____

   _____

3. При транспорту риба, шта је представља већи проблем (заокружи тачан одговор)?

   1. Смањена концентрација O_2 у води
   2. Повећана концентрација CO_2 у води

4. Зашто прекомерно накупљање фитопланктона или "цветање" алги птедставља проблем на рибњацима?

   _____

   _____

   _____

5. Који облик амонијака је токсичнији за рибе (заокружи тачан одговор)?

   1. Нејонизовани облик амонијака (NH_3)
   2. Јонизовани облик (NH_4^+)

6. Упишите у празну колону да ли су вредности назначене у табели испод у референтним границама или не?

Табела 2. Вредности физичко хемијских параметара воде у рибњаку – провера.

Физичко хемијски	Детектоване	Вредност у границама
Температура°C	23	
pH	10,5	
O_2, mg/L	3,2	
NH_4^+, mg/L	0,2	
NH_3, mg/L	0,1	
Алкалитет ($CaCO_3$)	200	
CO_3, mg/L	12	
HCO_3, mg/L	360	
PO_4, mg/L	5	
NO_3, mg/l	3	
Ca^{2+}, mg/L	40	
CO_2, mg/L	15	

3.0. УЗОРКОВАЊЕ И ТРАНСПОРТ РИБА У СВРХУ ДИЈАГНОСТИКЕ БОЛЕСТИ

Стање узорка који се шаље у дијагностичку лабораторију може увелико утицати на стручњаке при доношењу дијагнозе и препоруке за поступак. Пожељно је послати живу рибу која показује клиничке знаке болести. Угинуле рибе немају великог значаја за постављање дијагнозе јер се рибе након угинућа распадају врло брзо. Уколико је узрочник болести бактерија, друге бактерије се размножавају током процеса распадања, брзо прерастају узрочника болести и његову идентификацију чине тешком или немогућом.

Паразити за опстанак требају живог домаћина. Једном када риба угине, паразити напуштају рибу и траже новог домаћина. Вируси требају живог домаћина да би могли преживети.

На угинулој риби већина вируса преживи тек неколико сати. Често је немогуће знати време угинућа рибе. Због тога је слање „свеже лешине“ губљење времена јер она се највероватније у дијагностичкој лабораторији неће моћи обрадити. Најбоље је сакупити барем 10 живих риба које показују знакове болести.

Постоји неколико начина слања узорака риба за дијагностичке прегледе:

- ◊ Жива риба
- ◊ Риба на леду
- ◊ Смрзнута риба
- ◊ Риба фиксирана у формалину/алкохолу

Риба слана на било који од ова четири начина треба бити узоркована жива међу оним рибама у популацији које показују знакове болести на коју узгајивач сумња. Најбоље је рибу ухватити мрежом. Болесне рибе вероватно не узимају храну, па храном не треба мамити рибе које ће бити узорковане, јер се тиме ризикује да се на преглед пошаљу најздравије рибе у популацији.

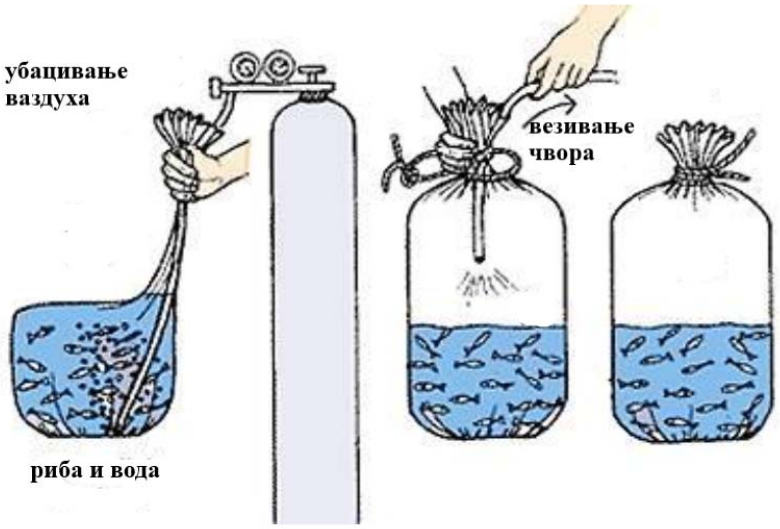
Уколико се од узгајивача то затражи, потребно је са рибама донети и узорак воде у којој рибе живе, нарочито уколико постоји сумња на промењене физичко-хемијске параметре воде или токсиколошке анализе воде. Узорак воде носи се у чистој посуди која се може чврсто затворити. Уколико се сумња на неки кемијски загађивач, вода се мора узорковати и донети у стакленој посуди.

3.1. Транспорт живе рибе

За транспорт живе рибе неопходно је набавити чврсту, водоотпорну, изоловану кутију за транспорт рибе (на пример, кутију од стиропора која ће се ставити у картонску кутију; или фрижидер-торбу.

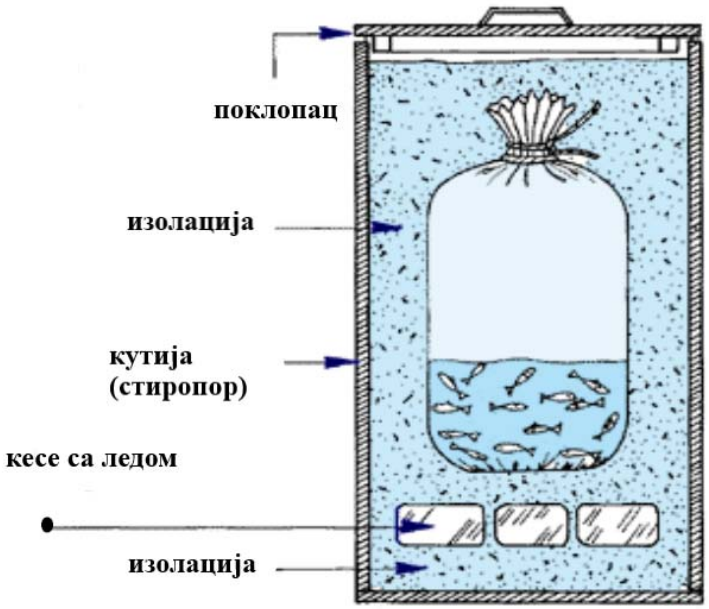
Напунити чврсту пластичну врећу до 1/3 са чистом водом из рибњака. Врећу ставити у кутију за транспорт и додати рибу која се шаље. Биомаса риба не би смела прелазити трећину волумена воде, коко не би дошло до асфиксије рибе.

Врећу затим треба напунити кисеоником. Затворити врећу заврнувши отвор и чврсто га стегнути са врпцом. Врло је важно да је врећа затворена и да ваздух (нити вода) не може изаћи (Слика 3).



Слика 3. Припрема живе рибе за транспорт у врећи напуњеној водом и кисеоником.

У посебну чврсту пластичну врећу или неколико врећица треба ставите 1-3 kg смрвљеног леда, затворити врећу их и ставити је у кутију за транспорт поред вреће са рибом (Слика 4).



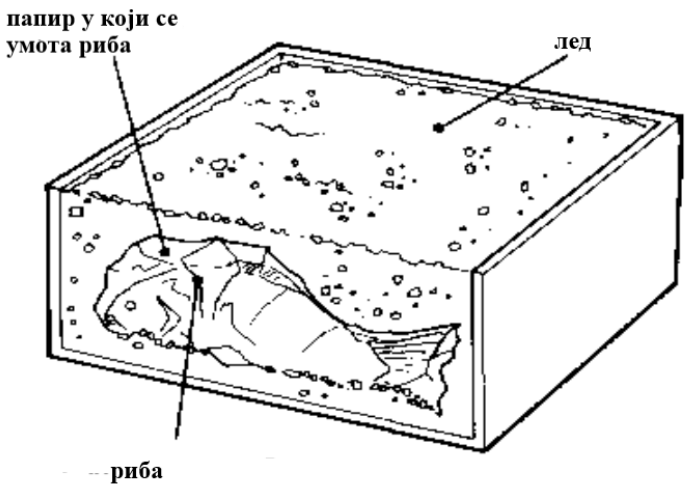
Слика 4. Транспорт живе рибе у стиропор кутији.

У посебну, малу пластичну врећицу ставити испуњени формулар са подацима (име, адреса, телефонски број и подаци о риби и производном систему из којег долазе). Написати зашто се сумња на болест, каква су угинућа, знаци болести који се детектовани, о којем се броју риба ради у односу на укупну популацију, када и како је риба узоркована за преглед, каква је густина насада, те какви су параметри воде. Формулар у кеси се ставља унутар кутије за транспорт, која се затвори и на њој се напише која страна кутије је горе, те да се шаље жива риба у дијагностичку лабораторију. Написати и име пошиљаоца и адресу на кутији. Назвати дијагностичку лабораторију и јавити када и како је послат материјал. Време транспорта не би смело трајати дуже од 12 сати, а значајно се смањује ако се не користи кисеоник.

3.2. Транспорт рибе на леду

За транспорт рибе на лесу неопходно је набавити чврсту, водоотпорну, изоловану кутију за транспорт рибе (на пример, кутију од стиропора која ће се ставити у картонску кутију; или фрижидер-торбу. Посебну чврсту пластичну врећу, напуњену са 5-10 cm смрвљеног леда треба ставите у кутију, како би се осигурало да риба током транспорта остане у што бољем стању. Треба сваку појединачну рибу која се шаље замотати у неколико новинских страница, те сваку рибу ставити у засебну пластичну кесу и затворити је (папир спречава настанак промрзлина које могу прикрити знаке болести који би могли бити важни за постављање дијагнозе) (Слика 5).

Кесе са рибама се стављају у врећу са ледом и прекрију са једнаком количином леда. Затворити затим врећу заврнувши отвор и чврсто га стежући са неколико снажних гумица или пластичних трака. Врло је важно да је врећа затворена и да ваздух (нити вода) не може изаћи. У посебну, малу пластичну кесицу ставити испуњени формулар са подацима пошиљаоца.



Слика 5. Транспорт рибе на леду.

3.3. Транспорт смрзнуте рибе

За транспорт смрзуте рибе треба набавити чврсту, водоотпорну, изоловану кутију за транспорт рибе. Посебну чврсту пластичну врећу, напуњену са 5-10 cm смрвљеног леда ставити у кутију. Сваку појединачну рибу ставити у засебну пластичну кесицу и затворити је. Затим треба замрзнути рибу. Кесице са рибама ставите у врећу са ледом и прекрити са једнако толико леда. Затворити кесу завртнувши отвор и чврсто га стежући са неколико снажних гумица. Уколико је могуће, употребите суви лед како би осигурали да се узорци не отопе током транспорта. 2,5 cm сувог леда ће узорке држати замрзнутима 24 до 36 сата уколико је кутија за транспорт добро изолована.

3.4. Транспорт рибе фиксиране у формалину/алкохолу

За транспорт рибе у формалину треба набавити чврсту, водоотпорну, изоловану кутију за транспорт рибе. Направите 10 %-тни раствор формалина, тако шро се помеша 9 делова воде са 1 делом 37 %тног формалина. Рибу жртвовати пре него се стави у формалински фиксатив.

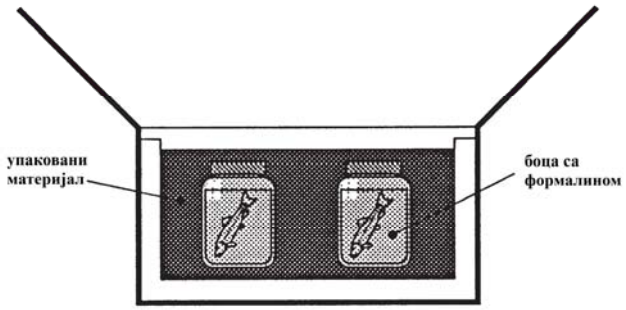
Важно је да се рибе врло брзо фиксирају како би се сачувала ткива. Формалин брзо фиксира ткива која су тања од 1 cm. Ради тога треба отворити трбушну шупљину већих риба, те опрезно извадити органе како би се фиксирали појединачни органи. Однос формалина и ткива треба бити 10:1 (по тежини или волумену, тј. 1000 ml формалина : 100 g рибе).

Посуда са формалином и ткивом мора бити чврсто затворена. Најбоље је користити пластичне посуде са чврстим поклопцем које ће потом бити затворене у пластичне кесе да би се додатно избегло цурење течности (Слика 6). Избегавати стаклене посуде јер се оне лакше могу разбити. Посуду са формалином и узорцима, затворену у пластичној кеси, треба затим ставитиу кутију за транспорт испуњеном са пелетама стиропора или другим прикладним материјалом за испуну кутије који ће посуде са узорцима држати на месту (згужваним папиром или сл.).
У посебну, малу пластичну врећицу ставити испуњени формулар са подацима пошиљаоца.

ОПРЕЗ: Формалин је иритирајући и токсични раствор. Неопходно је заштитити кожу и очи и обезбедитидобро проветрену просторију док год се рукује са формалином.

Начин на који су узорци риба припремљени и послати утицаће на постављање дијагнозе. Жива риба дијагностичару даје најбољу могућност добијања тачних података о болести, она се може претраживати на живе паразите, са таквих узорака могуће је изоловати и бактерије и вирусе.

Уколико дијагностичар жели спровести и хистопатолошку анализу, он може са такве рибе узети узорке ткива и органа, фиксирати их у формалину и даље прегледати на патолошке промене.



Слика 6. Транспорт рибе фиксиране у формалину.

Рибе достављене на леду или замрзнуте имају велика дијагностичка ограничења. На њима вероваттно неће бити живих паразита, хистопатолошка анализа вероватно неће дати веродостојне резултате, зависно од времена које је риба провела на леду. Такви узорци могу, али не морају бити задовољавајући за изолацију бактерија. Добри су за токсиколошке анализе.

Рибе достављене у формалину, уколико су правилно фиксиране, показују промене на ткиву индикативне за процес болести. Такви узорци неће моћи бити корисни за бактериолошку или виролошку дијагностику.

Приликом слања узорака рибе у дијагнстичку лабораторију неопходно је попунити и доставити податке о власнику, риби и податке о рибњаку са којег је риба узоркована (Табеле 3-4).

Табела 3. Подаци о власнику/пошиљаоцу.

Датум:	
Име пошиљаоца:	
Адреса:	
Телефон:	
Електронска пошта:	
Сврха слања узорка: (здравствени преглед/ продаја/болест/угинућа)	

Табела 4. Подаци о риби.

Базен/Рибњак бр.	Мрестилиште	Број узоркованих риба	Старост	Дужина (mm)	Тежина (g)	Број угинућа/дан	Датум почетка промена

Укупан број базена/рибњака у којима су примећене промене:_____

Укупан број базена/рибњака из којих су узорци послати у лабораторију: _____

За сваки рибњак/базен из којег је узоркована риба неопгодно је доставити одвојене податке приказане у табели 5.

Табела 5. Подаци о рибњацима/базенима из којих је узоркована риба.

Базен/Рибњак **Број**			
Врста рибе:			
Порекло:			
Датум уноса рибе у базен/рибњак:			
Датум појаве болести:			
Број угинућа/дан:			
Густина насада:			
Извор воде:			
Квалитет воде (pH; температура; растворени O_2; NH_3; и др.):			
Клинички знаци (неправилно пливање, слабо узимање хране и сл.):			
Исхрана (произвођач, величина пелета, дневни проценат):			
Временски услови на дан појаве болести:			
Навести раније болести/проблеме у овом базену/рибњаку:			
Навести раније терапије и захвате у овом базену/рибњаку:			

3.5. Радни задатак – узорковање и транспорт риба

Питања:

1. Како и на који начин се узоркује жива риба на рибњацима?

   _____

   _____

   _____

2. При паковању живе рибе у пластине кесе који однос воде, рибе и кисеоника треба да се испоштује?

   _____

   _____

3. Колики број риба преставља репрезентативан узорак ради адекватне дијагностике (заокружи тачан одговор)?

   1. 7
   2. 2
   3. 10

4. Који однос формалина и ткива рибе мора да буде код узимања и слања узорака у формалину и зашто?

   _____

   _____

   _____

5. Какав узорак је најбољи за дијагностику (заокружи тачан одговор)?

   1. Живе живе
   2. Рибе на леду
   3. Замрзнуте рибе

4.0. ОБДУКЦИЈА И ОБДУКЦИОНЕ ТЕХНИКЕ КОД РИБА

Након евидентирања узорка и добијања података о запримљеном случају треба попунити лабораторијски радни лист који ће пратити случај до завршетка. Живу рибу треба прегледати на абнормалности у понашању (спирално пливање, проширени оперкулуми, простарација, итд.) затим анестезирати (најбоље је користити анастетике који се дају у воду (MS – 222 или benzocaine) да би се избегли артефакти ткива узроковани различитим методема еутаназије, као што су ударац у главу и др. Неке спољашње абнормалности (некротични или еродирани врхови пераја, замућена рожњача, промена боје, прекомерна слуз) је најбоље посматрати док је риба потопљена у воду. У многим случајевима постморталне промене примљене мртве рибе ће онемогућити детекцију ових промена.

4.1. Општи поступак обдукције

Пре почетка обдукције рибе, неопходно је обезбедити потребан материјал и опрему за извођење секције: рукавице, тацну, маказе, пицете, скалпел, нож и материјал за узимање узорака (предметна стакла и љуспице, бочице за узорковање, петријеве шоље, игле, шприцеве, и др.).

4.2. Спољашњи преглед рибе

Рибе на обдукцији прво треба прегледати на спољашње абнормалности или лезије које могу укључивати: укоченост или на неки други начин лоше стање тела; егзофталмију; ендофталмију; замућење рожњаче или сочива; крварење у предњој очној комори, изглед пераја, изглед коже и крљушти, изглед и стање телесних отвора (анус, ноздрве, уста, шкржни поклопци (оперкулуми)), присуство гасних мехурића унутар жбица пераја или везивног ткива очију; улцерације, апсцесе, абразије; промене боје тела; прекомерну појаву слузи, пролапсус или едем ануса; присуство гљивичних инфекција коже, присуство видљивих паразита, цисти или других израслина ткива; абдоминалну дистензију или друге избочине или малформације тела (деформитети кичме, оток лобање, скраћење оперкулума и др.) (Слика 7).



Слика 7. Спољашњи преглед рибе (преглед очију, усне дупље и шкрга).

Веома често је неопходно узети шкрге, пераје и очи ради даљих дијагностичких процедура. Техника исецања шкрга спроводи се на следећи начин (Слика 8):

- ◊ Пререзати кост на врху где су шкрге спојене са главом.
- ◊ Пререзати кост на дну где су шкрге спојене са главом.
- ◊ Подигнути задњу ивицу шкрга и исећи је даље од коже, тако да се узму сва 4 шкржна лука.



Слика 8. Техника исецања шкрга.

Техника исецања очију спроводи се на следећи начин (Слика 9):

- ◊ Уклонити једно око тако што ће се прстом посегнути испод шкрге и снажно гурнути да се олабаве мишићи у очној дупљи.
- ◊ Када се око изгурне из дупље, извадити прст.

◊ Са спољашње стране, лагано повући око једном руком док се одсеца од главе.



Слика 9. Техника исецања очију.

Уколико потоје видљиве патолошке промене на перајима (цисте, крварења и др.) наеопходно је као и у случају исецања шкрга и очију одсећи делове пераја и жбица и сачувати их за даље анализе, или узетибрис за баериологију.

4.3. Преглед унутрашеих органа рибе

Преглед унутрашњих органа рибе започиње отварањем трбушне дупље. Прегледа се перитонеум, мезентеријум, површина и положај органа, присуство течности, слободних паразита или др. садржаја. Затим се детаљно прегледају полне гонаде, дигестивни тракт и јетра где се посматра количина и конзистенција цревног садржаја, боја, изглед, присуство паразита, изглед слузокоже, површина и ивице органа. Након тога се прегледа срце и перикард и посматра перикардијална шупљина на присуство течности. Код рибљег мехура се гледа облик, величина, боја и евентуално присуство садржаја, изглед унутрашње површине и присуство *Sphaerospora renicola.* Код прегледа бубрега се посматра боја, конзистенција, величина, рубови, присуство паразита, чворова, крварења, и др. На мишићима се прави неколико резова на присуство патолошких промена и парзита. На мозгу се посматрају боја, присуство крварења, паразити и друге промене.

Отварање трбушне дупље спроводи се тако што се риба отвори почевши од аналног отвора па се затим исече све до грла (Слика 10). Не треба сећи превише дубоко или ће се оштетити унутрашњи органи.





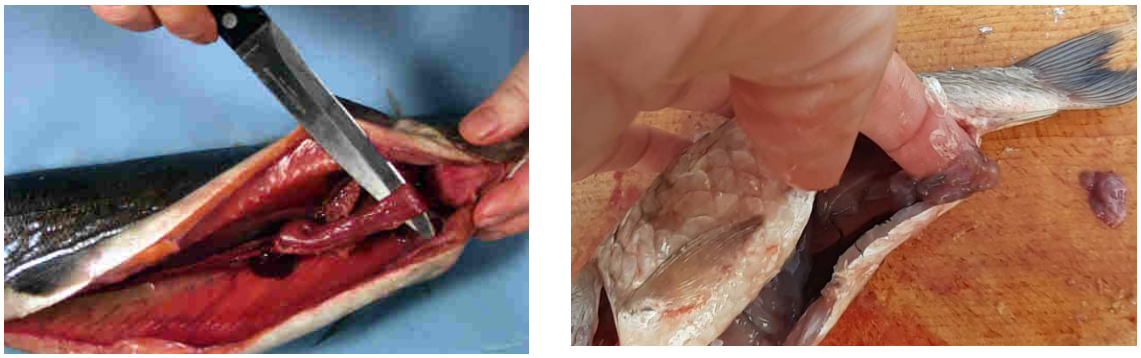
Слика 10. Отварање трбушне дупље код рибе.

Након отварања трбушне дупље уколико се рибе налазе у репродуктивној фази циклуса прво се уочавају икра и млеч. Ако је риба женка, постоје две кесе са икром од којих свака има омотач. Када је женка спремна за мрест, јаја се ослобађају унутар абдоминалне дупље и полажу из отвора. Ако је риба мужјак, постоје две врећице или тестиса, који производе млеч када су спремни за мрест. Млеч постаје течност која садржи сперму и истискује се кроз отвор да би се оплодила икра. Млечне вреће су обично чврсте и беле ако се мужјак није мрестио. Икра и млеч се ваде нежним повлачењем (Слика 11).



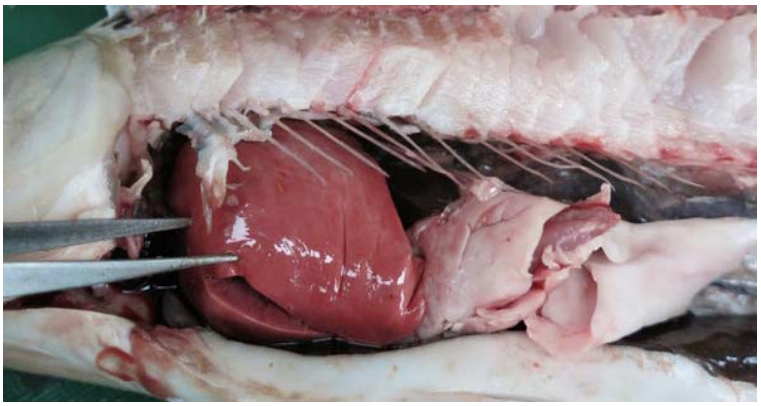
Слика 11. Техника вађења икре и млечи.

Дигестивни систем се уклања тако што се пресеца у пределу грла и нежно повлачи, а затим се задњи крај пресеца на аналном отвору (Слика 12).



Слика 12. Техника вађења дигестивног тракта.

Преглед и вађење јетре приказано је на слици 13. Јетра је највећи орган по запремини код већине рибљих врста. Црвена је, али боја варира у зависности од пола, врсте и фазе живота. На њој се налази и жучна кеса која је јако увећана код риба које не комзумирају храну или је слабије конзумирају.



Слика 13. Изглед јетре код риба.

Преглед срца подразумева вађење и расецање. Срце код риба се налази одмах иза шкрга и нежно се повлачи пинцетом, а затим се расеца и прегледа (Слика 12).



Слика 14. Вађење и преглед срца.

Рибљи мехур се уклања тако што се лагано повуче са ивица тела равном страном ножа, дохвати се једним прстом испод мехура и повуче. Настави се са повлачењем до грла где ће га лагано повлачење ослободити. Може се ставити у воду да плута, како би се показала пловност (Слика 15).



Слика 15. Вађење рибљег мехура и потапање у воду.

Бубрези се састоје од кранијалног и каудалног режња, постављени су ретроперитонеално и имају желатинозну конзистенцију. Ваде се тако што ће се исећи дуж сваке стране и затим користити кашику да се изваде (Слика 16).



Слика 16. Вађење бубрега.

Вађење мозга започиње тако што се сече глава иза шкржних поклопаца. Када се глава потпуно одсече уклања се веома танак комад (1/3 cm) са врха главе, и тако се исече неколико пута док се не стигне до мозга. Танке кришке ће спречити оштећење меког можданог ткива. Отвор у мозгу је окружен хрскавицом. Користи врх ножа да се мозак нежно извади и изтранжира (Слика 17).



Слика 17. Расецање главе и вађење мозга.

Након завршене обдукције све абнормалности и детектоване патолошке промене се уносе у извештај о обдукцији (Табела 6).

Табела 6. Обдукциони извештај за рибе.

Датум смрти	
Датум обдукције	
Особа која изводи обдукцију	
Врста рибе	
Тежина (g)	
Дужина (cm)	
Пол	
Анамнеза *(Разлог обдукције)*	

Спољашњи преглед

Огран	**Без абнормалности Да/Не**	**Абнормалности Да/Не**	**Абнормалности – опис налаза**
Уста			
Ноздрве			
Стомак			
Кожа			
Крљушт			
Шкрге			
Очи			
Пераје			
Стање тела			

Преглед унутрашњих органа

Орган	**Без абнормалности Да/Не**	**Абнормалности Да/Не**	**Абнормалности – опис налаза**
Јетра			
Слезина			
Бубрези			
Желудац			
Пилорични наставци			
Црева			
Ваздушни мехур			
Гонаде			
Срце			
Мозак			
Перитонеална шупљина			

Закључак обдукционог налаза

Макроскопске промене	
Микроскопске промене	
Фотографије (Да/Не)	
Исход иницијалног прегледа	
Узети узорци	
Бактериологија/Микологија	
Хистопатологија	
Вирусологија	
Паразитологија	
Токсикологија	
Додатне претраге	
Препоручене додатне радње	

4.4. Радни задатак – обдукција риба

Питања:

1. На које органе/структуре треба посебно обратити пажњу приликом спољашњег прегледа рибе?

   _____

   _____

   _____

2. Како се екстрахују шкрге и колико шкржних лукова се вади?

   _____

   _____

3. Уколико је жучна кеса приликом обдукције јако увећана (заокружи тачан одговор)?

   1. Риба је конзумирала храну
   2. Риба није конзумирала храну

4. Како се екстрахују бубрези и на шта треба пазити приликом извођења саме радње?

   _____

   _____

   _____

5. Приликом вађења мозга спроводи се следећа техника (заокружи тачан одговор)?

   1. Глава се расеца са латералне стране
   2. Глава се расеца са окципиталне стране
   3. Са горње стране се режу танке кришке (1/3 cm) док се не дође до мозга

5.0. УЗИМАЊЕ МАТЕРИЈАЛА ЗА ЛАБОРАТОРИЈСКУ ДИЈАГНОСТИКУ

Током извођења обдукције неопходно је узети узорке за додатне анализе које укључују хематологију, серологију, прављење крвног размаза, паразитолошку дијагностику, бактериолошку, вирусолошку, молекуларну дијагностику, хистопатологију и токсикологију.

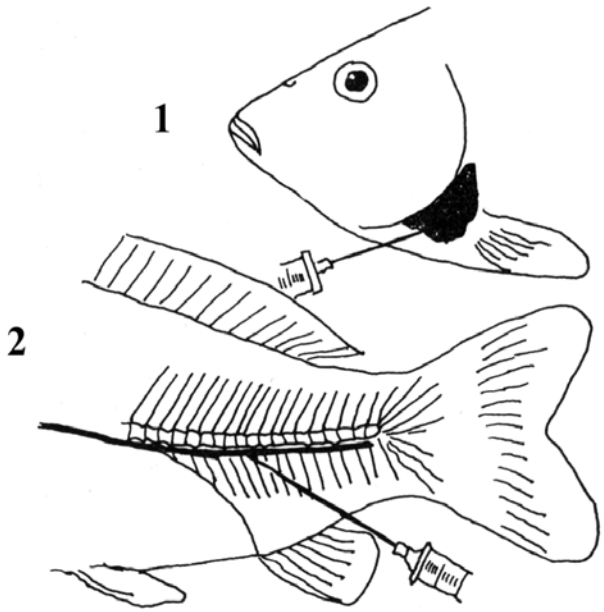
5.1. Узимање узорака крви за хематологију, серологију и прављење крвног размаза

Обично се узорци крви могу безбедно узети од риба дужих од 8 cm. Процедура узорковања не би требало да траје дуже од 30 секунди, јер дуже држање ван воде може изазвати дисбаланс електролита и респираторни дистрес. За хематолошку анализу, крв треба узети или са етилендиаминтетрасирћетном киселином (ЕДТА) или са хепарином као антикоагулансима. Главни недостаци хепарина су немогућност заустављања процеса коагулације ако се у узорку налази мали угрушак и склоност згрушавању тромбоцита и леукоцита. ЕДТА такође има велики недостатак, јер може изазвати хемолизу еритроцита код неких врста риба. Узорци крви се могу узети са различитих локација, у зависности од величине рибе, количине узорка, искуства оператера итд.

За хематологију се користе само узорци крви доброг квалитета. Хемолизирани, згрудвани или неправилно ускладиштени узорци нису погодни за процену. Треба користити шприцеве од 1-3 ml. Ако је потребна већа количина крви, најбоље решење је вакутајнер систем.

Од живих риба крв се узима из срца и каудалне вене односно каудалних крвних судова који се налазе у хемалном каналу. Место убода је на пресеку бочне линије и линије која одваја труп од репа (Слика 18). Игла би требало да буде уметнута док не продре у пршљен (хемални канал) на што указује благи отпор. Директна пункција срца изводи се помоћи игле и шприца само код већих риба.

Брис периферне крви треба да се узме ексцизијом каудалног дела тела (за мале рибе).



Слика 18. Вађење крви из срца (1) и каудалне вене (2).

Крвни размаз се мора правити одмах након вађења крви јер се крв код риба веома брзо згрушава, а прави на следећи начин:

- ◊ Ставити малу кап пуне крви на крај чисте предметнице.
- ◊ Додирнути крај друге предметнице на центар предметнице на којој се налази капљица крви.
- ◊ Друга предметница треба да стоји под углом од од 20-40° у односу на прву.
- ◊ Повући другу предметницу до капљице крви. Након контакта крв ће се раширити дуж ивице друе предметнице.
- ◊ Повући глатким покретом другу предметниц и направити танак размаз.
- ◊ Оставите да се крв осуши на ваздуху.
- ◊ Крвни размаз се може прегледати директно или обојити пре прегледа.

Крвни размаз се најчешће боји по Гимзи или Diff-Quik® методом и затим посматра на микроскопу на увећању 1000 х за бактеријске штапиће, еритроцитна инклузиона тела (EIB), вирусне еритроцитне цитоплазматске инклузије (VEN), некробиотска тела (IHNV), еритробластозу или друге абнормалности крвних ћелија.

Табела 7. Нормалне вредности хематолошких и биохемијских параметара крви и крвне плазме (пл.) шарана.

Хематолошки параметри	Опсег варирања	SI јединице
Аминотрансферазе (AST)-пл.	0.20–1.50	$\mu cat.1^{-1}$
Аминотрансферазе (ALT)-пл.	0.05–0.32	$\mu cat.1^{-1}$
Амониак -пл.	200–800	$\mu mol.1^{-1}$
Укупни протеини (TP)-пл.	20–40	$g.1^{-1}$
Еритровити (Er,RBC)	1.1–1.8	$T.1^{-1}$
Глукоза - пл.	3–10	$mmol.1^{-1}$
Глутамат дехидрогеназа (CDH) - пл.	0.35–0.75	$\mu cat.\ 1^{-1}$
Хематокрит (Hk, PCV)	0.28–0.40	$l.1^{-1}$
Хемоглобин (Hb)	60–100	$g.1^{-1}$
Просечна количина хемоглобина у еритроциту(MCH)	50–60	pg
Холестерол - пл.	1.5–12	$mmol.1^{-1}$
Млечна киселина (лактати) - pl.	0.7–2.2	$mmol.1^{-1}$.
Лактат дехидрогеназа, (LDH) - пл.	3.5–9.5	$\mu cat.1^{-1}$
Леукоцити (Leuco)	10–80	$G.1^{-1}$
Леукограм:		
- лимфоцити	76–97.5	%
- моноцити	3–5	%
- неутрофили	2–10	%
- еозинофили	0–1	%
- базофили	0–0.5	%
Леукокрит (LK, BC)	0.002–0.01	1.1^{-1}
Укупне масти (TL) - пл.	2–10	$g.1^{-1}$
Уреа - пл.	1–3	$mmol.1^{-1}$
Просечан волумен еритроцита (MCV)	200–300	fl
Просечна концентрација хемоглобина(MCHC)	0.20–0.26	1.1^{-1}
Триациглицероли - пл.	1–4	$mmol1.1^{-1}$

5.2. Узимање узорака за паразитологију

Нативни препарат за преглед на присуство паразита узима се према следећем поступку.

Поступак:

- ◊ Потребно је припремити предметнице са капљицом воде.
- ◊ Тупом страном скалпела састругати промењене делове и ставити узорак у кап воде на предметници и покрити покровницом.
- ◊ Уколико су присутна упална подручја и чиреви потребно је припремити размазе са граничног подручја помоћу стерилне езе или скалпела.

◊ Шкржни лукови или неколико шкржних листића се поставе на предметницу и посматрају на присуство гљивица, паразита, бактерија и промена у структури.

Уколико се узорци за паразитологију узимају ради идентификације врсте паразита који је детектован током обдукције онда се узорци сакупе и чувају у 70% етанолу ради фиксације, а након тога се просветљавају у млечној киселини ради морфолошке детерминације.

За молекуларну дијагостику паразита узорци се замрзавају или се чувају у 96% етанолу. Уколико је неопгодно урадити патохистологију код паразитских инфекција, узорци се најчешће чувају у 10% раствору формалина или Бујоновом раствору.

5.3. Узимање узорака за хистопатологију

Хистолошке узорке ткива риба треба фиксирати у Бујоновом раствору, 10% пуферизованом формалину, Давидсоновом или Пефер фиксативу. Ткива треба фиксирати што брже након смри јединке, а најбоље у року од 2 минута од вађења из воде и/или времена смрти. Рибе се брзо аутолизују (посебно шкрге) и само свеже фиксирана ткива вредна су обраде за хистолошку анализу. Запремина фиксатора мора бити најмање 10 пута већа од запремине ткива. Код риба дужих од 6 cm, треба пререзати стомак, одвојити црево на анусу и лагано извући масу унутрашњих органа да би се омогућило продирање фиксатива у телесну шупљину. За веће рибе стаљати само одређене органе у фиксатив. Ткиво се мора сећи оштрим сечивом или маказама - никако цепати јер ова акција ствара артефакте.

5.4. Узимање узорака за бактериологију

Бактериолошке узорке треба узети међу првим како би се смањила могућност контаминације. Ако су присутне отворене ране или лезије, са ових подручја треба узети брис. Са унутрашњих органа, нарочито јетре и бубрега узима се брис водећи рачуна о стерилности. Записати број узорка и датум на епрувету или плочу. Бројеви узорка могу бити било која логичка група слова и бројева по редоследу. Епрувете треба чувати на хладном месту (15-20°C). Избор медијума за култивацију зависи од сумње на одгрђену патогену бактерију.

5.5. Узимање узорака за вирусологију

Узорци за анализу ланчане реакције полимеразе (PCR) узимају се од свих узоркованих риба. Најчешће се узима такозвани „pool“ узорак који садржи делове шкрга, јетре, слезине, бубрега и мозга, од сваке рибе. Узорак се чува у епрувети за микрофугирање у транспортном медију или РНК/ДНК конзервансу доказане ефикасности и након тога иде на хомогенизацију. Ткиво од највише пет риба може се сакупити у једној епрувети са транспортним раствором и представљаће један збирни узорак. Тежина ткива у једном узорку треба да буде најмање 0,5 g.

Ткива за вирусолошко испитивање на ћелијској култури узимају се од свих узоркованих риба. Комади јетре, предњег или средњег бубрега, срца и слезине се уклањају из рибе помоћу стерилног инструмента и пребацују у пластичне епрувете које садрже 9 ml медијума за транспорт. Ткива од до пет риба могу се сакупити у једну епрувету која садржи транспортни раствор и представљати један збирни узорак. Тежина ткива у једном узорку је 1,0 ± 0,5 g.

За PCR анализу сачуваних ткива екстракција нуклеинске киселине мора се извршити у следећим временским оквирима у зависности од температуре на којој се узорци чувају:

- ◊ узорци чувани на 37 °C: 1 дан;
- ◊ узорци чувани на 25 °C: 1 недеља;
- ◊ узорци чувани на 4 °C: 1 месец;
- ◊ узорци чувани на – 20 °C: неколико месеци и
- ◊ узорци чувани на – 80 °C: неколико година.

Вирусолошки преглед на ћелијској култури треба започети што је пре могуће, а најкасније 48 сати након узимања узорака. У изузетним случајевима, вирусолошко испитивање се може започети најкасније у року од 72 сата након узимања материјала, под условом да је материјал који се испитује заштићен транспортним медијумом и да се могу испунити температурни захтеви.

5.6. Радни задатак – узимање материјала за даље анализе

Питања:

1. Који антикоагуланси се користе при узимању крви код риба и шта су им недостаци?

   _____

   _____

   _____

2. Зашто се крв код риба узима шприцевима мале запремине 1-3 ml?_____

   _____

3. Када се узимају узорци за идентификацију паразита стављају се у (заокружи тачан одговор)?

   1. 70% етанол
   2. 10% формалин
   3. Транспортни медијум

4. У ком временском року након вађења из воде и/или времена смрти рибе треба узети узорак и фиксирати га за патохистологију?

   _____

5. Зашто се узорци за бактериологију морају узети у кратком временском периоду након смрти рибе?

   _____

   _____

6. „Pool“ узорак за вирусологију садржи следеће органе рибе (заокружи тачне одговоре)?

   1. Јетру
   2. Рибљи мехур
   3. Бубреге
   4. Шкрге
   5. Гонаде

6.0. ДИЈАГНОСТИКА ПАРАЗИТСКИХ БОЛЕСТИ

Ако је могуће, увек прегледајте живе или свеже убијене рибе. Ово је нарочито важно за дијагностику многих протозоа које се не могу лако видети у замрзнутим или рибама на леду. Ако су потребни хистолошки препарати, ткива се увек морају узимати од свеже убијених примерака. Ако није могуће одмах прегледати свеже усмрћене рибе, узорке треба чувати у 4% раствору формола или дубоко замрзнути иако ова друга метода може уништити неке хелминте, нарочито Monogenea метиље.

6.1. Преглед рибе на присуство паразита

Поступак:

- ◊ Узети узорак са коже лагном скарификацијом, поставити га на предметно сакло и на њега ставити капљицу воде или физиолошког раствора и испитати да ли има протозоа и/или метиља. Прегледати спољне површине рибе укључујући букалну и оперкуларну шупљину на веће паразите.
- ◊ Уклонити шкрге и прегледти их појединачно под водом.
- ◊ Уклонити очи и отворити их под водом. Испитати сочиво и мрежњачу.
- ◊ Прегледати телесну шупљину. Узети кап или две крви из срца и прегледати на плочици, након прављења крвног размаза.
- ◊ Уклонити црева и јетру. Уклонити жучну кесу и прегледати садржај на плочици. Сецирати јетру и направити нативне препарате, по пореби и патохистолошке.
- ◊ Испитати спољашњост црева и исећи их на делове. Отворити цело црево, или сваки део, са задњег краја, под водом и испитати да ли постоје паразити *in situ*. Извадити садржај црева и прегледати.
- ◊ Сецирати гонаде и направити нативне препарате.
- ◊ Отворити рибљи мехур и прегледати садржај, а такође испитати зид рибљег мехура.
- ◊ Отворити мокраћну бешику и прегледајти садржај на плочици. Отворити бешику под водом и прегледати.
- ◊ Сецирати бубрег и направити нативне препарате.
- ◊ Испитати мускулатуру и направити препарате за детекцију протозоа ако постоји сумња. Нарезати мускулатуру танко. Посебна методе за откривање ларви хелминта у мишићима је вештачка дигестија.
- ◊ Извадити мозак и прегледати га, направити нативне препарате.

Током дисекције рибе, треба користити микроскоп кад год је то могуће. Посебну пажњу треба обратити на необичне цисте или друге абнормалности. Једном када се пронађе паразит, често је корисно посматрати га, по могућности живог. У овој фази се често може извршити идентификација. Споре *Myxobolus cerebralis* се демонстрирају сецкањем или стругањем хрскавице са главе сумњиве рибе и микроскопским испитивањем препарата.

Миксоспоридије се најбоље могу наћи прегледом мокрих брисева из жучне кесе, мокраћне бешике, уретера и бубрежних тубула. Скоро све хистозоик миксоспоридије, осим *Myxobolus cerebralis* и *M. encephalicus*, налазе се у цистама које се могу видети голим оком или на увећању од 10× под микроскопом. Одсуство или присуство гликогених вакуола је често важно за идентификацију миксоспоридија. Полисахаридне резерве које се у спороплазми налазе у облику капљица гликогена или јодофилних вакуола могу се приказати додавањем капљице паразитолошког јода или Луголовог раствора (1 g кристла јода и 2 g калијум јодида у 100 ml воде) на препарат, након чега се гликогенске вакуоле лако детектују (Слика 19). Неке јодофилне вакуоле преживљавају складиштење, док друге не. Уколико се споре налазе ван домаћина дуже од неколико дана долази до трошења резерви или ресорпције јодофилних вакуола те оне више не могу бити детектоване.

Топографија површине спора најбоље се види помоћу скенирајуће електрон микроскопије. Поред морфологије и величине спора и поларне капсуле, некада је потребно детектовати и дебљину и облик валвуле, број намотаја поларних филамената, величину трофозоита, и морфологију споробласта.

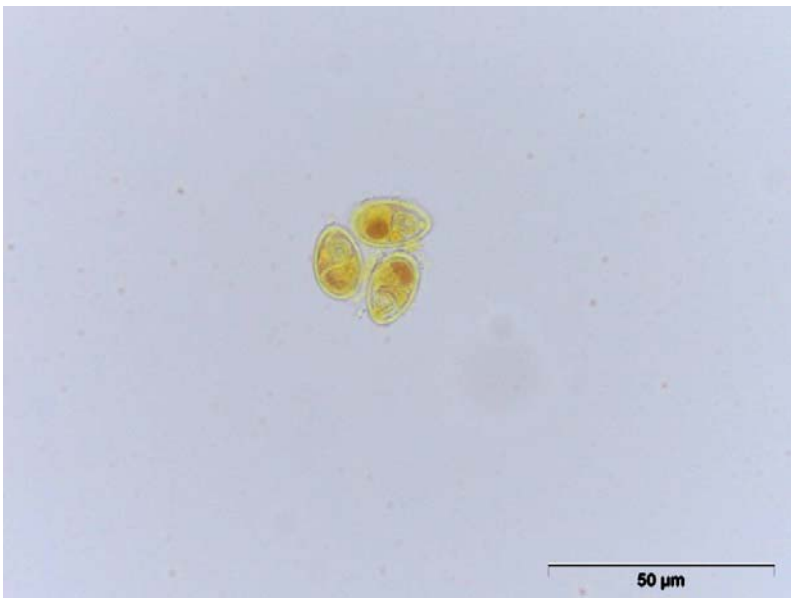
Диференцијално бојење размаза ткива врши се Gimzom, тако што се препарат фиксира са 5 % метилалкохола, при чему раствор Gimze износи 1:17. Вода за разређење се пуферише са 0,25 g KH_2PO_4 и 1,7 g Na_2HPO_4.

За разликовање капсула и једара, размази препарата фиксирају се неколико минута по Carnoy и боје по May-Grinvaldu.

Паразитолошки јод

- ◊ Калијум јодид10 g
- ◊ Јод 5 g
- ◊ H_2O 100 ml

Растворити јод у малој количини воде, затим додати калијум јодид пре остатка воде.

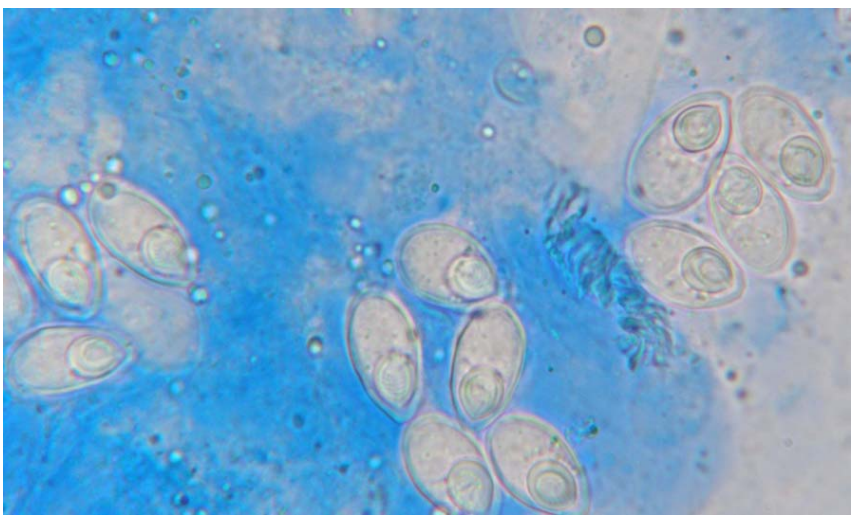


Слика 19. Споре изоловане из плазмодијума са крљушти шарана и обојене луголовим раствором ради диференцијације јодофилних вакуола.

Специјалне технике за карактеризацију спора

Да би се поларни филаменти спора миксоспоридија комплетно екструдоавали неопходно је на споре капнути капљицу засићеног воденог раствора уреe ($CO(NH_2)_2$). Након тога долази до изласка филамената за око 30 секунди.

За детекцију мукозног омотача око спора додаје се капљица туша на суспензију спора. Капљиве туша не продиру у мукозни омотач те долази до појаве светла наспрам тамне позадине која се обоји тушем (Слика 20).



Слика 20. Бојање тушем и изглед спора које су необојене, у односу на обојену позадину, са детекцијом капсуле спора.

Након изолације, узорак се може фиксирати. Паразити из група Platyhelminthes и Acanthocephala пре фиксирања, могу и да се ослободе у води. Ово је посебно корисно код Acanthocephala, где је битно да је пробоскис потпуно проширен пре фиксације, како би се могла извршити специфична идентификација. Platyhelminthes и Acanthocephala могу бити фиксирани у врућем неутралном физиолошком раствору формола (4%). После 24 сата могу да се оперу у дестилованој води (током сличног временског периода) и затим се чувају у 70% алкохолу. Нематоде и рачиће треба фиксирати у врућем 70% алкохолу и затим чувати у истом медијуму. Следећи фиксативи се рутински користе за различите групе паразита (Табела 8):

Табела 8. Фиксативи који се најчешће користе у паразиитологији.

	Фиксатив	Разеђивач
Протозое	Формол (сирћетна киселина)	
	Бујонов раствор	Глицерин
	Carnoy	
	Schaudinn –ов фиксатив	
	Бојање по Heidenhain-у; Delafield – ов хематоксилин за диференцијацију нуклеуса; различите методе импрегнације сребром	
Хелминти	Формол (физиолошки раствор)	Уље каранфилића
	Бујонов раствор	Лактофенол
	Zenker-ов раствор формола (физиолошки раствор)	Метил бензоат
Нематоде	70% алкохол (врућ)	
	Глацијална сирћетна киселина (10 минута) са складиштењем у 70% алкохол	
	4% формол (физиолошки раствор)	Лактофенол 70% алкохол / глицерин за фиксативе 1 и 2
Crustacea	70% алкохол	Berlese-ев флуид
		Глицерин

6.2. Паразитолошке технике и формуле:

БОЈЕЊЕ *PLATYHELMINTHES* ПАРАТЗИТА:

Ерлихов хематоксилин

- ◊ Одлити воду.
- ◊ Обојити паразите у разблаженом Ерлиховом хематоксилину са дестилованом водом (за већину намена, четири капљице боје у Петри суду са дестилованом водом су довољне).
- ◊ По потреби оставити преко ноћи да се обоји.
- ◊ Испрати у води.
- ◊ Дехидрирати паразите у 70% алкохолу.
- ◊ Диференцирати у 0,1% HCl у 70% алкохолу.
- ◊ У алкални алкохол додати „плаво“ (кап амонијака у 70% алкохол).
- ◊ Дехидрирати, очистити и ставити у балзам.

Целестин плаво-Б

Растворити 2 g гвожђе амонијум сулфата у 100 ml хладне дестиловане воде. Додати 2 ml концентроване сумпорне киселине. Пустити да проври и додати 1 g Целестин плаво - Б. Кувати неколико минута. Охладити и додати 10 ml апсолутног метил алкохола и 10 ml глицерина. Carnoy и Бујон-ови фиксативи нису препоручени.

- ◊ Одлити воду.
- ◊ Бојити 15 минута до 1 сат у зависности од дебљине материјала.
- ◊ Пребацити у 70% алкохол. Вишак боје нестаје обично после два третмана испирања. Алкохол треба променити онолико често како постаје обезбојен.
- ◊ Дехидрирати, очистити и ставити у балзам.

Gower-ов кармин

Додати 10 g кармина у 100 ml 45% сирћетне киселине и пустити да полако прокључа. Охладити и филтрирати. Остатак на филтер папиру је закисељен кармин. Направити раствор за бојење на следећи начин: 1 g закисељеног кармина, 10 g стипсе и 200 ml дестиловане воде, промешати, растворити загревањем и филтрирати. Додати кристал тимола.

- ◊ Одлити воду и боје.
- ◊ Полагано диференцирати са 0,1% HCl у 70% алкохолу току 1 – 12 сати у зависности од величине узорка. Посебно се препоручује за *Platihelmintes* паразите. Боја даје необичну црвену боју са благо плавичастом нијансом.

Метода бојења заснована на присуству полифенол оксидаза: техника катехола

Ако се ћелије које садрже полифенол оксидазу инкубирају са катехолом (DL - O - дифенол) као супстратом, о - кинон ће бити произведен на месту везивања ензима, под условом да је ензим сачуван током фиксације, а овај кинон ће се комбиновати са суседним протеинским молекулима. Као реакција настаће светло смеђа или црвенкасто браон боја. Пожљно је фиксирати паразите у 70% алкохолу током 1-3 дана, али зе са трематоде може користити и 10% формалин.

- ◊ Испрати у води у трајању од 30 минута.
- ◊ Држати у 0,1% катехолу (свеже припремљен) током 60 – 90 минута на температури од 40°C или 4 – 4 1/2 сата на собној температури (око 15 °C).
- ◊ Испрати у води у трајању од 15 минута.
- ◊ Само за утерус – дехидрирати, очистити и балзамовати.

Хајденхајново азанско бојење

Прављење раствора:

- ◊ Додати 0,1% азокармина GX у дестиловану воду. Оставити да прокључа. Када се охлади, филтрирати и додати 1 ml глацијалне сирћетне киселине/100 ml.
- ◊ Додати 5% фосфоволфрамне киселине у дестиловану воду, свеже припремљену. Додати 1 ml анилина у 90% алкохол, 1 l.
- ◊ Додати 1 ml глацијалне сирћетне киселине у 100 ml 96% алкохола.
- ◊ Додати анилин плаво WS 0,5 g; наранџасто G 2,0 g; дестиловане воде 100 ml.
- ◊ Додати 8 ml глацијалне сирћетне киселине. Прокувати. Филтрирати када се охлади. Разблажити са двоструком запремином дестиловане воде.

Метод:

1. Одстраните восак и оставити делове у воду.
2. Обојити у азокармину оком 46 – 60 минута на 56 – 60°C у
3. зачепљеној тегли (30 минута ако је већ топла).
4. Операти у дестилованој води.
5. Диференцирати у анилинском алкохолу под микроскопом (у
6. у овој фази језгра су ружичаста, остали делови сивкасти),
7. Зауставите диференцијацију испирањем анилина у сирћетном
8. алкохолу током 30-60 секунди.
9. Ставити везивно ткиво у 5% фосфоволфрамну киселину током 1-3 сата.
10. Брзо испрати у дестилованој води.
11. Обојити у смеши анилин плаво - наранџасто G мешавини током 1 – 3 сата.
12. Испрати накратко у води.
13. Диференцирати у 96% алкохолу.
14. Проћи кроз апсолутни алкохол, ксилен и балзам.

Троструко бојење по Малорију

Раствор:

◊ Кисели фуксин: 1% у дестилованој води
◊ Фосфомолибдинска киселина: 1% у дестилованој води

Маллоријева боја:

◊ Анилин плаво WA 0,5 g
◊ Наранџасто G 2,0 g
◊ Оксална киселина 2,0 g
◊ Дестилована вода 100 ml

Метод:

1. Ставити делове у воду.
2. Обојити киселим фуксином у трајању од 15 секунди.
3. Испрати у дестилованој води 10 секунди или више ако је потребно.
4. Ставити у фосфомолибдичну киселину на 60 секунди.
5. Испрати дестилованом водом током 10 секунди.
6. Обојити Маллоријевом бојом током 75 секунди. Оцедити и обрисати полеђину плочице.
7. Испрати у дестилованој води током 10 секунди. Оцедити и обрисати.
8. Диференцирати у 90% алкохолу током 10 секунди или више, по потреби.
9. Дехидрирати у апсолутном алкохолу (1) током 10 секунди.
10. Дехидрирати у апсолутном алкохолу (2) током 10 секунди.
11. Очистити у ксилену и ставити базам.

6.3. Практични кључеви за детерминацију протозоа у нативним препаратима

А. Протозое се могу детектовати као макроскопске беличасте агрегације, од ситних тачака до цистастих структура величине неколико mm или чак cm. На кожи, или шкргама, или на унутрашњим органима или у њиховом ткиву. Њихова детерминација је могућа само употребом сложеног микроскопа.

А.1. Протозое видљиве као ситне тачке на површини тела и шкргама. Под микроскопом се показује да је тачка једна или неколико великих (до 1 mm) споро ротирајућих ћелија, равномерно прекривених синхроно померајућим цилијама. Поред великих, могу бити и мале различите величине. Њихова цитоплазма је пуна гранула и садржи велики централни макронуклеус ..... **Цилијати из рода *Ichthiophthirius* (слатководне рибе) *Cryptocarion* (морске рибе).**

А.2. Структуре налик тачкама, чворовима или цистама се састоје од масе малих, једноличних, рефрактилних тела .....**(споре или ооцисте).**

А.2.а Споре, типичне величине 7–20 μm, најчешће имају 2 (неки родови поседују 1, 4, 5, 6 или 7) рефрактилна тела (поларне капсуле) на свом предњем полу .... ***Miyxosporea.***

А.2.б Споре, типичне величине 3-10 μm, обично су елипсоидне или јајолике и имају слабо видљиву вакуолу на свом задњем крају ..... ***Microsporidia.***

А.2.ц Споре, типичне величине 3–7 μm, сферичне су и садрже велику централно лоцирану глобуларну рефрактилну инклузију ..... ***Dermociystidium***.

А.2.д Протозое су сферична или елипсоидна тела величине око 10–20 μm, од којих свако садржи четири елипсоидна тела од којих свако садржи 2 витке ћелије. Белкасти чворићи унутар телесних органа, нарочито црева, нису оштро ограничени ..... **Ооцисте кокцидија.**

Б. Протозое које се могу открити само под микроскопом.

Б.1. Протозое које инфицирају површину (кожу, пераја, носне јаме или шкрге).

Б.1.а Протозое које се крећу.

Б.1.а.1 Ћелије величине до 15 μm, које поседују 2 флагеле, крећу се трзавим, пузајућим покретима или пливају спирално напред .... **флагелати (*Cryptobia, Ichthyobodo*).**

Б.1.а.2 Ћелије од 20 μm и веће, прекривене уједначено са цилијама или са само неколико цилијарних појасева или кружних цилијарних венаца. Крећу се директно напред, клизе по површини или се котрљају на лицу места ..... **Цилијати.**

Б.1.а.3 Ћелије са амебоидним кретањем и променом облика тела (величине око 20 μm) ..... **Амебе.**

Б.1.б Сесилне или непокретне протозое причвршћене за површину.

Б.1.б.1 Мале провидне, пириформне ћелије величине не веће од 15 μm ..... **Прикачени *Ichthyobodo*.**

Б.1.б.2 Пириформне или врећасте ћелије, величине 30–300 μm, њихова цитоплазма је жућкаста или зеленкаста и садрже много рефрактилних гранула ..... **Паразитски динофлагелати**.

Б.1.б.3 Заобљене ћелије величине 40–60 μm, са редовима цилија; са провидним цистичним омотачем ..... **Енцистирани цилиати (нпр. *Amphileptus*).**

Б.1.б.4 Ћелије величине 40–100 μm, са тамном цитоплазмом због рефрактилних гранула, и са сноповима тубула, са крајевима у облику квржица који вире из њихове површине .... **Сукториан цилијати.**

Б.1.б.5 Пехарасте или цилиндричне ћелије дужине око 40–90 μm, свака са широким слободним крајем окруженим венцима од испрекиданих цилија. Ћелије се могу мало скупљати ..... **Сесилне перитрихе.**

Б.1.б.6 Протозое величине 40–60 μm, скривене у валвулама, које често имају украсни површински механизам .... ***Thecate amebae***.

Б.2. Протозое које инфицирају лумен црева и/или ткиво цревног зида.

Б.2.а *Myxosporea* (видети А.2.а); Микроспоридије (видети А.2.б); ооцисте кокцидија (видети А.2.д), које су по правилу обложене аморфном масом жућкасте материје (жуто тело); или амебе ..... **(видети Б.1.а.3).**

Б.2.б Ћелије величине до 15 μm, са до 8 флагела, које се крећу трзавим покретима или пливају директно напред .... **Флагелати.**

Б.2.ц Ћелије у облику вретена, величине око 30–140 μm, равномерно прекривене цилијама, са оба краја зашиљених и спорог кретања ..... ***Protoopalina.***

Б.2.д Трепљасте ћелије другог облика, дужине до око 120 μm ..... **Цилијати.**

Б.3. Протозое које инфицирају уринарни тракт (од бубрежних тубула бубрега до мокраћне бешике).

Б.3.а Плазмодијалне ћелије, величине 10 μm - 5 mm, са различитим ћелијским инклузијама и површинским израслинама. ..... **Трофозоити миксоспоридија, углавном са спорама (видети А.2.а).**

Б.3.б Микроспоридија (видети А.2.б)

Б.3.ц Покретне ћелије величине 40–120 μm, са цилијарним венцима ..... **Ендокоменсалне триходине.**

Б.4. Протозое које инфицирају жучну кесу миксоспоре (видети Б.3.А) и микроспоридијом (видети А.2.б)

Б.5. Протозое које инфицирају сва ткива рибљег тела ..... **Микроспоридије (видети А.2.б) Миксоспоре (видети Б.3.а), или кокцидије (видети А.2.д).**

Б.6. Протозое које инфицирају крв.

Б.6.а Витке ћелије, типично дуге 10–15 μm, које се крећу вијугавим или таласастим покретима, са 1 или 2 флагеле .... **Кинетопластидни флагелати.**

Б.6.б Ћелије величине око 3–15 μm, амебоидног облика, које показују покрете трзања на лицу места ..... **Фазе развоја неких миксоспоридија.**

6.4. Радни задатак – дијагностика паразитских болести

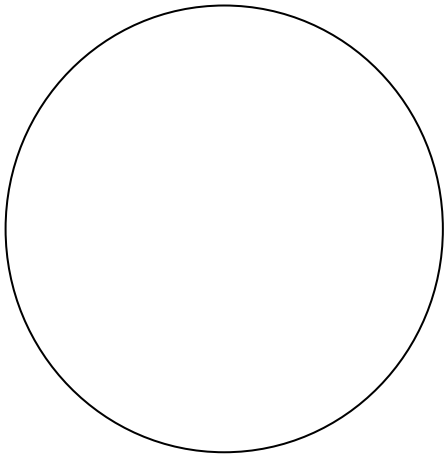
Питања:

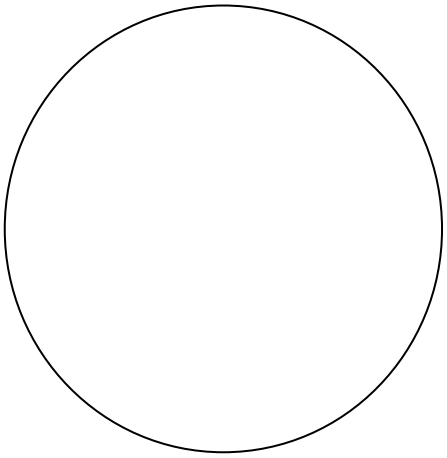
1. Како прегледати кожу и шкге рибе на присуство паразита?
   _____
   _____
   _____
   _____

2. Које бојање се користи за детекцију гликогенских вакуола код спора миксоспоридија и како се изводи?_____
   _____
   _____
   _____

   Радни задатак

   Уради нативни паразитолошки преглед рибе и нацртај изглед детектованих паразита?





   На основу морфолошких карактеристика паразита, адекватних кључева и места налаза, изврши идентификацију? _____
   _____
   _____

7.0. ДИЈАГНОСТИКА БАКТЕРИЈСКИХ БОЛЕСТИ

Већина бактерија повезаних са болестима риба су природни сапрофитни организми, широко распрострањени у воденој средини. Релативно мали број врста је класификован као прави облигаторни патоген. Обе групе организама могу бити присутне на спољашњој површини тела или у ткивима наизглед здравих риба и њихова патогена улога ће се манифестовати само као последица стреса.

Рибе које се шаљу на бактериолошко испитивање спадају у две категорије (оболеле рибе и здраве рибе), мада линија поделе није увек очигледна. Ако се клинички оболела риба подвргне бактеријском прегледу, напор се усмерава или на откривање узрочника у спољашњим лезијама као што су промене на кожи, промене на шкргама и тако даље, или на преглед унутрашњих органа, посебно бубрега, ако постоји сумња на септикемијску болест. Ако треба елиминисати присуство одређене бактерије или се бактериолошки преглед врши из неког другог разлога, такав бактериолошки преглед је углавном усмерен на бубреге и/или друга паренхиматозна ткива.

7.1. Методе испитивања

Влажни препарати

Они су корисни за брзу претпостављену дијагнозу флавобактеријских инфекција, укључујући колумнарис инфекцију, болест хладне воде или бактеријске болести шкрга. *Flavobacterium* spp. се могу видети као дугачки витки штапићи које показују карактеристичну флексибилну покретљивост.

Обојени размази

Обично се користе боје по Граму, Гимзи и Ziehl-Neelsen-у. Иако детекција бактерија у ткивима може бити погодна за претпостављену дијагнозу, у већини случајева је потребна потврда културом, само у случају дијагнозе бактеријске болести бубрега (БКД) код салмонидних риба користе се обојени размази за дијагнозу. Присуство малих, јако Грам-позитивних бацила у брисевима бубрега сматра се довољним за дијагностику инфекције изазване са *Renibacterium salmoninarum*.

Изолација бактерија

У суштини постоје два главна приступа: употреба селективних медија или употреба неселективних медија. Неке лабораторије преферирају селективне, а неке неселективне подлоге. Коришћењем неселективних подлога добија се потпунија слика о бактеријском статусу рибе. Већина бактеријских патогена не захтева посебан медијум за изолацију, а триптон соја агар и крвни агар се сматрају довољним; у неким случајевима можемо користити и друге медије, нпр. ендо агар. Изузетак су миксобактерије, које захтевају релативно низак ниво хранљивих

материја и агара. Cytophaga агар (ANACKER, ORDAL), састављен од (у грам по литру дестиловане воде) триптона 0,5; натријум ацетата 0,2; говеђег екстракта 0,2 и агара 0,9, пружа погодан медијум за изоловање слатководних сојева. *Renibacterium salmoninarum* је изузетно избирљив микроорганизам. За његову изолацију постоји низ модификација ORDAL медијума. Обично се користи медијум KDM-2 по Evelyn-у, који садржи (у g по l дестиловане воде) пептон 10, екстракт квасца 0,5; цистеин HCl 1,0; агар 15,0; допуњен је феталним телећим серумом (10% v/w). *Mycobacrteria* spp. могу бити изоловане на било ком медијуму на бази глицерола или јаја који се обично користи за ову групу организама (нпр. Lowenstein-Jensen медијум, Dorset медијум итд.). Температуре инкубације од 18-23°C се генерално користе за изолацију и може се очекивати да ће се видљиви раст појавити у року од 48 сати у већини култура. *R. salmoninarum* може захтевати 6 недеља, а *Mycobacrteria* 3 недеље.

Миксобактеријске инфекције

Иако се израз *Flavobacteria* обично користи за описивање групе клизајућих бактерија повезаних са бројним болестима риба, сви патогени припадају роду *Flavobacterium*. Ови микрорганизми се могу препознати по карактеристичним жутим колонијама које се шире и клизећим покретима на подлогама са мало хранљивих материја (ANACKER, ORDAL). Даља идентификација је ретко потребна јер би биле потребне посебне бактериолошке технике. *Flavobacterium columnare* је патоген само на температурама воде изнад 15°C. *Flavobacterium psychrophila* изазива болест на температурама испод 12°C.

Аеромонас инфекције

Аеромонас инфекције слатководних риба се у суштини могу поделити на оне изазване покретним врстама (инфекције покретним аеромонадама) и оне које изазивају непокретне врсте (фурункулоза пастрмки, еритродерматитис шарана).

Карактеристике рода

Бактеријске ћелије су равне, штапићастог облика са заобљеним крајевима до кокоидне, Грам-негативне, углавном покретне (Табела 9), само једна врста није покретна (Табела 10). Факултативни анаероби. Метаболизам глукозе код ових бактерија је и респираторни и ферментативан.

Табела 9. Диференцијација између покретних аеромонада.

	A.hydrophila	*A.caviae*	*A.sobria*
Ескулин хидролиза	+	+	-
Раст на KCN подлози	+	+	-
L-histidine, L-arginine	+	+	-
Ферментација:			
Салицин	+	+	-
Суркоза	+	+	+
Манитол	+	+	+
Ацетоин из глукозе	+	-	-
Гас из глукозе	+	-	+
H_2S из цистеина	+	-	+

Оксидаза позитивне. Каталаза позитивне. Отпорне на вибриостатичко средство 0/129. Оптимални температурни опсег 22–28°C.

Табела 10. Диференцијација између непокретних *A. salmonicida.*

	subssp. *hromogenes*	subssp. *achromogenes*
Смеђи пигмент	+	-
Продукција индола	-	+
Ескулин хидролиза	+	-
Раст на KCN подлози	-	-
L-histidine, L-arginine	-	-
Ферментација:		
Суркоза	-	+
Манитол	+	-
Ацетоин из глукозе	-	-
Гас из глукозе	+	-
H_2S из цистеина	-	-

Псеудомонас инфекције

Pseudomonas fluorescens и *Pseudomonas putida* сматрају се случајним патогенима одговорним за бактеријску септикемију риба, која се по правилу не може разликовати од септикемије изазване аеромонасом која се јавља у рибњацима изложеним различитим стресовима.

Карактеристике рода

Равни или благо закривљени шитапићи. Аеробни, са стриктно респираторним типом метаболизма, са кисеоником као терминалним акцептором електрона; у неким случајевима се нитрат може користити као алтернативни акцептор електрона. Позитивне на оксидазу и каталазу (Табела 11). Патогени риба припадају групи rRNA групе I.

Табела 11. Генералне карактеристике бактерија из рода *Pseudomonas.*

	P. aeruginosa	*P. fluorescens*	*P. putida*
Продукција пиоцианина	+	-	-
Продукција пиовердина	+/-	+/-	+
Оксидаза	+	+	+
Леван из глукозе	-	+	-
Желатин ликвефакција	+	+	-
Хидролиза скроба	-	-	-
Лецитиназа	-	+	-
Раст на 4°C	-	+	+
Раст на 41°C	+	-	-
Денитрификација	+	+	-
Аргинин дигидролаза	+	+	+

Edwardsiella tarda и Edwardsiella ictaluri инфекције

Edwardsiella tarda изазива неугодне лезије испуњене гасом у мишићном ткиву каналског сома. *Edwardsiella ictaluri* изазива промене на цревима код сома.

Карактеристике рода

Покретни перитрихо флагелирани штапићи, нису инкапсулирани. Грам негативни, факултативни анаероби. Оксидаза негативни. Каталаза позитивни. Нитрати се не смањују. Ферментација глукозе гасом. H_2S се у великој мери производи на триптозном соја агару, али се могу јавити биотипови који га слабо производе. Производи се индол. Већина сојева не ферментира манитол.

Болест црвених уста (инфекција са Yersinia ruckeri)

Болест црвених уста је економска важна болест за салмониде, присутна у великом броју земаља и код нас.

Карактеристике рода

Равни штапићи до кокобацила. Ендоспоре се не формирају. Грам негативна. Непокретна на 37°C, али покретна са перитрихозним флагелама када се узгаја испод 30°C, осим *Y. pestis* која је увек непокретна. Факултативно анаеробна, има и респираторни и ферментативни тип метаболизма. Оксидаза негативна, каталаза позитивна. Нитрат се редукује у нитрит. Глукоза и други угљени хидрати се ферментишу са производњом киселине, али мало или нимало гаса. Карактеристике фенотипа често зависе од температуре и већи број карактеристика се обично изражава у културама инкубираним на 25–29°C, а не на 35–37°C.

Вибрио инфекције

Vibrio anguillarum је патоген морских риба и јегуља и главни узрочник болести у узгоју риба. Неколико других врста које нису правилно описане су такође патогене за рибе.

Карактеристике рода

Грам негативни равни или закривљени штапићи. Покретни. Не формирају ендоспоре. Хемоорганотропи и факултативни анаероби способни за респираторни и ферментативни метаболизам. Већина је оксидаза позитивна. Сви користе Д-глукозу као једини главни извор угљеника и енергије. Већина врста захтева 2–3 % NaCl или базу морске воде за оптималан раст.

Бактеријска болест бубрега (инфекција R. salmoninarum)

Renibacterium salmoninarum је обавезни патоген подфамилије Salmoninae (лосос и пастрмка) из породице Salmonidae, који производи хроничну инфекцију која се споро развија, коју карактеришу увећани сиво-бели некротични апсцеси првенствено на бубрезима (али не само на њима). Бактерија припада групи регуларних, неспорушућих грам позитивних штапића.

Карактеристике рода

Кратки грам позитивни штапићи. Некапсулирани и непокретни. Ендоспоре се не формирају. Аеробне су. Нема производње киселине из шећера. Каталаза позитивна. Оксидаза негативна. Расте веома споро на 5 и 22°C. Нема раста на 37° C. Цистеин је потребан за раст.

Стрептококне инфекције риба

Мање уобичајена бактеријска болест риба. *Streptococcus faecalis* изолована је из угинуле младе калифорнијске пастрмке. Изазива стрептококну сепсу, праћену егзофталмусом код калифорнијске пастрмке и стрептококне инфекције код каналског сома.

Карактеристике рода

Ћелије сферичне или јајолике, које се јављају у паровима или ланцима када се узгајају на течним медијима. Ендоспоре се не формирају. Грам позитивна. Већина је факултативно анаеробна. Каталаза негативна. Метаболизам је ферментативан. Раст на чврстим подлогама се појачава додавањем крви, серума или глукозе.

Серолошка идентификација је важна за одређивање хемолитичких стрептокока. Ово је метод класификације погодан за употребу код животиња и људи. С друге стране, многим такозваним виридизирајућим и нехемолитичким стрептококама недостају постојећи групни антигени, па их је веома тешко класификовати.

Инфекције микобактеријама риба

Микобактеријске инфекције (микобактериозе) су до сада уочене код више од 150 врста морских и слатководних риба. За њихову изолацију служе подлоге на бази глицерола или јаја, које се најчешће користе за ове групе микроорганизама. Најчешће се изолују *Mycobacterium fortuitum* и *Mycobacterium marinum*. Идентификацију микобактерија најбоље је обавити у специјализованој лабораторији.

Карактеристике рода

Благо закривљени или равни штапићи, може доћи до раста налик мицелијуму, али се при малом поремећају обично фрагментира на штапиће или кокоидне елементе. Неису покретне. Споро расту. Лако видљиве колоније настају за 5 дана до 3 недеље. Температура инкубације за микобактерије риба је 25°C. Идентификација захтева посебне бактериолошке технике.

7.2. Радни задатак – дијагностика бактеријских болести

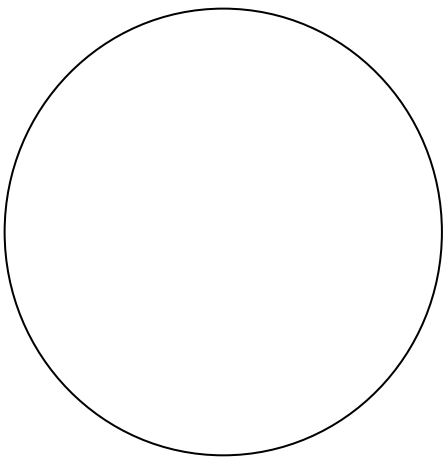
Питања:

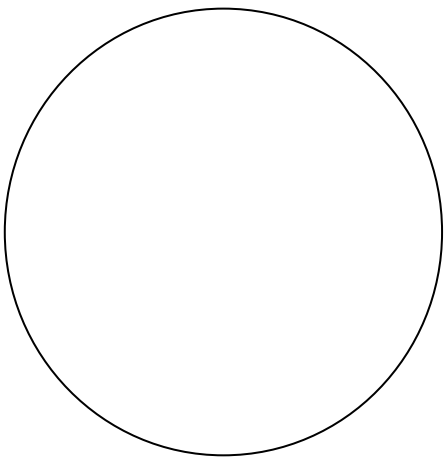
1. Које методе можемо користити за дијагностику бактеријских инфекција риба?
   _____
   _____
   _____
   _____

2. Навести карактеристике бактерија из рода *Aeromonas*?_____
   _____
   _____
   _____

   Радни задатак

   Обојити размаз узорака риба са видљивих промена на предметном стаклу, обојити по Граму и нацртати изглед бактерија?





   На основу морфолошких карактеристика бактерија, изврши идентификацију? _____
   _____
   _____

8.0. ДИЈАГНОСТИКА ВИРУСНИХ БОЛЕСТИ

Дијагностика вирусних болести код риба може се поделити у две велике групе:

- ◊ Основне методе
- ◊ Специјалне методе

Основне методе укључују:

1. клинички преглед
2. пато-анатомски преглед
3. лабораторијски преглед – изолација вируса на ћелијским културама

Специјалне методе укључују:

1. методе имунофлуоресценције (ИФ)
2. имунопероксидазна метода
3. електронска микроскопија
4. ЕЛИСА и др.

Такође, све више коришсте се и молекуларне методе за детекцију вируса (У поглављу Дијагностика болести применом молекуларних техника).

8.1. Узимање узорака рибе за вирусолошки преглед

Риба која ће бити коришћена за вирусолошко испитивање треба да буде жива. Ако су рибе мртве, много су мање шансе да се открију узрочници-вируси. Средства и инструменти за узимање узорака морају бити стерилни. Узимају се узорци од 5-10 риба. Код младунаца величине до 5 cm цело тело прави узорак, мада се, у ствари, чини да је боље уклонити главу и реп одмах иза ануса након дезинфекције површине тела рибе са 70% алкохолом (дезинфекција изразито смањује могућност бактеријске контаминације). Код већих риба телесна шупљина се отвара резовима који почињу око 1 cm пре ануса. Први рез је окомит на бочну линију, а други идедуж вентралне линије телесне шупљине. Тако се ствара преклоп зида тела; држите га пинцетом или хируршком пинцетом, подигните и наставите рез дуж бочне линије и вентралне линије до шкржних лукова. Окрените цео поклопац и изложите органе. Дезинфикујте површину тела помоћу 70% алкохола дуж резова.

Паренхиматозни органи се узимају за даље испитивање, укључујући јетру, слезину, предњи и задњи бубрег. Пилорични наставци са панкреасом се такође узоркују код пастмки. Узоркују се и икра, сперма а понекад и рибљи мехур.

8.2. Изолација вируса на ћелијским културама

Изолација вируса на ћелијским културама је међу основним методама у проучавању и дијагностици вирусних болести риба. У ту сврху је најчешће се користи неколико стабилних ћелијских линија:

- ◊ FMH- ћелијска линија из каудалног дела *Pimephales promelas*
- ◊ RTG-2- ћелијска линија из тестиса калифорнијске пастрмке - *Oncorhynchus mykiss*
- ◊ PG - ћелијска линија из полних жлезда штуке - *Esox lucius*
- ◊ CHSE - ћелијска линија из ембриоланих ћелија лососа- *Oncorhynchus tschawytscha*

Култивација ћелијских линија

Медијуми

Све културе ћелија се култивишуи одржавају на подлози са 10% феталног телећег серума (раст) и са 1% феталног телећег серума (одржавање) (Табела 12).

Табела 12. Састав медијума за раст и одржавање.

Састав:	Медијум за раст	Медијум за одржавање
MEM	90.0 ml	99.0 ml
Фетални телећи серум	10.0 ml	1.0 ml
Натијум хидроген карбонат 7.5 % $NaHCO_3$	1.0 ml (2.0)	1.0 ml (2.0)
Penicillin-калијумова со + streptomycin 500 I.U. +500 mg	1.0 ml	1.0 ml
Amphotericin B	0.1 – 0.2 ml до 0.5 ml	0.1 – 0.2 ml до 0.5 ml

Свака серија феталног телећег серума мора бити тестирана на цитотоксичност. Раствор за складиштење амфотерицина се припрема разблаживањем садржаја једне бочице (50 mg) у 50 ml дестиловане воде.

Медији се замењују ако су испуњени следећи критеријуми:

- ◊ када ћелије произведу компактан монослој: медијум за раст се замењује медијумом за одржавање,
- ◊ када дође до великог смањења pH вредности, процењеног на основу боје медијума,
- ◊ када дође до гљивичне контаминације и Roux боца се не може директно елиминисати.

Ако се ћелијске линије одржавају у термостатима на температурама специфичним за сваку линију, биће довољно заменити медијум након 1 до 10 дана. Након отприлике 30 дана, линије се морају поново трипсинирати.

Трипсинација

За трипсинацију се користи Difco сертификован трипсин 1:250. За употребу се припрема у концентрацији од 0,16% у комбинацији са 0,02% версена у PBS (pH 7.2–7.4).

За раствор трипсина	10.0 %:
Трипсин Difco	10.0 g
Glucose	5.0 g
PBS	до 100 ml

Све се меша у чаши са магнетом 10 минута, користећи соленоидну мешалицу. Затим се смеша центрифугира на 2000–3000 обртаја у минути, супернатант се филтрира и замрзне.

За раствор версена (хелатон 3)	
Натријум хлорид	8.0 g
Калијум хлорид	0.4 g
Натријум хидрогенфосфат Na_2HPO_4	0.06 g
Калијум диходрогенфосфат KH_2PO_4	0.06 g
Дестилована вода	до 1000 ml
Хелатон III	0.2 g

Након растварања, стерилисати раствор у аутоклаву на 1,5 атмосфера током 30 мин. За трипсинацију, увек припремите свеж раствор мешањем 25,0 ml складишног раствора версена - 0,4 ml складишног раствора трипсина.

Поступак трипсинације

Одржавајте раствор за трипсинизацију на 20°C. Након исисавања медијума за раст или медијума за одржавање, употребите раствор MEM са 1% $NaHCO_3$ и антибиотицима (100 I.U. пеницилина и 100 μg стрептомицина у 100 ml медијума за испирање ћелија) да бисте испрали ћелијски раст у Roux боци. После испирања исперите и прекријте ћелијски монослој раствором за трипсинизацију. Оставите ћелије у директном контакту са трипсином 30 до 90 секунди (у зависности од квалитета и типа ћелије) и излијте раствор. Да бисте испратили процес даље „суве“ трипсинације, посматрајте Roux боцу на светлости (раст у њој ће имати млечну боју) или под инверзионим микроскопом (цитоплазматске мембране ће постати различите и ћелије ће се сукцесивно заокружити). Након што сте отресли ћелије са зидова Roux боце тапкањем бочице о руку, ресуспендујте их у 5 ml медијума за раст и олабавите их пажљивим пипетирањем.

Бројање ћелија

За бројање ћелија у суспензији, ставите 1 ml суспензије у епрувету, додајте једну кап 0,5% кристално љубичастог и мешајте 2 мин. Узмите једну кап овог волумена и ставите је у Бургерову ћелију. Бројите само здраве необојене ћелије.

Формула конверзије: број ћелија у 1 великом квадрату (аритметичка средина за 10 квадрата) × 10 000 × количина обојене ћелијске суспензије.

Roux боце за култивацију родитељске линије се обично чувају у количини од 150–250 хиљада ћелија по 1 ml медијума, а Леигхтон или Милер епрувете за инфекцију са тестираним суспензијама су опскрбљене са 300–400 хиљада ћелија по 1 ml. Неопходно је да монослој нарасте по целој површини за 24–72 сата.

Техника култивације ћелијских култура са суспензијом рибљег ткива

1/ Хомогенизујете материјал који се испитује заједно са мало морског песка. Ресуспендујте хомогенат помоћу изотоничног фосфатног пуфера (PBS pH 7,3) или у медијуму за културу без серума (Earle, Eagle MEM-TM SEVAC VI) у односу разблажења 1:10.

Earle раствор у десетострукој концентрацији:	
Натријум хлорид NaCl	68.0 g
Калијум хлорид KCl	4.0 g
Магнезијум сулфат $MgSO_4.7H_2O$	2.04 g
Натријум фостаф $NaH_2PO_4.2H_2O$	1.5 g
Калцијум хлорид $CaCl_2$	2.0 g
Може бити замењен са $CaCl_2.6H_2O$	3.94 g

Додајте калцијум хлорид у раствор када су све горе наведене хемикалије потпуно растворене, или по могућности растворите га посебно у дестилованој води и додајте у раствор. Филтрирајте раствор кроз филтер папир. Додати 2,0 ml хлороформа до целе запремине и чувати раствор на 4°C. Стерилизирати филтрирањем. Аутоклавирајте разблажене радне растворе на 1 атм током 20 мин.

Фосфатни пуфер (PBS), pH 7.2–7.4:	
Натријум хлорид NaCl	9.2 g
Натријум хидрогенфосфат $Na_2HPO_4.12H_2O$	1.2 g
Натријум дихидрогенфосфат $Na_2PO_4.H_2O$	0.115 g
Дестилована вода	До запремине од 1000 ml

2/ Овако припремљену суспензију центрифугирајте (3000 о/мин, 10 мин, 20°C).

3/ Супернатант сипати у епрувету, додати раствор антибиотика (1000 i.j. пеницилина, калијумове соли и 1000 μg стрептомицина). Темељно протресите епрувету. Проверите стерилност на бактериолошким подлогама. После пет минута излагања, разблажите део почетног материјала (10%) десет пута, користећи PBS, да бисте добили коначни однос разблажења од 1:100 у другој епрувети. Припремљене суспензије се могу замрзнути на минус 15°C до минус 25°C и чувати замрзнуте док се не прегледају.

4/ Ставите сваки инокулум разблажен 1:10 и 1:100 (запремина 0,1–0,2 ml по 1 епрувети) у три епрувете са узгојеним културама ћелија старих 24 до 48 h; пре него што то урадите, излијте медијум за раст са 10% феталног телећег серума и

два пута исперите узгојену ћелијску културу из епрувете са медијумом без серума који садржи 1% $NaHCO_3$.

5/ Оставите да апсорпција траје 30-60 минута на 17-22°C.

6/ Након што сте одлили инокулум, употребите медијум без серума са $NaHCO_3$ да бисте испрали епрувете са почетном суспензијом разблаженом 1:10 и 1:100 и покријте ћелијске културе у епруветама са 1–2 ml медијума који садржи 1% фетусни телећи серум.

7/ Држите заражене културе на температури од 15°C 5-6 дана. Прегледајте епрувете сваког дана.

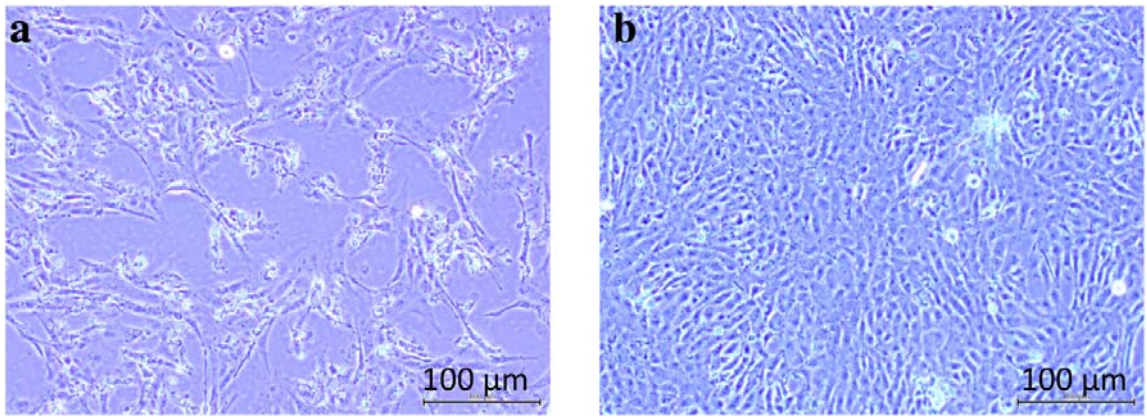
8/ Уколико дође до цитопатског ефекта (ЦПЕ), идентификујте вирус имунофлуоресцентним методама (ИФ), имунопероксидазним тестом ЕЛИСА и др.

9/ Ако се ЦПЕ не појави или ако се ЦПЕ не може безбедно одредити, извршите две узастопне пасаже са обе концентрације након претходног замрзавања и одмрзавања суспензије. Посматрајте током 5-6 дана.

10/ Ако се ЦПЕ појави током периода посматрања, идентификујте вирус методама које бирате између следећих: ИФ, ЕЛИСА, ланчана реакција полимеразе (ПЦР), електронска микроскопија, имунопероксидазни тест и др.

Препознавање цитопатогеног ефекта

Раст вируса производи цитопатогени ефекат код осетљивих ћелијских линија већине вируса риба (Слика 21). Затим се могу наставити тестови идентификације по избору. Међутим, неки споро растући вируси можда неће узроковати ЦПЕ, а скрининг ћијских култура треба да се изврши помоћу хемадсорпцијеса хемаглутинирајућим еритроцитима или имунофлуоресцентним бојењем за вирусне антигене.



Слика 21. Цитопатогени ефекат бирнавируса на BF-2 ћелијској линији. а) 2 дана након инфекције ћелија инокулисаних суспензијом органа случаја писутан је ЦПЕ као што је заокруживање и одвајање од површине; б) неинфицирани монослој ћелија BF -2 није показао евидентан ЦПЕ (Chen *et al.* 2019.)

8.3. Електронска микроскопија

Предности употребе електронске микроскопије су да се може користити када постоји потреба за брзом пробном детекцијом вируса из изолата на ћелијским културама и за класификацију вируса у различите групе вируса.

Метода негативног бојења

Успешна је при концентрацији вируса од око 1,105 TCID у инфицираној ћелијској култури. Поступак:

- ◊ Центрифугирајте 0,5–0,1 ml медијума за култивацију из инфициране ћелијске културе на 1000 обртаја у минути током10 минута.
- ◊ Нанети кап супернатанта на екран електронског микроскопа, унапред премазан филмом формвар.
- ◊ Након неколико секунди усисајте капљицу филтер папиром и нанесите средство за бојење (2 % амонијум молибдат) на екран. Усисајте средство за бојење и прегледајте екран испод ЕМ.

Метода ултратанких резова

Није погодна за брзо откривање, али пружа савршен материјал за документацију:

- ◊ Сипати медијум за култивацију са инфициране ћелијске културе, фиксирати културу слојем од 3% глутаралдехида у PBS (pH 7,2) током 1 сата.
- ◊ Састружите ћелије са стакла, центрифугирајте их и фиксирајте са 1% OsO_4.
- ◊ Дехидрирајте ћелије у ацетону у опадајућем низу од 100 %, 90 %, 60 %, 30 % у трајању од 30 минута до 1 сата (у зависности од величине пелета). Енкастирајте ћелије у Durkupan ACM. Контрастирајте ултратанке резове помоћу раствора уранил ацетата и цитрата.

Метода имунолошке електронске микроскопије

Ова метода је веће осетљивости од методе негативног бојења.

Деактивирајте одговарајући хиперимуни зечји серум на 56°C 30 минута пре употребе и разблажите га у PBS-у 1:20, 1:40, 1:80, 1:100, 1:400. Помешајте свако од ових разблажења са истом запремином узорка који се испитује и инкубирајте смешу на 37°C 1-1,5 сати. Након инкубације, нанети кап узорка на екран електронског микроскопа који је унапред обложен филмом формвар. Уклоните кап узорка помоћу филтер папира након неколико секунди и нанесите кап средства за бојење (2% амонијум молибдата) на екран. Скините средство за бојење и испитајте узорак под ЕМ: процените присуство и величину кластера вируса (имунокомплекса).

8.4. Радни задатак – дијагностика вирусних болести

Питања:

1. Које су основне методе дијагностике вирусних болести?

   _____

   _____

2. Које су специјалне методе дијагностике вирусних болести?

   _____

   _____

   _____

3. Најчешће коришћене ћелијске линије за културу су (заокружи тачне одговоре)?

   1. CHSE
   2. AB
   3. PG

4. Шта је то цитопатогени ефекат и како изгледају ћелије захваћене вирусом?

   _____

   _____

   _____

5. Које методе се користе за потврду ЦПЕ (заокружи тачне одговоре)?

   1. Имунофлуоресценција
   2. Електрон микроскопија
   3. Аглутинација
   4. Преципитација

9.0. ДИЈАГНОСТИКА ГЉИВИЧНИХ БОЛЕСТИ

Плесни, које изазивају микозе, су микроскопски организми који производе филаментозне творевине на различитим супстратима. У основи, плесни су хетеротропни организми који нутритивно зависе од органског супстрата. Класификовани су као посебан филум, Mycota, талоидне биљаке (Thallophyta).

Још увек је широко распрострањено мишљење да је зараза риба гљивицама углавном секундарни проблем. Међутим, постоје докази да гљивице могу утицати на здраву рибу у одређеним околностима. Са становишта рибопатолога, постоје микозе које ометају функцију органа и убијају рибу, а такође и микозе које сукцесивно лишавају природну снагу рибљем организму, доводећи га у кахектично стање.

Одређивање плесни и филаментозних гљивица које паразитирају на рибама:

9.1. Методе изолације

Миколошки преглед је саставни део комплекса прегледа здравља риба и ради се мање више истовремено са бактериолошким прегледом. Полупаразитске и паразитске гљиве се добијају свеже од домаћина узимањем инокулума из сумњивог ткива на агар медијуму, коришћењем загрејане и охлађене езе. Ако је мицелијум присутан у ткиву, узорак се може површински дезинфиковати како би се спречила секундарна контаминација спорама у ваздуху. Дезинфекција се врши потапањем у 1% формалдехид у трајању од 1 до 5 минута. Затим се узорак пребацује у 70% алкохол и на крају у стерилну воду у којој се добро испере. Када се изолује стварна врста, такође је могуће држати узорак под брзим млазом воде да би се испрала секундарна инфекција.

9.2. Методе узгоја

Култивација

Сврха култивације је добијање чистих култура за проучавање морфологије гљивица, њихове варијабилности и услова раста, као и за испитивање целокупне онтогенезе. Узгој се обично врши на синтетичким агар подлогама. Узгајањем, појединачним гљивичним ћелијама се омогућава да произведе своје потомство које се онда сматра култивисаним сојем. Разлике између сојева исте врсте су физиолошке (нпр. производња ензима или токсина), а могу бити и морфолошке (нпр. различита боје, изглед гљивичног раста итд.). На медијуму за култивацију, сој ствара колоније моноспора или мултиспоре које се спајају и формирају израслину. Колонија се састоји од површинског и супстратног мицелијума и ови облици се могу разликовати на различитим супстратима.

б) Медији за култивацију

Поред уобичајених подлога за бактеријску културу као што је крвни агар и др., рибље гљиве се такође могу узгајати на подлогама природних супстрата. Од њих један од најчешће коришћених је агар од слаткоg сирупа (1000 ml слирупа разблажен до половине концентрације, 20 g агара). Од синтетичких подлога користе се Сабоурауд-ов агар (40 g глукозе, 10 g пептона, 1000 ml дестиловане воде, 15 g агара), Сабоурауд-ов конзервирајући агар за збирне културе (30 g пептона, 1000 ml дестиловане воде, 20 g агара) или Czapek агар (3 g $NaNO_3$, 1 g KH_2PO_4, 0.5 g KCl, 0.5 g $MgSO_4$.7H2O, 0.01 g $FeSO_4$.7H_2O, 30 g сахарозе, 15 g агара, 1000 ml дестиловане воде). Ови медијуми су погодни за морфолошко проучавање мицелијума и органа спорулације. Медији са ниским садржајем хранљивих материја су погодни за одржавање сојева у сакупљаним културама.

Инокулација

У просторијама у којима се врши инокулација мора се одржавати савршена чистоћа. Сто на коме се ради треба обрисати крпом натопљеном дезинфекционим средством; 4% формалдехида или 3% хлорамина са детерџентом треба користити када се посао заврши (пожељно пре напуштања лабораторије). Када се Петријеве посуде отварају, поклопце треба пажљиво подићи. Мале посуде (епрувете) се отварају по потреби само на кратко, грла посуда треба загрејати пре и после преношења инокулума, а чепове од вате испећи на површину. Праве или савијене езе користе се за реинокулацију плесни и филаментозних гљивица. Споре се морају пренети заједно са мицелијумом да би се избегла стерилност соја. Инокулисане епрувете и Петријеве посуде стављају се у термостат на собној температури.

Очување култура

Да бисте континуирано одржавале културе гљива, реинокулирајте их два или три пута годишње. Врсте које брзо расту требају реинокулацију сваки други месец, друге једном у 4-6 месеци. Ниске температуре (4–10°C) успоравају раст и омогућавају културама да преживе до годину дана без поновне инокулације. Гљиве које обилно спорулирају се реинокулишу преношењем спора помоћу езе. У случају гљивица са лошом спорулацијом, делови културе се преносе са агаром. За ову сврху су погодне савијене инокулационе игле од дебеле жице.

3) Методе припреме

Плесни и филаментозне гљивица прво треба евалуирати са аспекта њихову навиких општих карактеристика прегледом под бинокуларним смикроскопом или микроскопом са малим увећањем најбоље са фазним контрастом. Препарати који служе за детаљно проучавање могу бити изворни, полутрајни или трајни.

а) Нативни препарати се испитују у капи воде. Боје се или воденим раствором неутралне црвене (разблажење 0,01 %) или метилен плаве (0,01 %). Ове боје боје плазму. За бојење ћелијског зида користе се водени раствор крезил плавог или раствор конго црвене у амонијаку (3 g конго црвене на 100 ml H_2O плус додатак од 2 ml амонијака).

б) За бољу бистрину користе се хлоралхидрат, лактофенол или лактофуксин. Лактофенол је најбољи: додаје му се метиленско плаво да појача боју, а део мицелијума са органима за размножавање се преноси у то помоћу езе. Овако обрађен препарат прекрива се микро покривним стаклом и пажљиво се загрева на умереној ватри да изађе мехур ваздуха; при томе се пажљиво компресује. Састав лактофенола: чисти кристални фенол 20 g, млечна киселина 20 g, глицерол 40 g, дестилована вода 20 g. Препарат се чува у смеђем суду.

ц) Глицерол желатин се користи за трајне препарате: дестилована вода 42 ml, глицерол 30 ml, желатин 7 g, фенол 1 g. За уоквиривање се може користити ацетонски лак или синтетички лак. Погодан је и DuNoyer-ов цемент (загревати 20 g анхидрованог ланолина на пешчаном купатилу 30 мин, а затим наставити загревање уз мешање ланолина са 80 g розина који се додаје у грудвицама). За наношење цемента може се користити дебела жица савијена у троугао: жица загрејана на високој температури полаже се на површину цемента који се топи и лако се наноси на ивице покривног стакла.

Oomycetosis

Инфекције које изазивају гљивице класе Oomycetes спадају међу најпознатије и најраспрострањеније микозе риба. Карактеристична особина по којој се Oomycetes разликују од других класа гљива је присуство покретних спора (зооспора) са две флагеле (пернате и глатке), које се развијају у зооспорангијама. У великом делу Oomycetes ово је главни начин несексуалне репродукције; други начини су преко хламидоспора и геме. Удруживање језгара непокретних гамета ствара спору дебелог зида (ооспоре). Оомицете се такође разликују од већине гљива по томе што имају целулозу у својим зидовима. Осим тога, већина оомицета има диплоидно језгро када су у вегетативној фази. Све оомицете производе филаменте зване хифе које, за разлику од виших гљива, имају ограничен број септа. Групација хифа чини мицелијум.

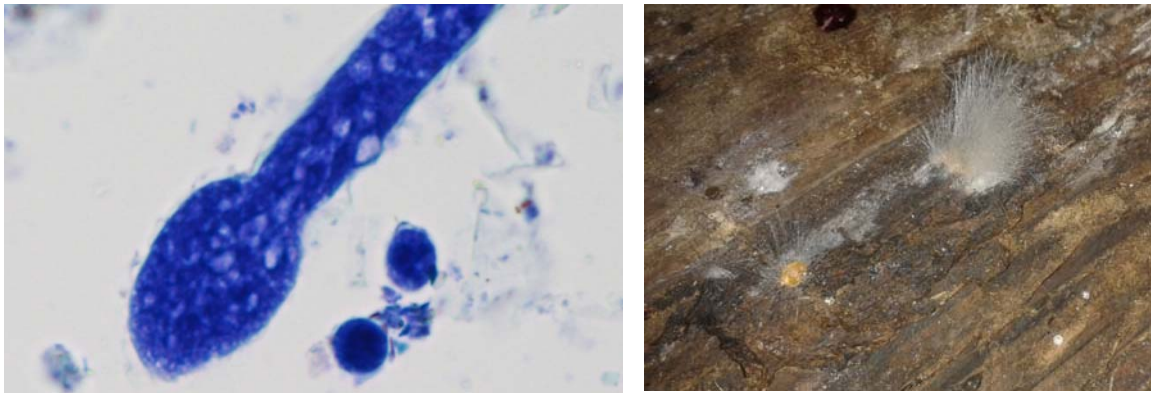
Класа Oomycetes се дели на четири реда: Legenidiales, Perenosporales, Leptomitales и Saprolegniales. Од тога, род *Pythium* из реда Perenosporales, род *Leptomitus* из реда Leptomitales и осам родова из реда Saprolegniales (*Achlya, Aphhanomyces, Calyptralegnia, Dictyuchus, Leptolegnia, Pythiopsis, Saprolegnia, Thraustotheca*) се сматрају најзначајнијим паразитским гљивицама риба. Најраспрострањеније врсте које паразитирају рибе укључују представнике родова *Achlya* и *Saprolegnia*, који ће бити детаљније обрађени у наставку.

Врсте рода *Saprolegnia* (Слика 22) имају две врсте зооспора. Примарна зооспора, која има облик зрна са флагелама на крају, енцистира кратко након напуштања зооспорангијума. Тада циста може угинути и произвести мицелијум или формирати секундарну зооспору у облику бубрега са бочним флагелама: перната ће бити усмерена напред, а глатка назад. Секундарна зооспора живи дуже и такође формира цисту. Циста може пролиферирати због формирања мицелија или може произвести секундарну зооспору.

Инфекција риба сапролегнијом, јавља се у свим водама широм света и једна је од најраспрострањенијих болести копнених риба како у језерима тако и у водотоцима. Болест избија тамо где су присутни патогени сојеви: одсуство сапролегнијазе се приписује одсуству патогених сојева. Споре најлакше и

најчешће продиру у тело рибе када је оштећена површина коже или шкрге (механички, паразитарном или бактеријском инфекцијом) и када је риба слаба, неспособна да производи супстанце које би је заштитиле. Код салмонида осетљивост на сапролегнијазу је изазвана излагањем стресу: стрес подиже ниво кортикостероида у крвној плазми, потискујући тако инфламаторну реакцију и подстичући катаболизам протеина, регулисан кортикостероидима. У завршној фази то доводи до дефицита протеина, што заузврат доводи до атрофије скелетних мишића и супресије синтезе колагена. Недостатак колагена доводи до лоше регенерације лезија на кожи.

Лабораторијска дијагностика реда Saprolegniales се врши након рутинске изолације на уобичајеним агарним подлогама (крвни агар, Ордалов агар). Чиста култура гљивица без бактерија се добија методом поновљеног тапкања, пожељно на агар медијум са екстрактом грашка или на агару слатких сирупа. Врсте се најбоље идентификују у води од конопље након инкубације културе на 18–20°C. Други поступак који се може применити је да се од оболеле рибе или икре узме комад мицелијума и стави у стерилне Петријеве посуде са стерилном дестилованом водом где се додају стерилисано преполовљено семе конопље. Гљиве почињу да расту два до три дана касније. Прање и преношење у стерилну воду се понављају много пута да би се узастопно добила макрокултура мање или више без бактерија. Врсте гљива се затим дијагностикују према морфологији хифа и репродуктивних органа. Сапролегније се фиксирају мешавином 90% алкохола (94 дела) и 40% формалдехида (6 делова).



Слика 22. Споре и хифе *Saprolegnia parasitica* обојене лактофенол плавом бојом/изглед *S.parasitica* хифа на захваћеној икри калифорнијске пастрмке.

Бранхиомикоза

Бранхиомикоза је гљивична болест риба присутна готово широм света, посебно на фармама шарана. Болест се најчешће јавља у топлим климатским регионима.

Бранхиомикоза се јавља у два типа:

- ◊ бранхиомикоза шарана, линьака или караша (узрочник: *Branchiomyces sanguinis*).
- ◊ бранхиомикоза штуке и линьака (узрочник: *Branchiomyces demigrans*).

Ове две врсте могу се разликовати једна од друге по морфолошким особинама и по посебностима њиховог развоја. Они се могу окарактерисати на следећи начин:

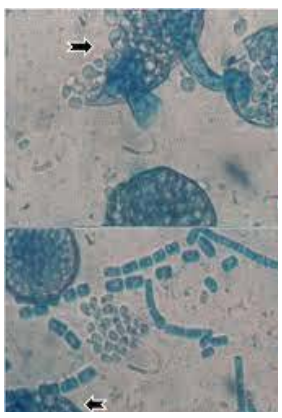
Branchiomyces sanguinis се углавном налази у крвним судовима шкржног лука и шкржних филамената. Пречник хифа је 8–20 μm, дебљина зида хифе је 0,2 μm, а пречник спора је 5–9 μm.

Branchiomyces demigrans производи хифе које су у стању да продру у шкржне филаменте и шире се по њиховој површини. Пречник хифа је обично 13–14 μm и може бити до 22–28 μm на крају хифе. Дебљина зида је 0,5–0,7 μm, а пречник споре је 12–17 μm (Слика 23).

B. demigrans се разликује од *B. sanguinis* по томе што има хифе са дебљим зидовима и по томе што може да се размножава из крвних судова до суседног ткива шкрга.

Спектар домаћина који су осетљиви на ове гљивице недавно је проширен и укључује и салмониде.

Лабораторијска дијагноза се заснива на прегледу шкржних филамената методом компресије. Хифе гљивица су видљиве у крвним судовима шкрга при 150-струком увећању под микроскопом. Споре се такође могу идентификовати када је болест у акутној фази: поцепајте захваћено ткиво на комаде на стакалцу микроскопа и прегледајте га у капи 50% раствора глицерола у води или алкохолу. Бранхиомицете су такође добро уочљиве у препаратима од мртвих рибљих тела разложених трулежом. За изолацију и култивацију, састругати део захваћеног ткива на сатном стаклу водом, сипати у епрувету за центрифугирање са водом и центрифугирати 3 минута. Излијте супернатант из епрувете, сипајте нову дестиловану воду и поново центрифугирајте. Оперите материјал поново док течност не буде бистра. Затим помоћу пипете пренесите седимент на стакалце микроскопа и под микроскопом одвојите хифе мицелијума од остатка ткива. Поново пребаците мицелијум у епрувету са водом и центрифугирајте. Опране хифе ставити у 2% раствор формалдехида, поново опрати у води, посејати их на Сабурову подлогу, 0,5% полутечни агар или крвни агар и култивисати их на 20–22°C.



Слика 23. Споре и хифе *Branchiomyces demigrans* обојене лактофенол плавом бојом.

9.3. Радни задатак – дијагностика гљивичних болести

Питања:

1. Како се узима инокулум из заражене рибе и поставља на хранљиви медијум?

   _____

   _____

2. Наведите природне хранљиве подлоге које се користе за култивацију гљивица?

   _____

   _____

   _____

3. Најчешћи родови гљивица из реда Saprolegniales који изазивају инфекције код риба су (заокружи тачне одговоре)?

   1. *Achlya*
   2. *Saprolegnia*
   3. *Dictyuchus*

4. Наведите ветачке хранљиве подлоге које се користе за култивацију гљивица?

   _____

   _____

   _____

5. Гљивице из рода *Branchiomyces* најчешће се јављају код следећих врста риба (заокружи тачне одговоре)?

   1. Шаран
   2. Смуђ
   3. Штука
   4. Линьак
   5. Сом

Радни задатак:

Посматрај под микроскопом изглед хифа и нацртај их у обележеним круговима.

На основу морфолошких карактеристика гљивица, изврши идентификацију? _____
_____
_____

10.0. ДИЈАГНОСТИКА БОЛЕСТИ РИБА ПРИМЕНОМ МОЛЕКУЛАРНИХ ТЕХНИКА

Молекуларне методе се користе за идентификацију паразитских, бактеријских и вирусних патогена риба *in vivo* и *in vitro*. Ове методе се заснивају на идентификацији макромолекула који су заједнички унутар врсте и јединствени за ту врсту. Молекуларне методе могу бити врло специфичне и често се користе за потврђивање дијагнозе, али се могу користити и за примарну детекцију патогена у ткивима инфицираних риба. Међутим велика специфичност врло често ограничава употребу ових тестова у почетним фазама дијагностичке процедуре. Другим речима, тест може да укаже на присуство или одсуство одређеног патогена за који је створен, али не пружа информације о другим евентуално присутним патогенима. Молекуларне методе које се користе у дијагностици болести риба се заснивају на детекцији масних киселина, сложених угљених хидрата, протеина и / или нуклеинских киселина.

Анализа масних киселина

Масне киселине се могу брзо и поуздано идентификовати гасном хроматографијом. Ова метода се користи за специфичну идентификацију многих врста бактерија и посебно је корисна за детекцију микобактерија, обзиром да ова група бактерија није погодна за детекцију помоћу традиционалних биохемијских дијагностичких тестова. Недостатак овог метода је што захтева претходну изолацију микроорганизма, а сама опрема потребна за вршење испитивања је скупа.

Идентификација антигена

Ово је веома осетљива метода за идентификацију специфичних патогена у зараженом ткиву или за потврдну идентификацију изолованих патогена. Антигени су по правилу велики, комплексни угљени хидрати (нпр. липополисахариди) или протеини. Они се детектују у реакцији са антителима створеним вакцинацијом животиња (обично миша, пацова, зеца, козе или пилета). Након тога серум вакцинисаних животиња се издваја из згрушане крви и употребљава као антисерум. Уколико је животиња вакцинисана целим организмом, развиће се антитела против више различитих антигена датог патогена. Уколико је животиња вакцинисана пречишћеним антигеном, развиће се антитела (тзв. поликлонска антитела) против више епитопа датог антигена. Још специфичнија антитела, моноклонска антитела, су специфична за само један епитоп антигена. Најједноставнији метод у коме се користе антитела је тест аглутинације у коме антитела згрушавају одређену супстанцу (обично бактеријске ћелије) у суспензији. Комерцијални китови базирани на латекс-аглутинацији бактерија су се показали добри за детекцију различитих бактерија риба, попут *Yersinia ruckeri* и *Renibacterium salmoninarum*, али су у појединим случајевима утврђене унакрсне реације и лажно позитивни резултати. Из тог разлога се комерцијални китови

сматрају ефективним. И брзим начином испитивања великог броја узорака, али ипак нису универзално применљиви. У вирусологији се користи серум неутрализациони тест у коме антитела инактивишу вирус или ремете његову способност да инфицира ћелије, па из тог разлога не долази до појаве ЦПЕ на ћелијским културама инокулисаним са неутралисаним вирусом. Често коришћеним и осетљивијим методама је могуће детектовати антитела везивањем супстрата обележеног флуоресцентним бојама, ензимима, или маркер молекулима, као што је биотин, са антителима. Ови тестови се могу користити за детекцију антигена у ткивима техником флуоресцентних антитела (FAT), индиректном имунофлуоресценцијом (IFAT), или имунохистохемијом. Такође, ове методе се могу користити и за детекцију вируса у инфицираним ћелијским културама. Присуство антигена у ткивним екстрактима је могуће детектовати помоћу ЕЛИСА или дот-блот технике.

Идентификација нуклеинских киселина

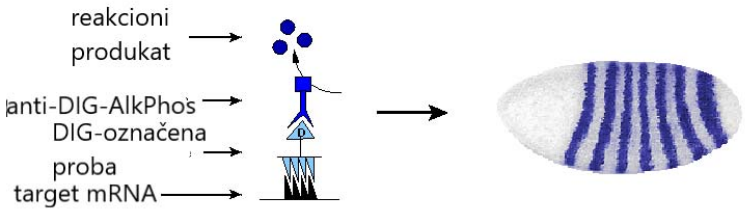
Методе детекције нуклеинских киселина се ослањају на способности комплементарних нуклеотида да се медјусобно везују. За дијагностику се користи неколико различитих система амплификације, а најчешће се примењују ланчана реакција полимеразе (PCR) и реверзна транскриптаза PCR (RT- PCR). За PCR се користи ДНК супстрат из кога се генерише 106 (или више) копија специфичног фрагмента ДНК, између два ДНК прајмера (која се везују на комплементарне ланце). За RT - PCR, циљана РНК се прво конвертује у ДНК (цДНК) коришћењем реверзне транскриптазе, а затим се циљани цДНК регион амплификује помоћу PCR. PCR продукти се могу детектовати коришћењем гел или капиларне електрофорезе или помоћу одвојеног ДНК-ДНК теста хибридизације. За дијагностику болести риба се често користи и TaqMan Real-time PCR тест. TaqMan тест представља не само поуздану и брзу методу за откривање патогена, већ представља и квантитативни тест. У циљу поуздане дијагностике неопходно је упознати се са свим доступним анамнестичким подацима, патолошким променама и резултатима идентификације инфективног агенса како би, укрштањем ових налаза утврдили највероватнији узрок болести и основне факторе који су утицали на њен настанак. Комбиноване информације захтевају субјективну интерпретацију коју ће најбоље урадити појединци специјализовани за области здравствене заштите риба.

Најчешће коришћене методе молекуларне дијагностике риба:

10.1. In situ хинридизација

In situ хибридизација (ISH) користи обележену нуклеинску киселину која ће се везати на комплементарну секвенцу вирусног антигена у морфолошки очуваним ћелијама или ткивима. Локација пробе се визуализује колориметријским бојењем или флуоресценцијом (флуоресцентна *in situ* хибридизација, или FISH), а присуство антигена може бити директно повезано са патолошким променама унутар пресека ткива на коме се изводи проба.

Молекуларне пробе су молекули специфичне секвенце нуклеинких киселина, комплементарни са дефинисаним сегментом вирусног гена. Пробе се затим означавају ознаком као што је дигоксигенин (DIG), радиоизотопима или флуоресцентним маркерима. Материјал узорка (одсечци ткива) се наносе на микроскопска стакла и суше на ваздуху. Парафин се уклања са плочица. После денатурације топлотном обрадом, молекуларне пробе хибридизују са вирусним таргет геном на повишеним температурама. Локација означене пробе (нпр. ДИГ се детектују везивањем за комплементарно антитело коњуговано са ензимом), затим додавањем одговарајућег супстрата, стварајући колориметријски развој (Слика 24). У случају FISH теста, локација означене пробе се детектује флуоресцентном микроскопијом. Исечци тестног ткива се увек морају читати у односу на позитивну и негативну контролу.



Слика 24. *In situ* хибридизација помоћу DIG маркера.

10.2. Ланчана реакција полимеразе (PCR)

PCR представља репликацију (преписивање, умножавање) ДНК молекула *in vitro*. Умножавање ДНК путем PCR-а се базира на хибридизацији специфичних олигонуклеотида (прајмера) и *in vitro* синтези копија жељеног фрагмента који је оивичен и обележен датим прајмерима. Такво умножавање је праћено агарозном гел електрофорезом и преставља најједноставнију примену PCR-а за идентификацију врста.

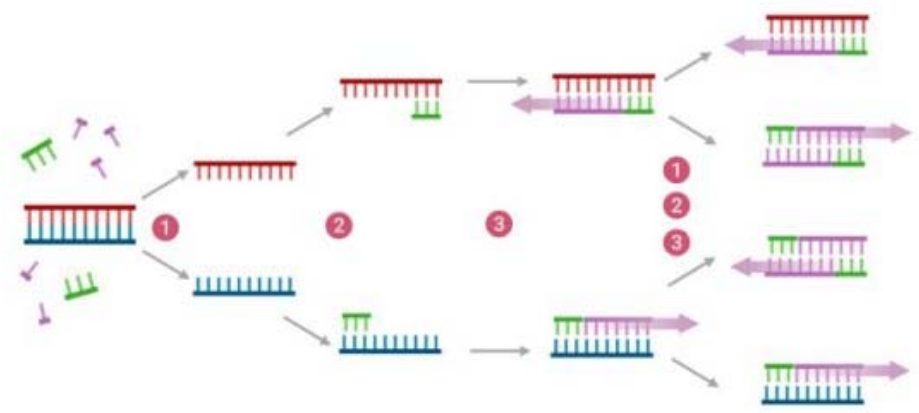
За извођење PCR-а неопходни су:

- ◊ ДНК матрица – двоструки ДНК ланац који садржи информацију која се жели умножити, дужине 100-35000 базних парова,
- ◊ једноланчани прајмери – секвенце олигонуклеотида дужине 20-30 нуклеотида чије су секвенце комплементарне крајевима оне ДНК секвенце која се жели умножити,
- ◊ смеша слободних дезоксинуклеотида у засићеним концентрацијама: 200 mM за сваки dNTP,
- ◊ ензим ДНК полимераза која врши синтезу нових ДНК ланаца,

- ◊ Mg_2+ јони који су неопходни за активност ензима и они се додају у виду $MgCl_2$ и
- ◊ пуфер – стандардни пуфер који се састоји од 50 mM KCl, 10 mM TRIS Cl, 1.5 mM $MgCl_2$,pH 8.3, 21 Co

У PCR методи се користи ДНК полимераза изолована из бактерије *Thermus aquaticus* (названа Taq полимераза) која живи у термалним изворима на температури око 70°C. Услед тога је способна да на тој температури врши репликацију ДНК молекула. Направљена реакциона смеша се ставља у апарат назван Termocycler који омогућује ток реакције. PCR се изводи понављањем у 20 – 30 циклуса од којих се сваки састоји из три основне фазе (Слика 25):

- ◊ **Загревање** реакционе смеше на 94 – 96°C при чему долази до раздвајања двоструких ланаца ДНК матрице. Ова фаза траје око један минут.
- ◊ **Хлађење** реакционе смеше на 40 – 60°C при чему се везују прајмери. Ова фаза траје око 30 секунди у зависности од дужине прајмера, јер је дужим прајмерима потребно дуже време за везивање.
- ◊ **Загревање** реакционе смеше на 72°C, при чему је Taq полимераза започиње полимеризацију и достиже максимум активности. Трајање ове фазе зависи од дужине фрагмента који се жели умножити и износи 1 – 2 минута.



Слика 25. PCR реакција: 1. Загревање на 94 – 96°C; 2. Хлађење на 40 – 60°C; 3. Елонгација на 72°C.

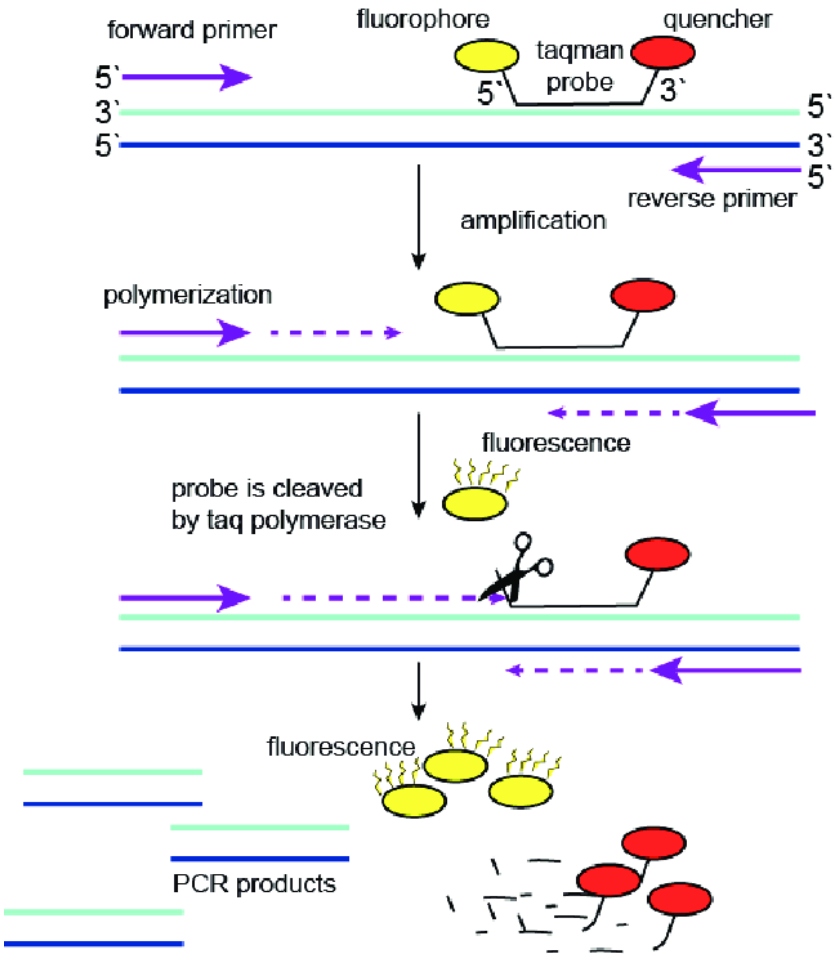
10.3. Квантитативни PCR – TaqMan Real-time PCR тест

TaqMan проба у реалном времену или квантитативни PCR детектује и мери амплификацију таргет DNA или cDNA током фазе експоненцијалног раста PCR-а. Принципи за PCR у реалном времену су слични конвенционалној PCR методи (денатурација дволанчане DNA или cDNA након чега следи анелација прајмера на циљни вирусни геном) осим секвенца – специфичне молекуларне пробе комплементарне унутрашњем делу шаблона DNA или cDNA између предњег и реверзног прајмера.

TaqMan проба има два типа флуорофора (Q и R) које се налазе на крајевима ове секвенце (Q на 3' а R на 5' крају) Q емитује светлост велике таласне дужине (црвене боје) и тиме прикрива сигнал који емитује R (мала таласна дужина, зелене боје). То се постиже путем трансфер флуоресцентне резонантне енергије која представља инхибицију једне боје другом без емисије протона. Проба се везује за циљну ДНК, након чега Taq полимераза синтетише комплементаран ланац почевши од прајмера уклањајући везану TaqMan пробу која јој се нађе на путу. Тако се одвајају и R и Q па се са R емитује енергија која се квантификује.

Корак 1. DNA или cDNA се денатурише на високој температури што доводи до раздвајања двоструког ланца.

Корак 2. PCR реакциона смеша садржи два прајмера и TaqMan пробу (кратки олигонуклеотид комплементаран унутрашњем региону циљног вирусног шаблона) и термостабилну Taq ДНК полимеразу. После термичке обраде реакција се хлади (Слика 26).



Слика 26. Шематски приказ тока qPCR са TaqMan пробом.

10.4. Радни задатак – молекуларна дијагностика

Питања:

1. Које су најчешће технике молекуларне дијагностике које се користе код риба?

   _____

   _____

2. Шта је FISH тест и како се изводи?

   _____

   _____

   _____

3. TaqMan проба има следеће флуорофоре (заокружи тачне одговоре)?

   1. A
   2. Q
   3. R

4. Шта је то Taq полимераза и која јој је функција?

   _____

   _____

   _____

5. TaqMan проба је (заокружи тачан одговор)?

   1. Квалитативна
   2. Квантитативна
   3. Квалитативна и квантитативна метода

11.0. СЕРОЛОШКИМ ДИЈАГНОСТИКА

Серолошке технике које се користе за дијагностику болести риба се полако све више примењују у рутинској дијагностици. Такве технике могу утврдити присуство антигена унутар ткива рибе, идентитет изолованих микроорганизама, или присуство антитела против одређеног антигена у крви рибе.

11.1. Припрема антисерума

Обично се за дијагностичку имунологију припремају и користе антисеруми од зечева мада повремено, када су биле потребне веће количине, овце или козе су такође коришћене. Припрема антибактеријских антисерума обично укључује примену серија интравенских ињекција бактеријских антигена или и појединачне интравенске ињекције праћене интрамускуларном или субкутаном инокулацијом суспензије антигена у Фројндов комплетан или непотпун адјуванс. Обично је довољно апликовати две или три такве ињекције. Најмање две здраве експерименталне животиње преко 200 грама тежине треба користити за сваки препарат и резултујуће серуме сакупити да би се обезбедила експресија свих доступних антигена.

Аглутинирајући антисеруми, посебно за аглутинирајуће тестове на предметницама и епруветама, припремају се коришћењем препарата од целе бактеријске ћелије. Обично се узгајају на чврстм медијуму (пожељно без серума) и испирају са 0,9% стерилним NaCl, центрифугирају три или четири пута и ресуспендују у довољној количини физиолошког раствора да би се добила густа суспензија.

Преципитирајући антисеруми се обично припремају против антигена произведених као што је горе наведено, али су соникирани или млевени карборундом да би се бактеријске ћелије разбиле и да би се изложили унутрашњи антигени.

Вирус неутрализујући антисеруми против вируса риба су обично припремљени инокулацијом делимично пречишћеног вируса интравенозно у три или четири наврата у интервалима од две недеље пре употребе као инокулум. Тамо где могу бити присутни ендотоксични ефекти индуковани антигеном у серуму који производе животиње, неопходно је загревање антигенских препарата на 65°C током 1 сата ради детоксикације. Крв се може узети од зечева у малим количинама за испитивање, секцијом латералне ушне вена. Потпуну екссангвинацију треба спровести путем пункције срца под анестезијом. Серум треба оставити да се одвоји од елемената крви, стављањем преко ноћи на 4°C.

11.2. Припрема пречишћених специфичних глобулина

Одвајање антитела - активних глобулина од других компоненти серума омогућава знатно појачану активност. Они се могу користити за припрему антисерума обележених флуоресцеином за имунофлуоресцентне тестове и за тест

сензибилизације латекса на фурункулозу, или за тестове дифузије гела. Моноклонска антитела су такође доступна за неке тестове, који додатно повећавају осетљивост.

Метода

- ◊ У запремину серума се додаје, кап по кап, једнака количина запремина засићеног амонијум сулфата.
- ◊ Преципитирани глобулини се таложе на 2000 – 3000 обртаја током 15 минута.
- ◊ Одпипетирати супернатант и бацити га.
- ◊ Поново растворити у минималној запремини од 0,9% NaCl или фосфата - пуферованог физиолошким раствор и дијализирати у 100 пута запремине NaCl или пуфера, користећи три измене раствора за дијализу.
- ◊ Суспендовани материјал се затим центрифугира и раствор супернатанта глобулина се чува у минималним аликвотима на -20°C.

11.3. Аглутинација

Тест аглутинације на предметници

Овај брзи дијагностички тест се обично изводи ради дијагнозе суспектне бактеријске културе која је изолована у вештачкој култури.

Поступак.

- ◊ Једна или две колоније младе културе микроорганизма се помешају са физиолошким раствором на чистом одмашћеном предмњтном стаклу у две одвојене капи.
- ◊ Кап серума се додаје у једну кап, а на другу кап се додаје капљица физиолошког раствора.
- ◊ Предметница се лагано љуља (помера) уназад и напред током 30 секунди. Позитивна реакцију указује на аглутинацију у суспензији којој је додат серум.

Тест аглутинације у епрувети

Овај поузданији, али дуготрајнији тест аглутинације користи се за добијање квантитативне мере у виду титра антитела на познати антиген користећи тај антиген у константном разблажењу.

Поступак:

- ◊ Двострука разблажења тестираног антисерума у физиолошком раствору су припремљен у Дрејеровим епруветама.
- ◊ Додају се једнаке количине антигена. (Антиген је обично тешка суспензија младе културе - познати антиген.)

◊ Епрувете се протресу да би се састојци добро измешали, а затим оставе неколико сати. Обично се узима титар као реципрочна вредност тог разблажења у коме је било 50% аглутинације.

11.4. Имунофлуоресценција

Ова техника има посебне предности за искусне кориснике у брзој дијагностици бактеријских и вирусних инфекција и локација вирусних или бактеријских антигена унутар ткива.

Имунофлуоресценција је техника која се користи за обележавање одређеног циљног антигена флуорофором. Овде је флуорофор флуоресцентно хемијско једињење које може поново емитовати светлост при светлосној побуди. Када се флуорофор веже за циљни антиген, то омогућава откривање циљног молекула у узорку. Да би се даље описао, када се антиген веже за одређено антитело, може се коњуговати са флуорофорима. Отуда је лако открити присуство циљног антигена у узорку када се посматра под флуоресцентним микроскопом.

Поред тога, постоје две врсте имунофлуоресценције; директна и индиректна имунофлуоресценција (Слика 27).

Разлика између директне и индиректне имунофлуоресценције углавном лежи у броју употребљених антитела и коњугацији флуорофора. Односно, у директној имунофлуоресценцији, флуорофор директно коњугује са примарним антителом, док у индиректној имунофлуоресценцији, флуорофор коњугује са секундарним антителом. Кључна разлика између директне и индиректне имунофлуоресценције је да је директна имунофлуоресценција користи једно антитело које делује против циљног циља, док индиректна имунофлуоресценција користи два антитела за обележавање циљног циља.



Слика 27. Шематски приказ директне и индиректне имунофлуоресценције.

11.5. ELISA (engl. Enzyme-linked immunosorbent assay)

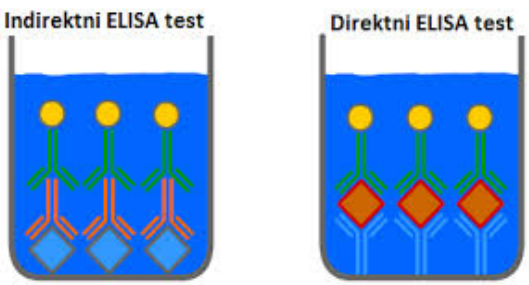
Ова метода се користи:

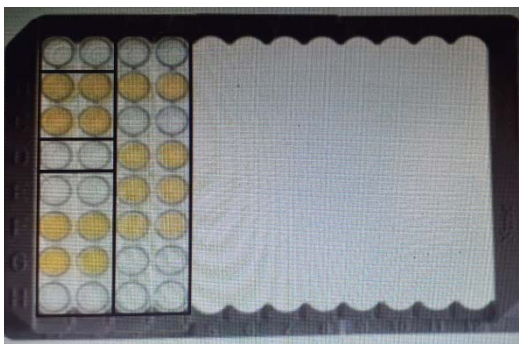
- ◊ за одређивање количине антитела и/или присуства антитела
- ◊ за одређивање количине антигена и/или присуства антигена

Постоји неколико модификација ове технике, али у свима се вирусни антиген имобилише на чврсту фазу, као што је зид базенчића пластичне микротитрационе плоче или пластичне честице (Слика 28). Потом се у базенчић додаје серум који се испитује. Ако је у серуму присутно специфично антитело, оно ће се везати за антиген на чврстој фази. Вишак серума се уклања, а базенчић испира неколико пута. Следећи корак подразумева додавање антитела против имуноглобулина обележених ензимом. Вишак односно невезана анти - антитела се уклањају испирањем, а затим се додаје одговарајући супстрат за ензим при чему се развија боја чији се интензитет мери колориметријски и директно је пропорционалан концентрацији специфичних антивирусних антитела у узорку. Предност ове методе је могућност детекције IgM или IgG анти-вирусних антитела коришћењем изотип-специфичних анти- имуноглобулина. ELISA тестови који се данас примењују имају велику осетљивост и специфичност (> 95%), неки чак близу 100%. ELISA тестом такође се могу детектовати вирусни антигени уколико се за чврсту фазу веже антитело (моноклонско или поликлонско) специфично за антиген који се тестира. Предности ELISA техника су:

- ◊ брзина извођења (већина тестова траје 2-3х);
- ◊ аутоматизоване су и
- ◊ објективне су јер се реакција очитава спектрофотометријски.

А





Б

Слика 28. А) Директни и индиректни ELISA тест (Hammar, 2014); Б) ELISA плоча код вирусне хеморагичне септикемије пастрмки. Позитивни вирус VHS показују жуту боју. Реакција оксидације између коњугата пероксидазе и супстрата 3,3 ', 5,5 ″-тетраметилбензидина (TMB) производи плави раствор, међутим када је раствор за заустављање сумпорне киселине додат да би се реакција прекинула, раствор постаје жут.

11.6. Радни задатак – серолошка дијагностика

Питања:

1. Које су најчешће серолошке технике које се користе код риба?

   _____

   _____

2. Због чега се најчешће изводи тест аглутинације на предметници?

   _____

   _____

   _____

3. У директној имунофлуоресценцији, флуорофор се директно коњугује са (заокружи тачан дговор)?

   1. Примарним антителом
   2. Секундарним антителом
   3. Антигеном

4. Наведите предности ELISA технике?

   _____

   _____

   _____

5. ELISA тестови који се данас примењују имају велику осетљивост и специфичност (заокружи тачан одговор)?

   1. > 90%
   2. > 95%
   3. < 80%

12.0. ДИЈАГНОСТИКА ИНТОКСИКАЦИЈА

Као непосредни узроци повређивања и интоксикација риба у пракси се најчешће се евидентирају следеће физичко-хемијске промене у воденој средини:

- ◊ Неадекватна температура
- ◊ Низак ниво раствореног кисеоника
- ◊ Нагле промене и неадекватне pH вредности
- ◊ Повишене вредности амонијака
- ◊ Повишене вредности угљен диоксида
- ◊ Повишене вредности цијанида
- ◊ Повишене вредности метала, металних соли, пестицида, полихлорованих бифенила (PCB), петролеума, токсина фитопланктона и др.

Недисоцирани амонијак је високо до веома токсичан за рибе. Вредност LC50, одређена у тесту акутне токсичности, креће се између 1 и 1,5 mg NH_3 по литру код ципринида и између 0,5 и 0,8 mg NH_3 по литру код салмонида. Максимална дозвољена концентрација амонијака (NH_3) је 0,05 mg по литру за циприниде и 0,0125 mg по литру за салмониде. Веома је битна и зависност садржаја амонијака од температуре и pH вредности (Табела 13).

Табела 13. Зависност садржаја NH_3 (као % укупног амонијака) од pH и температуре воде

pH	t°C					
	0	5	10	15	20	25
7.0	0.082	0.12	0.175	0.26	0.37	0.55
7.2	0.13	0.19	0.28	0.41	0.59	0.86
7.4	0.21	0.30	0.44	0.64	0.94	1.36
7.6	0.33	0.48	0.69	1.01	1.47	2.14
7.8	0.52	0.75	1.09	1.60	2.32	3.35
8.0	0.82	1.19	1.73	2.51	3.62	5.21
8.2	1.29	1.87	2.71	3.91	5.62	8.01
8.4	2.02	2.93	4.23	6.06	8.63	12.13
8.6	3.17	4.57	6.54	9.28	13.02	17.95
8.8	4.93	7.05	9.98	13.95	19.17	25.75
9.0	7.60	10.73	14.95	20.45	27.32	35.46
9.2	11.53	16.00	21.79	28.95	37.33	46.55
9.4	17.12	23.19	30.36	39.23	48.56	57.99
9.6	24.66	32.37	41.17	50.58	59.94	68.63
9.8	34.16	43.14	52.59	61.86	70.34	77.62

10.0	45.12	54.59	63.74	71.99	78.98	84.60
10.2	56.58	65.58	73.59	80.29	85.63	89.70
10.4	67.38	75.12	81.54	86.59	90.42	93.24
11.0	89.16	92.32	94.62	96.26	97.41	98.21

Први симптоми интоксикације амонијаком су благи немир, убрзано дисање, риба остаје близу површине воде, дахће за ваздух, немир се повећава, покрети се убрзавају, дисање постаје неправилно, а затим следи фаза ексцитације. Рибе интензивно реагују на спољашње надражаје, губе равнотежу, скачу изнад површине воде и мишићи им се трзају у тоничко-клоничким грчевима. Погођена риба лежи на једној страни и држи уста и шкржне поклопце широм отворене у грчевима. Затим следи кратак период очигледног опоравка. Рибе се враћају у нормалан ход и изгледају помало немирно. Овај стадијум се касније замењује другом јаком ексцитацијом; површина тела постаје бледа и риба угине.

Кожа риба интоксификованих амонијаком је светле боје, прекривена обиљем или вишком слузи. У неким случајевима постоје мала крварења, углавном у основама грудних пераја и у предњој очној комори. Шкрге су јако конгестиране и испуњене обиљем слузи; шкрге риба изложених високим концентрацијама амонијака могу благо до јако крваве. Интензивна производња слузи се може приметити на унутрашњој страни шкржних поклопаца. Органи унутар телесне шупљине су конгестирани и паренхиматозни, показујући дистрофичне промене.

Код шарана такозвана токсична некроза шкрга изазива велике губитке. Фактори одговорни за пораст ове болести укључују интоксикацију амонијаком при којој је ниво амонијака у крви веома повећан. Амонијак је уједно и крајњи производ метаболизма азота код шарана и највећи део се елиминише кроз шкрге у воду. Ако је ова елиминација из неког разлога смањена (висок pH воде, дефицит кисеоника, оштећене шкрге итд.), ниво амонијака у крви је веома повећан, долази до аутоинтоксикације рибе.

12.1. Дијагностиковање тровања рибама

Дијагностиковање тровања рибама је тежак и компликован задатак јер се смртност често бележи са закашњењем, а риба и вода се не узоркују на време. У таквим случајевима пато-анатомске промене код рибе су прикривене почетним постморталним променама, а токсичне материје које су затровале рибу су однешене током воде. Стога је неопходно користити све расположиве информације и могуће аналитичке методе за откривање узрока угинућа риба и водених бескичмењака. Аналитички рад треба почети од прегледа анамнестичких података и извршења физичко-хемијских и хидробиолошких анализа воде, а по потреби и доњих седимената и перифита, а затим и самих риба. Биолошки тест за токсичност воде је важан у дијагнози тровања рибама.

12.2. Испитивање in situ

Када се примети да се риба чудно понаша или да угињава, на лицу места треба предузети следеће главне кораке.

- ◊ Дефинисати подручје где рибе угиљавају или мењају понашање.
- ◊ Болесну или тек угинулу или убијену рибу ухватити и послати на преглед.
- ◊ Забележити стање зоопланктона, фитопланктона и бентоса.

Узимати узорке воде за хидрохемијску анализу (део анализа и мерења се мора урадити на лицу места: O_2, температура, провидност, мирис и сл.), и за биотест на акутну токсичност.

Нацртати графикон са назнаком погођеног подручја, са местима узорковања воде и седимента. Попунити формулар на месту прегледа.

Ако постоји сумња да би риба могла угинути или променити своје понашање услед примене хемикалија у близини захваћеног водотока или баре или језера, потребно је прикупити детаљне информације о времену и начину примене и о врсти и количину примењене хемикалије.

Пример белешки које служе као документ о локалном испитивању у случајевима нагле промене понашања или морталитета риба:

1. Дан, сат и место увиђаја.
2. Лица укључена у истрагу.
3. Назив и адреса организације која је претрпела губитак (власник објекта).
4. Назив или друга ознака воденог тока или резервоара у којем је угинула риба.
5. Врсте и старост риба које се јављају у погођеном водотоку или резервоару.
6. Угинула риба (број, врста, старост).
7. Клинички знаци и макроскопске промене код риба са промењеним понашањем.
8. Тренутно локално здравствено стање рибе у датом водотоку или резервоару.
9. Стање зоопланктона.
10. Могући извори загађења који могу бити повезани са смртношћу риба.
11. Прелиминарна процена штете (дужина или површина захваћеног водотока или акумулације).
12. Укупна тежина угинулих врста рибе.
13. Место, сат узорковања, ознака узорака.
14. Одређивање квалитета воде *in situ* (температура воде, боја, провидност, мирис, концентрација раствореног кисеоника, концентрација амонијака и други критеријуми).
15. Мишљење учесника локалне истраге.
16. Потписи локалних учесника истраге.

Ако је риба убијена применом хемикалија у близини водотока или акумулације (нпр. пестицида), у документ о локалном испитивању треба укључити и следеће податке:

1. Дан и сат када је усев третиран.
2. Коришћена хемикалија (тржишни назив, назив и садржај активног састојка, количина примене, концентрација).
3. Начин примене.
4. Локални назив парцеле, врста третираних усева и површина под третираним усевом, удаљеност од водотока или резервоара.
5. Име и адреса послодавца особе која је поднела захтев.
6. Временске прилике које су преовладавале приликом обраде терена (смер ветра, брзина ветра, киша, облачност) и евиденција о кишама у периоду између примене и угинућа рибе.

12.3. Хидрохемијско испитивање

Одабир правих места за узорковање и прави начин узорковања воде је главни предуслов за успешан рад, па им се мора посветити максимална пажња. У текућим водама, места за узорковање воде се одабирају на следећи начин:

- ◊ На месту где рибе угину или се чудно понашају,
- ◊ узводно од места угинућа,
- ◊ 50 до 100 m низводно од ушћа извора загађења.
- ◊ место где се извор загађења спаја са водотоком са рибом,
- ◊ 30 до 50 m узводно од места ушћа извора загађења и
- ◊ Низводно од места угинућа: на местима где се уочавају први знаци необичног понашања рибе. Места низводно од места угинућа често се морају одредити прорачуном: линија фронта загађеног подручја може се израчунати из времена цурења токсичног загађивача и протока воденог тока.

У акумулацијама и рибњацима, места узорковања воде треба одредити према стварном стању; у неким случајевима узорци се морају узети са различитих висина воденог стуба. Специјалне стаклене боце за узорковање се користе за узимање узорака воде са различитих дубина и непосредно изнад дна. Узорци се сипају у чисте боце од 1 до 2 литра. Не препоручује се пуњење боце водом близу обале: узорци се као и обично узимају 1-2 метра од обале. Са дна, узорци воде морају се узимати пажљиво да се не подигне муљ и други седименти. За максималну објективност података о испитиваној води, време између узорковања и анализе мора бити што је могуће краће. Узорци се испоручују са предностима у топлотно изолованим врећама. У лабораторији боце са узорцима треба ставити у фрижидер и чувати на 3-4°C. у термоизолованим врећама. У лабораторији боце са узорцима треба ставити у фрижидер и чувати на 3-4°C. Међутим, све ово можда неће бити довољно за неке компоненте воде. У таквим случајевима узорци се морају анализирати чим се сакупе или се могу конзервирати са малом количином конзерванса.

12.4. Испитивање седимената

У оправданим случајевима, осим прикупљања узорака воде, може се узорковати и седимент. То је обично случај када постоји сумња да је водоток или акумулација загађена нафтним дериватима, металима, пестицидима и неким другим материјама које се акумулирају у доњем седименту.

Не постоји стандардизација узорковања седимента: локални услови се увек морају поштовати. Основни принцип је да се узорци узимају углавном из горњег слоја седимената, да се узимају на неколико локација у оквиру истраживаног локалитета и да се узорци мешају за анализу. Седименти се анализирају модификацијама метода које се користе за одређивање загађујућих материја у водама и другим (углавном биолошким) материјалима.

12.5. Хидробиолошко испитивање

Хидробиолошко испитивање воде је веома важно за дијагнозу интоксикације риба и нижих водених организама. Ово испитивање обухвата процену квалитативне и квантитативне структуре нижих водених организама и евидентирање штете коју ти организми могу да претрпе, као и промена у понашању риба, односно њиховог угинућа. Изложеност одређеној групи отрова може се проценити на основу промена у саставу биоценозе након интоксикације. На пример, ракови и ларве инсеката су веома осетљиви на инсектициде, водене биљке су осетљиве на хербициде, алге осетљиво реагују на алгициде итд. У случајевима удеса на водотоцима и у акумулацијама, водени бескичмењаци су обично први показатељ кватичког загађења акумулације. окружење, а затим следе рибе. Ово је посебно карактеристично за загађење водотокова и акумулација пестицидима и неким металима. Супстанце површинске активности показују приближно исту токсичност за рибе и водене бескичмењаке. С друге стране, рибе су главни индикатори загађења у случајевима акцидената у којима су водотоци или резервоари загађени органским материјама.

12.6. Испитивање перифита

Перифите формирају подлогу која се састоји од међусобно повезаности водених организама (бактерије, гљиве, алге, протозое, бриозое, ротифери и други) који расту на, или су причвршћени за површине као што су стабљике више водене вегетације, камење, структуре изграђене у води, урођени балвани и сл. У површинским водама перифите су важне као храна за многе водене животиње, укључујући рибе. Оне дају значајан допринос процесима самочишћења и њихов квалитет и количина указују на просечан квалитет воде на датом локалитету: краткотрајне и безначајне промене квалитета воде обично утичу на међуповезаност организама који чине перифитну подлогу. Ово је од великог значаја у анализама воде. У акцидентима, које углавном карактерише кратак токсични талас који убија и односи слободно живе организме, оштећени перифити могу дати информације о таласу као и о квалитету воде у претходном периоду.

Анализа перифита је важан део свеобухватног испитивања квалитета воде. Њихов значај је посебно велики на местима са текућом водом где анализе појединачних узорака са појединачних места узорковања обично не дају репрезентативне резултате. Узорци перифита се обично добијају тако што се чупају са различитих површина помоћу пара дугих пинцета. Перифити причвршћени за подводне конструкције од бетона или других материјала могу се лако стругати помоћу лабораторијске четке на дугачкој дршци: материјал причвршћен за чекиње четке се затим ставља у бочицу за узорковање , користећи пинцету. У лабораторији се узорци перифита подвргавају хидробиолошкој анализи у нормалним микроскопским препаратима, идентификују се организми присутни у узорцима и процењује њихов број помоћу скале процене.

12.7. Биолошки тест за испитивање токсичности воде

Испитивање извора и узрока акцидента који се догоди у водотоку или акумулацији обухвата, поред хидрохемијских и хидробиолошких анализа, и биотест на токсичност воде. Вода која се користи за биотест узима се из дела узорка воде (без конзерванса) који се шаље у лабораторију на физичко-хемијску анализу. Водени организми који служе за испитивање су акваријумске рибе, посебно *Poecilia reticulata*, и водени бескичмењаци, посебно водене бубе из рода *Daphnia*, које спадају међу водене организме највеће осетљивости на већину загађивача. Што се тиче *Poecilia reticulata*, није изузетно осетљива риба, али њена предност као и код већине акваријумских риба је лака доступност током целе године.

Поступак биолошке анализе токсичности воде је следећи: У 100-200 ml узорка воде ставља се десет водених буба (*Daphnia*) или две или три акваријумске рибе (*Poecilia reticulata*). Ако су узорци воде довољно велики, анализа се ради истовремено на оба организма. Паралелно са испитиваним узорком, исти број организама се ставља у неконтаминирану воду ради контроле. Најбољи контејнери су посуде за кристализацију где је водени стуб плитак, омогућавајући довољно кисеоника да дифундује из ваздуха у воду. Понашање и стање организама се прати током биолошке анализе, која може трајати 24 до 48 сати.

Ако је резултат теста негативан (понашање рибе или водене бубе се не разликује од контроле), може се са извесном вероватноћом претпоставити да испитани узорак воде не садржи токсичне супстанце у штетним или смртоносним концентрацијама. Ако организми који се тестирају промене понашање или угину, одмах треба започети физичко-хемијске и/или друге методе како би се открио узрок интоксикације.

Иако употреба биолошке анализе за испитивање токсичности воде не може резултирати директном идентификацијом узрока несреће или смртности риба и других водених организама, може бити од велике помоћи у дијагностичком процесу. Други водени организми, нпр. калифорнијска пастрмка, шаран или циклопси се такође могу користити за биолошке тестове, али они нису доступни током целе године, а калифорнијска пастрмка и шаран имају додатни недостатак што им је потребно више воде у узорку. Општа карактеристика свих биолошких тестова токсичности воде је да је њихова методологија значајно варијабилна: у

сваком посебном случају метода се мора изабрати у односу на стварне услове и опрему и капацитет лабораторије.

12.8. Преглед рибе

Број риба које се морају прегледати и послати на дијагностички преглед није увек исти. Ако постоји сумња да су се рибе отровале или угушиле загађењем воде, узимају се 3 до 5 риба сваке од неколико врста (оних које се најчешће јављају међу угинулим или умирућим рибама).

Успех прегледа зависи од стања рибе. Нема користи слати рибу која почиње да се распада или се чак распадне. Узорак рибе најбоље је доставити живу, са клиничким симптомима оштећења. Ако је то немогуће, неопходно је да риба буде свежа и нетакнута када стигне у лабораторију. Никада их не треба слати у води у којој су угинули. Риба која се шаље на општи преглед треба да буде без конзерванса (формалин или други) јер би такве супстанце онемогућавале дијагнозу. У случајевима када се рибе шаљу само на хемијско-токсиколошко испитивање на садржај метала и остатака пестицида и других загађивача, препоручује се слање замрзнутих узорака.

Рибе које су тек угинуле или оне са клиничким симптомима оштећења се подвргавају детаљном здравственом прегледу ради отклањања болести заразног или инвазионог типа. Уколико се такве болести отклоне, потребно је навести узрок нагле промене средине која је проузроковала угинуће риба или промену њиховог понашања. Клинички симптоми дати у документу из локалног истраживања процењују се у првој фази прегледа, затим следи патоанатомска дисекција, у оправданим случајевима органи и ткива рибе се подвргавају хемијско-токсиколошком прегледу, а затим и даљем испитивању.

Хемико-токсиколошко испитивање органа и ткива је једна од најобјективнијих, али и најтежих метода дијагнозе интоксикације. У случају сумње на интоксикацију металима или при контроли садржаја метала у риби као људској храни, хемијско-технолошко испитивање има свој оправдан став. Оваква испитивања се раде и када су у питању феноли и пестициди, а ако су испуњени одређени услови, хемијско-токсиколошка анализа може бити од помоћи у дијагностици интоксикације риба амонијаком. С друге стране, у дијагностици тровања риба неким супстанцама (хлор, сулфан, цијаниди) ова метода се не може користити.

Присуство метала у органима и ткивима рибе утврђује се атомском апсорпционом спектрофотометријом (ААС). Повећање концентрације метала најчешће се бележи у паренхиматозним органима и у шкргама риба. На пример, акутна интоксикација бакром може се дијагностиковати на основу хемијске анализе шкрга, где се концентрација метала повећава неколико пута. Садржај бакра у шкргама рибе у води која није контаминирана бакром је до 10 mg на 1 kg суве материје.

Тровање риба пестицидима на бази органо-фосфорних једињења може се дијагностиковати или директним одређивањем ових супстанци или њихових метаболита у органима и ткивима или индиректним одређивањем, на основу инхибиције ацетилхолин хидролазе углавном у мозгу рибе. Иста метода је применљива и за дијагностику интоксикације риба пестицидима на бази

карбамата. Дијагнозе интоксикације рибе другим пестицидима и другим органским једињењима заснивају се на одређивању ових супстанци у органима и ткивима рибе методом гасне хроматографије.

Друга хемијско-токсиколошка метода која се користи у дијагнози интоксикације је детекција фенола у риби. Хемикалије се детектују у месу и кожи рибе фотометријском методом и помоћу 4-амино-антипирина након поновљене дестилације ткива коришћеног за анализу.

Тровање рибе амонијаком се може дијагностиковати ако се одржавају неки услови (узимање узорака крви и мозга рибе током интоксикације или непосредно након угинућа рибе, извођење анализе у року од 48 сати при максималном замрзавању узорака), одређивањем амонијачног азота у крвном серуму и мозгу рибе. Ниво амонијачног азота у крвном серуму и хомогенату рибљег мозга најбоље је одредити помоћу комплета за тестирање амонијака у крви. Међутим, ниво амонијачног азота у серуму и мозгу рибе варира са брзином метаболизма и повећава се под дејством различитих штетних фактора, посебно недостатка O_2. Због ових околности немогуће је дијагностиковати интоксикацију риба амонијаком само одређивањем нивоа амонијака у крвном серуму: коначна дијагноза мора бити заснована на темељном испитивању квалитета воде и детаљном преглед здравственог стања рибе.

Присуство петролеја и његових производа у риби може се лако открити променама сензорних карактеристика: „мирис нафте“ се може детектовати у концентрацијама од чак 102 mg по литру воде. Контаминација воденог медијума фенолима и хлорофенолима може се открити на исти начин на или изнад одговарајућих концентрација од 0,1 mg по литру и 0,02 mg по литру. Овај метод детекције не захтева софистицирану лабораторијску опрему, иако је његова осетљивост повољнија у поређењу са хемико-токсиколошким испитивањем.

12.9. Радни задатак –дијагностика интоксикација

Питања:

1. Због којих материја у вишку могу настати интоксикације риба?

   _____

   _____

2. Због чега настаје некроза шкрга шарана?

   _____

   _____

   _____

3. Са којим организнмим се изводи биолошки тест за испитивање токсичности воде (заокружи тачан дговор)?

   1. акваријумске рибе (*Poecilia reticulata*)
   2. олигохетама
   3. водене бубе - *Daphnia*

4. Који све водени организми чине перифитну подлогу, и шта значи кад је она нарушена?

   _____

   _____

   _____

   _____

5. Дијагнозе интоксикације риба другим пестицидима и другим органским једињењима заснивају се на одређивању ових супстанци у органима и ткивима рибе методом _____.

13.0. ПРЕВЕНЦИЈА БОЛЕСТИ РИБА

Начини превенције и контроле болести риба су веома специфични и често различити од оних код топлокрвних животиња. Захтевају темељно познавање животне средине риба. Превентивни поступци се састоје од компликованог скупа третмана разрађених на основу доброг познавања етиологије болести и биологије домаћина (рибе). Ради се о елиминацији или ограничавању извора инфекције (инвазије) и могућности њеног даљег ширења, као и побољшању стања рибљег организма како би могао да издржи инфекцију (инвазију). Превенција је од основног значаја у контроли болести. До сада нису развијени специфични лекови за низ болести, а на резултат примене ефикасних, експериментално проверених лекова, често обрнуто утичу услови рада и/или технологија узгоја. Лечење на овај начин постаје економски ненадокнадиво. Поред тога, неки третмани се не могу изводити у одређеним периодима, нпр. у вегетационој сезони, током зимовања или у неким рибњацима који имају велике површине.

Зато је много важније спречити болести него их третирати. Ефикасне превентивне третмане треба примењивати пре свега у специјализованим рибњацима са затвореним топловодним системом, у фазама производње млађи, мрестилиштима, узгајалиштима пастрмки, зимовницима и акумулацијама.

13.1. Обезбеђивање извора воде без патогена

Подземне бунарске воде су најпогоднији извори воде без патогена. Ови извори су тренутно ограничени како за узгајалишта пастрмке и мрестилишта, тако и за друге посебне јединице за узгој рибе. Као извор дотока у већини случајева користе се површинске воде из река и канала. У овим ситуацијама одговарајући филтери могу делимично да смање број инвазија паразита у доводној води, пре свега при снабдевању мањих резервоара. Решетке се обично постављају испред ових филтера како би се одвојиле грубе честице. Пешчани филтери се састоје од скупа седиментационих одељака са филтером са влакнима и песком. Ови типови филтера хватају пре свега теже стадијуме паразита који нису у стању да се активно крећу (нпр. споре). Мања ефикасност се региструје у елиминацији покретних паразита.

Вода из рибњака са рибљим насадом је прилично неприкладна за ове намене (нарочито као извор доточне воде за узгајалишта пастрмки, мрестилишта и јединице за рибљу млађ).

Хемијски третман доводне воде је хитан поступак са често непожељним паралелним ефектима. Дезинфекција воде која улази у рибњаке УВ зрачењем још увек није уобичајен начин, иако се може сматрати једноставним методом уништавања вируса, бактерија и плесни. Пошто је доточна вода из река и канала благо замућена и садржи велики број суспендованих чврстих материја и растворених једињења, дезинфекциона ефикасност УВ зрачења је у овим ситуацијама значајно смањена.

Веома је исплативо снабдевати појединачне објекте и/или резервоаре независно, а не проточно. Воду из сваког рибњака или резервоара треба одвојено одводити и не би требало да тече у било који други. На овај начин могу се одвојити посебно карантински објекти и други резервоари.

13.2. Заштита од преноса патогена

Овај принцип подразумева пре свега пренос патогена неконтролисаним транспортом рибе и током мреста. Превоз рибе непознатог здравственог стања у принципу треба избегавати. Све рибе које се превозе морају имати ветеринарско уверење које потврђује да су рибе прегледане пре транспорта, да су здраве и да потичу из средине у којој се не појављују битне инфективне и друге преносиве болести. Списак ових болести је прецизно наведен у ветеринарским упутствима. Осим интерног прегледа за сваку земљу, за ветеринарску службу је обавезан и списак болести наведених у међународном кодексу. Ова листа се тренутно прецизира развојем дијагностичких метода и унапређењем знања о појединачним болестима риба. Неке вирусне и бактеријске болести могу се пренети и путем мреста. Њихов транспорт мора бити завршен истим ветеринарским сертификатом као и транспорт рибе из овог разлога.

Рибе које се уносе са других територија морају бити подвргнуте карантину у трајању од годину дана, без обзира да ли су домаће или стране врсте. Трајање карантина се може продужити нпр. у случају рибе увезене из иностранства до 3 године. Продужени период карантина је од посебног значаја, посебно код матичног материјала који ће се користити за даљу репродукцију.

Самоодрживост производње у индивидуалним фармама и сличним објектима за узгој рибе је значајан начин превенције од ширења болести. У рибњаке и воде које се порибљавају треба уносити само рибе које су претходно прегледане, без болести и третиране одговарајућим лековитим купкама. Порибљавање млађи из полувештачког и вештачког мреста које није у контакту са рибама виших старосних категорија такође смањује опасност од инфекције.

Спречавање уношења коровске рибе у рибњаке је други важан поступак који штити јединке од преноса патогена. Ове рибе су пре свега извор ектопаразита, опасних посебно у периоду смањене отпорности риба. Осим овога, могу пренети и неке друге патогене који могу довести до великих губитака важних врста риба. Адекватне решетке и филтери могу послужити за спречавање продирања коровске рибе.

Заштита рибоједних птица да уђу у објекте за узгој рибе је превенција која ограничава ширење неких болести риба, јер су рибе прави домаћини за велики број паразита. Заштитне мреже могу да се користе за спречавање улетања птица. Бројност рибоједних птица треба пратити, а велики број врста је забрањено ловити што је регулисано правилницима о заштити животиња.

Превентивно сузбијање пужева као међудомаћина неких рибљих паразита може се вршити биолошким (уношење црног амура који једе пужеве), механичким (постављање мреже на довод), физичким (сушење и замрзавање дна) и хемијски (примена молускоцида) методама.

Безбедно и нешкодљиво уклањање угинуле рибе је значајан начин за спречавање даљег преноса рибљих патогена. Свежа или мало распаднута мртва риба деконтаминира се у адекватној кафилерији. Угинуле рибе мање масе спаљују се или закопавају у дубоке јаме (око 2 метра) на удаљености од најмање 20 m од обале рибњака. Дно ове јаме и мртве рибе морају бити покривени гашеним или хлорисаним кречом. Слој земље од најмање 60 – 80 cm мора покрити садржај јаме.

13.3. Дезинфекција рибњака и опреме; зимско смрзавање и летње исушивање објеката

Дезинфекција је од великог значаја у превенцији и отклањању болести риба. Превентивна дезинфекција штити рибљи насад од патогена. На овај начин се побољшава хигијена услова животне средине за рибе. Фокална дезинфекција се врши ради сузбијања жаришта опасне болести риба.

Природне физичке појаве се у потпуности користе за дезинфекцију у интензивном узгоју рибе због својих еколошких погодности. То се односи на сушење и замрзавање дна рибњака. Већина патогена умире након исушивања дна објеката када је његова релативна влага опала за 10 – 15 %. Замрзавање влажних места и сунчево зрачење (пре свега својим УВ зрацима) веома повољно делују у нашим условима. Утицај ових природних физичких појава експлоатише се летњим исушивањем и зимским залеђивањем акумулација (објеката). Летње сушење је радикална, дуготрајна интервенција током које се контролишу сви патогени због исушивања дна рибњака. Циљ зимског сушења је уништавање патогена замрзавањем. Безбедно доводи до уништавања пијавица (*Piscicola geometra*), рибљих вашки (*Argulus* sp.), предаторских ларви водених инсеката, јаја и спора паразита, као и других патогена. Коришћење природних начина дезинфекције недостатак је у обично дуготрајном трајању (од неколико месеци до једне године).

Хемијска дезинфекција је ефикасан начин превенције и/или сузбијања болести риба. У узгоју рибе користе се обично доступни дезинфекциони препарати (нпр. гашени и негашени креч, хлорни креч, азотни креч, натријум хидроксид, калијум перманганат, хлорамин, хлорсептол, јодонал итд.). За дезинфекцију дна бара и акумулација најчешће се користи негашени креч у дози од 2,5 – 3 t/ha или хлорни креч у дози од 0,5 – 0,6 t/ha. У случају миксоспороза примењује се азотни креч (5 t/ha, односно 0,5 t/ha). Непосредно након извлова рибе врши се дезинфекција изловне јаме и блатњавих влажних места на великим објектима где није могућа дезинфекција целе површине дна. За третирање бетонских канала могу се користити хлорни креч (200 – 400 mg/l), 0,5% воденог раствора натријум хидроксида, хлорамина и хлорсептол (30 g/l) или друга дезинфекционих средстава. Иста дезинфекциона средства и концентрације треба да се користе за третман опреме. У ове сврхе се могу користити и калијум перманганат (5 g/l), јодонал (2,8 – 4,5 ml/l) и друга дезинфекциона средства. Икра, нарочито на пастрмским рибњацима треба обавезно да се третира против развоја гљивица из рода *Saprolegnia.* То се спроводи најчешће применом купки са водоник пероксидом.

13.4. Оптимизација услова средине

Оптимизација природних услова животне средине је главни предуслов за обезбеђивање доброг здравственог стања риба у периоду узгоја. Морају се обезбедити следећи принципи:

- ◊ Оптималан квалитет воде без стресних физичко-хемијских ефеката. (државање концентрације кисеоника на оптималном нивоу и заштита од загађења воде су од посебног значаја),
- ◊ максимални развој природних ресурса исхране, исхрана риба допунским смешама у довољној количини и квалитету (пажња треба обратити пажњу на квалитет појединих компоненти хране и биофактора), основни превентивни аранжмани који штите ране развојне фазе и младе рибе од бактерија и протозоа, укључујући довољну количину природне хране одговарајуће величине и састава врста,
- ◊ одговорно успостављање максималне густине насељености. (еадекватно велика густина доводи до стресног понашања, погоршања стања и отпорности и олакшава ширење болести). Густина насељености је од посебног значаја у узгоју пастрмки и узгоју рибе у посебним интензивним јединицама и
- ◊ превенција стресних ситуација изазваних другим факторима, пре свега манипулацијом током излова, транспорта и дуготрајног складиштења.

13.5. Редовна контрола здравственог стања и превентивно третирање риба

Превентивну контролу здравственог стања риба треба вршити два пута недељно у мрестилиштима и јединицама за узгој млађи, а у високопродуктивним интензивираним рибњацима, узгајалиштима пастрмки и рибњацима са рециркулацијом загрејане воде једном недељно. Остали насади (нарочито у уобичајеној рибњачкој производњи) се истражују месечно.

Здравствено стање рибе увек треба контролисати пре излова, транспорта и порибљавања. Превентивни третман се може предложити на основу резултата истраживања. Овај третман се обавља пре свега уношењем лекова у водену средину и храњењем пелетираном храном са додатком лекова.

13.6. Радни задатак –превњница болести

Питања:

1. На који начин се спречава уношење патогена путем воде којом се снабдева рибњак?

   _____

   _____

2. Како спречити улазак коровске рибе у рибњаке?

   _____

   _____

   _____

3. Која вода је најбезбеднија са аспекта уноса патогена (заокружи тачан дговор)?

   1. бунарска
   2. каналска
   3. речна

4. Наведите најзначајнија хемијска средсва којима се спроводи дезинфекција у рибарству ?

   _____

   _____

   _____

   _____

5. Чиме се третира оплођена икра пастрмки ради спречавања развоја гљивица из рода *Saprolegnia* ?

   _____

   _____

   _____

   _____

14.0. СПРОВОЂЕЊЕ ТЕРАПИЈЕ У АКВАКУЛТУРИ И НАЈВАЖНИЈИ ЛЕКОВИ У УПОТРЕБИ

Рибе се подвргавају терапији у оним случајевима када је болест толико развијена да је живот риба одмах угрожен или се очекује да ће бити угрожен у наредном периоду. Терапијски третман треба посматрати као хитну меру којој се прибегава када превенција није успела.

Терапеутски третмани могу бити следећи:

- ◊ примена терапеутских супстанци и препарата у водену средину (терапеутске купке за рибе и икру)
- ◊ давање терапеутских супстанци у храни
- ◊ давање терапеутских супстанци преко сонде
- ◊ давање терапеутских супстанци путем инјекција

14.1. Примена терапеутских супстанци и препарата у воденој средини

Терапеутске супстанце се стављају у воду за сузбијање ектопаразитских, гљивичних и бактеријских обољења површине тела и шкрга. У неким случајевима се терапеутске купке могу користити и (након апсорпције активних супстанци преко коже) за сузбијање узрочника унутрашњих болести.

Према дужини излагања, терапеутске купке се деле на следећи начин:

- ◊ купке за потапање (до 5 минута)
- ◊ краткотрајне купке (5 минута до 2 сата)
- ◊ дуготрајно купање (2 сата до неколико дана)

Дуготрајна купања обухватају и третман терапеутским супстанцама, целих базена и рибњака. Списак препарата и супстанци које се најчешће користе за различите врсте купки дат је у табели 14.

Табела 14. Хемијске супстанце које се користе за терапијске купке код риба.

Тип терапеутског третмана		
имерзија	краткотрајни	дуготрајни
Lysol	NaCl	малахит зелено*
кречно млеко	водоник пероксид	acriflavin
$KMnO_4$	малахит зелено*	антибиотици
trypaflavin	$KMnO_4$	метронидазол
малахит зелено*		NaCl
$CuSO_4.5H_2O$		$KMnO_4$

*Малахит зелено се може користити смо код акваријумских риба.

Општи принципи терапеутских купки за рибе

Да би се терапеутске купке извеле ефикасно и да би се избегли губици рибе, морају се поштовати бројни општи принципи, укључујући:

1) Здравствено стање рибљег фонда мора се континуирано пратити како би се најефикаснија терапеутска купка могла одмах изабрати и применити: рибе у поодмаклој фази болести су исцрпљене и слабе и могу се лако усмртити излагањем леку у купки.

2) Резултати прегледа рибе служе као основа за одређивање врсте терапеутских купки. Већина терапијских препарата је токсична за рибе у већим концентрацијама, па се упутства морају стриктно поштовати. Супстанце и препарати који се користе за купке морају бити свеже, упаковане у оригиналну амбалажу. Доза која се користи мора бити тачно израчуната како би се избегло тровање рибе предозирањем или да би се избегао лош ефекат ако је доза прениска. Ако се у упутствима наводи распон доза између две границе, онда се мања количина даје ослабљеној риби, а већа риби у добром стању. Лекови морају бити растворени пре наношења у воду; само наношење се врши прскањем по површини воде. Код супстанци и препарата који се користе за дуготрајно терапијско лечење риба у акумулацијама и објектима, требало би да постоји задовољавајућа разлика између леталне концентрације (LC) за узрочник болести и LC за рибу. Терапијски индекс (говори колико је пута LC дате супстанце за рибу већа од оне за узрочника болести) треба да буде најмање 4 или изнад 4, максимално 10. Терапеутска средства која се користе у купкама морају бити лако растворљива у води и морају се лако разградити.

3) За припрему раствора за купку мора се користити свежа и неконтаминирана вода. Физичко-хемијске карактеристике воде утичу на ефикасност терапијских супстанци и препарата, као и на њихову токсичност за рибе. Најважније карактеристике воде су температура, pH, концентрација органских материја, киселински капацитет (алкалност), $\sum$ Ca + Mg и др.

4) Тест толеранције мора бити спроведен пре сваког купања. Тест толеранције је биолошки тест на неколико риба да би се видела безбедност или штетност терапеутске купке за рибљи насад који се третира у постојећим условима.

5) Саме терапеутске купке се праве у резервоарима од потпуног стакла, кадама од стаклених влакана, бачвама, пластичним коритима од стаклопластике, у бетонским или земљаним базенима или директно у рибњацима. Такође је могуће подвргнути рибу краткотрајним терапеутским купкама у транспортним кутијама током транспорта ако је време испоруке исто или краће од препорученог времена излагања.

6) Рибама не треба давати храну пре купања у води или краткотрајног купања, да би се избегла повећана потреба за кисеоником. Рибе изложене дуготрајном купању, са периодима излагања неколико дана, морају се хранити

допунском храном. Морају се припремити сценарији за ванредне ситуације за спречавање могућих несрећа: објекти за аерацију воде морају бити спремни за употребу, или треба предузети мере предострожности за брзо вађење рибе из купки и стављање у свежу (по могућству текућу) воду. Чиста и безбедна вода мора бити доступна за брзо разблаживање раствора за купање. Резервоари са терапијским растворима никада не смеју бити пренатрпани: риба мора имати довољно простора да се слободно креће и раствор мора доћи до сваке тачке на површини тела сваке рибе. Купка од 100 литара може да прими максимално 30 kg рибе, а раствор за купање се по правилу замењује након третирања 5-10 сетова риба.

7) За дуготрајно купање директно у рибњаку, супстанца или препарат се или наноси у једној серији у довод или се може равномерно распоредити по површини воде у рибњаку. За цео период третмана ток воде кроз рибњак мора бити заустављен и око њега постављене табле упозорења. Остаци терапеутске супстанце морају потпуно нестати пре него што се дозволи да вода поново тече кроз рибњак. Ретко се прибегава третману целог рибњака: спроводи се када су рибе у акутној опасности. Проблем са купкама тако великих размера је да заједно са узрочницима болести лек који се користи у купки убија и организме у ланцу исхране, чиме се смањује хранљиви капацитет рибњака.

8) Када се третман заврши, рибу треба извадити из купке и ставити у чисту (по могућству текућу) воду. Ако је третман обављен у целом рибњаку, улазни извор мора бити довољно јак да омогући брзо разблаживање раствора за купање. Сви прописи и стандарди који се односе на очување квалитета површинских вода морају се поштовати при испуштању употребљеног терапијског раствора ван рибњака. У већини случајева коришћени раствори се одлажу ван водене средине: на пример, остављају се да продре у земљу на местима где не постоји опасност од продора у површинске или подземне воде.

9) Ефикасност терапеутских купки мора се проверити макро и микроскопским прегледом најмање 5 риба из сваког објекта или резервоара након испирања третиране рибе у чистој води. То се мора урадити одмах након купања, најкасније у року од једног дана од престанка купања.

10) Општи је принцип да тржишну рибу не треба третирати терапеутским купкама 14 дана пре отпреме на тржиште.

11) Морају се предузети све мере заштите на раду током третмана риба терапеутским купкама.

Преглед најважнијих хемикалија и препарата који се користе у терапеутским купкама за рибе

Натријум хлорид (NaCl) се широко користи у узгоју рибе за контролу паразита од најранијих фаза млађи до тржишне рибе. Како разлика између леталних концентрација натријум хлорида за рибу и паразите није велика, потребно је током лечења придржавати се општих принципа, посебно упутстава

која се односе на тестове толеранције. Посуде обложене цинком никада не би требало да се користе за NaCl купке. Натријум хлорид се углавном користи у облику краткотрајних купки које су прилично ефикасне у сузбијању врста из родова *Criptobia, Ichthiobodo, Chilodonella, Trichodina* и *Trichodinella*, а нешто мање ефикасан је у сузбијању врста из родова *Dactilogirus, Girodactilus, Piscicola, Argulus* и у случајевима гљивичних обољења.

Слано купатило се припрема растварањем 10 до 30 g NaCl у једном литру воде. Време излагања је 15 до 30 минута. Ако је потребно, слано купатило се може поновити код већине врста. У раним фазама млађи, третиране на температури воде од 20 до 25°C, добри резултати се постижу при концентрацији од 10 g по литру и при времену излагања од 30 минута. За циприниде користи се концентрација NaCl од 20 g по литру у времену експозиције од 15 минута за третирање слабије млађи. Купке истих карактеристика могу се користити и за лечење салмонида. Јаче млађи и старије рибе групе ципринида могу се успешно третирати купањем у концентрацији од 30 g по литру у трајању од 25 до 30 минута. Треба узети у обзир да је при температурама воде испод 5°C ефикасност сланих купатила значајно смањена. Натријум хлорид се такође може користити за дуготрајне купке (концентрација 1–2 g по литру, време излагања 1–2 дана) у случајевима појаве хилодонелозе код риба које се држе у рибњацима за складиштење или привременим објектима у јесен или пролеће.

Супстанце и препарати који садрже бакар користе се за терапеутске купке риба, иако имају токсично дејство у воденој средини. $CuSO_4$ x $5H_2O$ се најчешће користи за сузбијање неких гљивичних, паразитских и бактеријских болести риба. Тренутно је његова употреба ограничена на контролу флексибактериозе шкрга код салмонида. Користи се у облику купке за потапање (концентрација 0,5 g по литру, излагање 1 минут), а добри резултати се такође постижу када се хемикалија нанесе на проточни резервоар.

Још једна супстанца која се користи за третман риба против паразита је бакар у облику оксихлорида [$3Cu(OH)_2CuCl_2.H_2O$]. Користи се за краткотрајно купање када се открије да рибе садрже врсте из родова *Criptobia, Trichodina, Trichodinella* и *Chilodonella*. Ова супстанца је такође добар мекускоцид, користи се за сузбијање водених мекушаца, посебно оних из рода *Limnea*, који су међудомаћини узрочника озбиљних рибљих паразитоза. Препарати на бази бакар оксихлорида укључују Куприкол 50, који садржи најмање 47,5% активног састојка. Користи се у концентрацији од 30–70 mg по литру 15–30 мин за лечење шарана и амура. Код осталих риба терапијска доза Куприкола 50 је на нивоу леталних концентрација. За убијање водених мекушаца, Куприкол 50 се користи у количини од 15-30 kg по ha (ако је просечна дубина језера 1 m).

На терапеутску ефикасност $CuSO_4$ x $5H_2O$ и бакар оксихлорида, као и на њихову токсичност за рибе, значајно утичу физичка и хемијска својства воде (Табела 15), нарочито алкалитет.

За контролу сапролегнијазе на икри код каналског сома: додати 10 mg/l бакар сулфата за за проточну воду која се користи у лежионицама једном дневно док ембриони (јаја) не развију очи; проток треба да омогући 1 замену сваких 30 минута.

Табела 15. Терапијске концентрације бакар сулфата у води са различитим алкалитетом (mg/L=ppm).

Алкалитет воде (mg/L)	Третман (mg/L)
0-49	Не треба третирати
50-99	0.50-0.75
100-149	0.75-1.00
150-199	1.00-2.00
200+	Неефикасан, таложиће се као $CuCO_3$

Акрифлавин (трипафлавин) је смеђе-црвени кристални прах растворљив у води. Препоручене терапијске концентрације акрифлавина су неколико пута ниже од леталних концентрација за рибе (терапијски индекс је око 5). Из тог разлога, купке са акрифлавином могу се сматрати релативно безбедним за рибе. Акрифлавин се користи у облику дуготрајних купки (концентрација 10 mg по литру, експозиција 10 сати), најчешће у узгоју акваријумских риба: због дугог времена излагања, ове купке нису баш честе у узгоју рибе. Акрифлавин контролише протозое риба и бактеријске болести на површини рибљег тела. Препоручује се коришћење дуготрајних арифлавин купки у концентрацији од 3 mg по литру (време излагања 12 сати-поновљено три пута) за сузбијање локалних флексибактериоза код пастрмке, јегуље и шарана.

Кречно млеко се припрема тако што се 2 g новосагорелог креча раствори у једном литру воде. Користи се у облику купки за имерзију за убијање *Piscicola geometra*. Млади шарана су изложени овој купки 5 секунди. За кахектичну рибу после лоше хибернације време експозиције је 10 секунди, а за шаране у добром стању и старије шаране време експозиције се креће од 15 до 20 секунди. Кречна купка се не препоручује рибама са осетљивим шкргама (штука, пастрмка).

Lysol је дезинфекциони водени раствор крезола са калијумовим сапуном. Користи се у концентрацији од 2 ml по литру у облику купки за потапање (5–15 секунди) за сузбијање врста родова *Argulus* и *Piscicola*. Lysol се не препоручује за салмонидае.

Калијум перманганат се користи у облику купки за потапање (1 g по литру, 30–45 секунди), краткотрајних купки (0,1 g по литру, 5–10 мин; 0,01 g по литру, 60–90 мин) као и дуготрајних купки за сузбијање гљивичних обољења, паразита (када се јављају протозое) и бактеријских обољења. Купка калијум перманганата у концентрацији од 1 g по литру у трајању од 150 секунди испитана је са добрим резултатима за сузбијање *Eudiplozoon nipponicum* код виших старосних категорија шарана. Ова купка се не може користити на температурама већим од 10°C. Дуготрајни третмани се изводе у објектима за складиштење или другим објектима ради лакшег руковања рибом; концентрација је 0,3 до 0,6 mg $KMnO_4$ по литру воде, време излагања 12 сати. Терапеутске дозе калијум перманганата су веома близу леталних концентрација за рибе, тако да се третман мора спроводити веома пажљиво, посебно са акваријумским рибама. Треба имати на уму да лети када је вода топла ова купатила могу бити опасна за рибу. Када се

рукује рибама из легла, локалне повреде на њиховим телима третирају се крпом или сунђером натопљеним калијум перманганатом.

Метронидазол може се користити за купке у концентрацији од 4 mg по литру 2-3 дана. Метронидазол се апсорбује преко шкрга и производи у крви терапеутски ефикасну концентрацију за убијање паразитских флагеллата, нпр. род *Hexamita*. Купка је посебно погодна за третман акваријумских риба.

35% Пероксид (водоник пероксид) је одобрен за контролу смртности од гљивице *Saprolegnia parasitica* код икре слатководних риба у концентрацији 500 – 1000 mg по литру (mg/L) током 15 минута у систему непрекидног протока једном дневно, до излегања за све хладноводне врсте слатководних јаја или 750-1000 mg/L током 15 минута у систему непрекидног протока једном дневно до изваљивања за све топловодне слатководние врсте. 35% Пероксид је одобрен за контролу морталитета салмонида узгајаних у слаткој води због бактеријске болести шкрга повезаних са *Flavobacterium branchiophilum*. Примењује се у дози од 50-100 mg/L током 60 минута једном дневно у наизменичним данима за три третмана у непрекидном снабдевању водом или као статичко купатило. Пероксид од 35% је одобрен и за контролу инфекција са *Flavobacterium columnare* код хладноводних риба и сома.

Креч се широко користи за неутрализацију киселости, повећање укупне алкалности и повећање укупне тврдоће у земљишту и води рибњака за узгој рибе. Дозирање: Најчешћи препарати/облици су пољопривредни кречњак[калцит ($CaCO_3$) и доломит ($MgCO_3$)], хидратни или гашени креч [$Ca(OH)_2$] и негашени креч (CaO). Током припреме рибњака, наноси се креч на дно рибњачког објекта у дозама од 100-8.000 kg/ha или у воду током узгоја 10-500 kg/ha. Најчешће се користи 2000-4000 kg/ha креча годишње.

Антибиотици се препоручују за употребу у облику терапеутских купки за сузбијање бактеријских обољења коже и шкрга риба. Ове купке се користе углавном у акваристици, а данас и у узгоју младих стадија риба у посебним објектима за узгој рибе. Пре третмана, антибиотик мора бити добро изабран у погледу његовог ефекта у контроли бактерија одговорних за болест од које рибе болују. Терапеутске дозе антибиотика су реда десетине mg по литру при дуготрајним купањима и реда стотине mg при кратким купањима.

Метода третмана применом привременог повећања температуре воде изводи се сукцесивним повећањем температуре воде на 31–32°C током 3 дана, а затим поновним снижавањем температуре на почетни ниво. Рибљи насад се ослобађа од инфекције и стиче значајан ниво имунитета. У пракси узгоја рибе ова метода се користи за сузбијање ихтиофтиријазе углавном код акваријумских риба и у специјалним објектима за топлу воду. У узгоју ципринида и сома у раним фазама, загревање је једини ефикасан и практично применљив метод сузбијања ихтиофтиријазе. Такође овај третман се користи код вирусних инфекција чија репликација се одвија на нижим температурама воде од температура које се постижу током третмана.

Анастетици код риба се такође најчешће примењују преко воде. Најчешће се користи tricaine methanesulfonate (или MS 222).

Одобрене индикације: MS 222 је одобрен за привремену имобилизацију риба, водоземаца и других водених, хладнокрвних животиња. Користи се код ових животињама најчешће током манипулације и радњи везаних за ручни мреест, вагање, мјерење, обележавање, хируршке операције, транспорт и истраживања. Дозирање: 10-1.000 mg/L. Превентивне мере: Може изазвати иритацију коже и очију. Може бити штетан ако се апсорбује кроз кожу. Може бити штетно ако се инхалира или прогута. Каренца му је 21 дан.

14.2. Примена терапијских супстанци у сточној храни

Давање лекова садржаних у сточној храни се данас све чешће практикује у свим врстама узгоја рибе. Овај приступ је повољан, а самим тим и обећавајући, углавном са становишта рада рибњака. Код ципринида, јединке морају бити привучене и концентрисане, колико год је то могуће, око хранилишта, а такође и навикнуте на примењену храну, пре него што се може започети сам третман. Давање исте хране као и обично, али која садржи лекове, може се обавити када има доста кисеоника у води и рибе похлепно узимају храну. У већим акумулацијама рибу је тешко навикавати на редовно храњење, посебно у оним акумулацијама где је доступна већа количина природне хране. Код салмонида је веома лако давати лекове уз храну. Пре третмана препоручљиво је прескочити једно храњење како бисте били сигурни да ће риба узети лековиту храну што је пре могуће и похлепно. Недостатак је што болесне рибе узимају сукцесивно све мање количине хране која им се нуди. Јако заражене рибе уопште не узимају храну, тако да третман на њих нема ефекта.

Терапеутски лекови се дају или као лековита пелетирана храна или се мешају са храном директно на рибњаку.

У медицинским гранулираним хранивима лек је уграђен у пелете. Пелете су тврде, али омекшају и набубре у додиру са водом, где остају компактне 12 сати.

Најчешћи хемиотерапеутици који се могу наћи и који смешају у пелетирану храну за рибе су следећи:

Oxytetracycline hydrochloride је антибиотик који се користи за лечење системских (унутрашњих) бактеријских инфекција. Одобрен је за лечење бактеријске хеморагичне септикемије изазване *Aeromonas liquifaciens*, псеудомонозе код каналских сома и за лечење фурунцулозе изазване бактеријом *Aeromonas salmonicida*. Користи се као додатак храни у количини од 2,5 грама лека (активног састојка)/45 kg тежине рибе дневно током 10 дана. Потребан је период каренце од 21 дан пре него што се риба може користити за људску исхрану.

Fluorfenicol је најновији означени антибактеријски лек доступан за употребу код риба. Најчешће се користи за следеће индикације: код каналских сома за лечење инфекције *Edwardsiella ictaluri* и код салмонида за инфекцију *Aeromonas salmonicida* и инфекцију *Flavobacterium psychrophilum* употребом дозе од 10 mg по kg рибе дневно током 10 дана; код сома, тилапије и свих осталих риба

гајених у слаткој води у дози од 10 – 15 mg/kg телесне тежине/дан током 10 дана за контролу морталитета од болести колумнарис повезане са *Flavobacterium columnare*; код свих топловодних риба које се узгајају у слаткој води у дози од 15 mg/kg током 10 дана за контролу морталитета услед стрептококне септикемије повезане са *Streptococcus iniae*. Каренца за све рибе је15 дана.

Sulfadimethoxine–ormetoprim је комбинација два антибактеријска лека која има одобрење за лечење фурункулозе код салмонида и ентеричке септикемије код каналских сома. У оба случаја се користи као додатак исхрани у количини од 50 милиграма лека (активног састојка)/килограм тежине рибе/дан током 5 дана. Каренца од 42 дана је потребна за салмониде, а 3-дневна каренца за каналског сома пре него што се риба може користити за људску исхрану.

Никлозамид је препарат који је веома ефикасан у контроли паразитских инфекција изазваних ендопаразитима, првенствено се користи код бориоцефалозе, кавиозе и кариофилеоза ципринида, те протеоцефалоза калифорнијске пастрмке.У храну се меша најшчешће у концентрацији: 7 g никлозамид пиперазинске соли, помоћне и апетитне супстанце 46,25 g, млевени кречњак 100 g, пшенично брашно до 1 kg. Постоје и другачити протоколи дозирања, коао што је примена никлозамида у концентрацији од 2g/kg хране која се даје у два поновљена третмана.

Начин примене: Медикамнтозна храна се користи у било које годишње доба када рибе узимају храну. Даје се на уобичајена места за храњење или једном или више пута у току 48 сати како би се омогућило максималном броју риба да узме пелете. Количина која се даје риби треба да буде једнака 1–2 % тежине рибљег насада (укупне ихтиомасе) у време третмана. Ефикасност лечења се мора проверити паразитолошким прегледом црева 2-4 дана након третмана. Ако се поново открије да се живе пантљичаре појављују, третман треба поновити.

Остали лекови који се примењују у храни укључују, посебно, разне антибиотике, сулфонамиде, фуразолидон, еритромицин, carboneum tetrachloratum, метроноидазол и друге. Они се додају у храну непосредно пре примене. Најбоља храна за циприниде за наношшење лекова је пшенична крупица или пшенично брашно са високим садржајем глутена; за салмониде најбоља храна за такве сврхе је млевена слезина или млевена говедина.

Антибиотици који се дају у храни користе се за контролу бактеријских болести риба. Хлорамфеникол је био најчешће коришћени антибиотик: има широк спектар деловања, али у исто време и низ нежељених нуспојава, стога се он више не користи у терапији болести риба. Најбољи антибиотик за лечење сваке одређене болести пожељно је изабрати на основу резултата тестова осетљивости на антибиотике код патогених бактерија.

Сулфонамиди се такође могу успешно користити за лечење бактеријских болести риба, посебно фурункулозе код салмонида. Дају се храном у количини од 0,1-0,25 g на 1 kg живе тежине рибе током 8 дана.

Фуразолидон је успешно коришћен у сузбијању бактеријских болести (посебно фурункулозе салмонида и еритродерматитиса шарана) и паразитских болести риба (посебно хексамитоза салмонида, делимично и кокцидиозе шарана).

За лечење риба оболелих од бактеријских болести, фуразолидон се додаје у храну у количини од 0,1-0,2 g на 1 kg живе тежине рибе и примењује се 8 дана. За сузбијање хексамитозе пастрмке доза је 0,5 g на 1 g тежине хране и давање се наставља 10-14 дана.

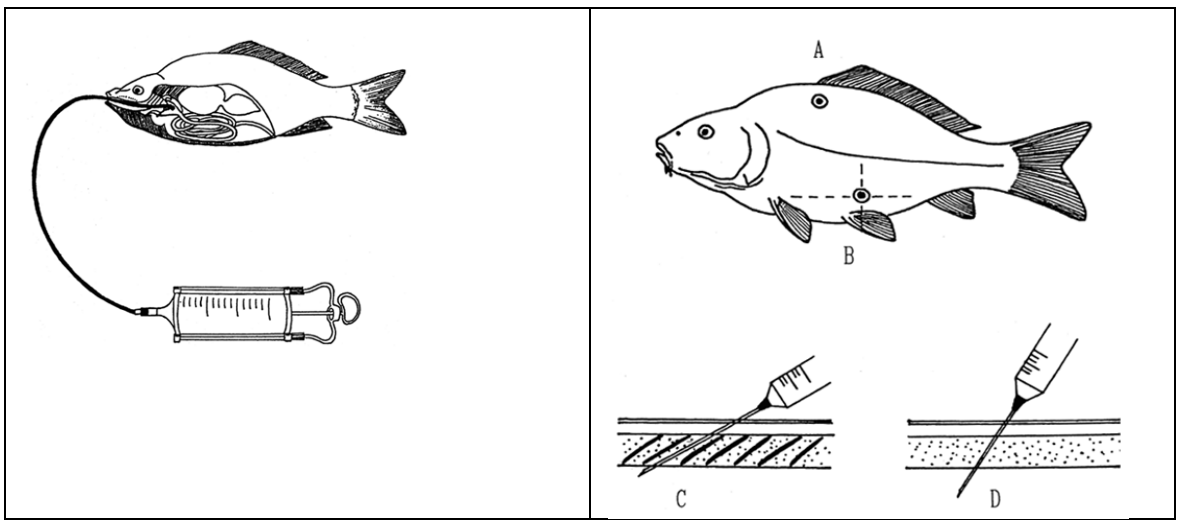
Ампролијум се такође може користити код кокцидиозе шарана.

Carboneum tetrachloratum (CCl_4) се користи за сузбијање најраспрострањеније акантоцефале, *Neoechonorhynchus rutili*. У суву храну (крупица) додају се једнаки делови CCl_4 и парафинског уља, а концентрација је (у појединачном третману) 0,5 ml CCl_4 на 1 kg живе тежине.

Метринидазол је добар терапеутски препарат за лечење хексамитоза и других инфекција изазваних протозоама бичарима у количини од 0,25 g на 1 kg хране, са третманом 3 дана.

14.3. Примена терапијских супстанци преко сонде

Овом начину примене лека прибегава се у изузетним случајевима за лечење ограниченог броја риба или током извођења експеримената. Код ципринида лек се примењује преко еластичног црева дебелих зидова од пластичног материјала, повезаног шприцем. Црево се уводи дуж централне уздужне осе горњег непца. Тренутак када црево удари у фарингеалне зубе може се јасно идентификовати (осећајући благи удар). У овом тренутку црево треба уметнути, уз лагано увијање, између фарингеалних зуба и плоче за дробљење. Црево треба угурати веома лагано и само до дубине где се отвара у једњак (Слика 29), а затим следи давање лека.



Слика 29. Примена лека преко сонде и инјекционим путем: A - место инјекције за давање лека у мишић; B - у телесну шупљину; C - угао под којим се игла уводи у тело рибе са крљуштима; D - рибе без крљушти. (Svobodová, 1991).

14.4. Давање терапеутских супстанци путем инјекција

У прошлости је инјекциони начин примене терапијских супстанци коришћен углавном у лечењу шарана. Интраперитонеална примена (у телесну шупљину) коришћена је углавном са хлорамфениколом, а касније и са вакцином против пролећне виремије (превенција болести). Међутим, масовна употреба ових третмана сада постаје све ређа због великог напора и честих механичких повреда и напрезања. Терапијске и превентивне супстанце се дају у сточној храни, колико је то могуће.

Ипак, инјекциони третман ће се и даље практиковати у малим групама риба, посебно код матичних риба, код риба кућних љубимаца, у експериментима и др. Матичне рибе могу на овај начин да добију, на пример, различите антибиотике, вакцине, полне хормоне (у периоду пре мреста) и друге супстанце; Лек или полни хормон се убризгава у телесну шупљину (интраперитонеална примена) или у мишић (интрамускуларна примена).

За интраперитонеалну апликацију, место где се игла треба убризгати је на левој страни тела рибе на месту пресека две фиктивне линије, прве која почиње од основе грудног пераја и иде дуж уздужне осе тела, а други почев од приближно центра вентралне пераје и иде усправно на прву (Слика 29). Важан је и угао под којим се игла уводи у тело. Код рибе без крљушти он треба да буде од 20 до 30 степени, код рибе са крљушти од 10 до 15 степени, при чему игла пролази између две узастопне љуске (слика 18). Лек лако тече из игле убачене у зид тела, а испод коже се појављују видљиве мрље.

За интрамускуларну примену шарану, место убризгавања је на левом боку 1 до 2 cm иза предњег краја леђне пераје и 3 до 4 cm испод њега. Код осталих риба место убода је на граници између прве и друге трећине тела, 2 до 3 cm испод горње линије. Иглу и место убода треба обрисати крпом или сунђером, умоченим у 1% раствор калијум перманганата.

14.5. Радни задатак – спровођење терапије и израчунавање концентрације лекова

Одговорите на питања:

1. Наведите начине администрације лекова и лековитих супстанци код риба?

   _____

   _____

2. Зашто је код примене бакар сулфата неопходно водити рачуна о алкалитету, и при ком алкалитету воде је контраиндиковано примењивати купке бакар сулфата?

   _____

   _____

   _____

3. Наведите најзначајније препарате који се користе у виду купки?

   _____

   _____

   _____

4. Наведите најзначајније антибиотике и антипаразитике који се за терапију риба користе применом у храни?

   _____

   _____

   _____

Пример 1

Имате бетонски канал са калифорнијском пастрмком која је заражена паразитском протозоом, *Ichthyophthirius*. Одлучили сте да третирате рибу бакар сулфатом ($CuSO_4$). Бетонски канал садржи 19 000 литара воде са алкалношћу од 75 милиграма по литру (mg/L или ppm). Колико $CuSO_4$ бисте користили?

Израчунај:

Пример 2

У рибњаку имате сома са дијагностикованом бактеријском (*Aeromonas hydrophila*) инфекцијом. Рибњак садржи 100 риба које су у просеку тешке око 900 g свака, што је укупно 90 kg рибе. Бактерија је осетљива на oxytetracycline hydrochloride. Како бисте припремили третман?

Израчунај:

15.0. ПРИМЕНА ВАКЦИНА КОД РИБА

Унапређење вакцинације је једно од најважнијих актуелних приоритета. Лечење многих бактеријских инфекције код риба само са антимикробним лековима је у многим случајевима тешко изводљиво, а за вирусне инфекције које представљају велики проблем и претњу развоју аквакултуре због великих морталитета и тешке контроле, вакцинација уз биосигурносне мере представља значајну могућност у контроли болести. У последње вртеме постоје побољшања на пољу вакцинологије код риба. Нека од побољшања укључују имунизацију великог броја јединки у исто време и развој мултивалентних вакцина. Вакцинација у аквакултури смањује употребу антибиотика и штити рибу од заразних болести. Такође, смањује ризик од резистенције на лекове. Постоји неколико важних питања које треба размотрити и узети у обзир пре примене вакцина код риба. Ова разматрања укључују следеће тачке:

- ◊ рибље врсте које треба вакцинисати,
- ◊ статус имуног система риба,
- ◊ производни циклус,
- ◊ које болести треба контролисати у аквакултури,
- ◊ када и да ли се ове болести јављају,
- ◊ технологија узгоја (руковање и механизација),
- ◊ окружење (температура и салинитет),
- ◊ фактори стреса, исхрана и економичност производње.

Вакцинација риба започета је вакцинацијом против *Aeromonas salmonicida* инфекција у Cutthroat-у 1942. Тренутно је у употреби конвенционални тип вакцина, због недостатка информација о имунологији риба. Доступне си вакцине за ињекције са уљним адјувансима и за имерзиону примену у води. Вакцине против интрацелуларних бактеријских и вирусних патогена биће један од великих изазова за наредне године. ДНК вакцина ће играју улогу у таквим случајевима.

Вакцине у аквакултури могу бити класификоване као следеће:

- ◊ Мртве вакцине
- ◊ Инактивисане
- ◊ ДНА вакцине
- ◊ Рекомбинантне векторске
- ◊ Субјединичне
- ◊ Генетски модификоване вакцине
- ◊ Синтетске пептидне вакцине

Целе вакцине против микроорганизма показале су бољу предност од других врста вакцина. Међутим, већина вакцина не може потпуно спречити болест. Антигени су слаби у већини конвенционалних вакцина које не могу створити добар имунитет код примаоца. Додатно, вакцинација неће бити довољна

да би се спречило појављивање емегрентних патогена, присуство антигенских shift –ова и drift-ова. Због тога се развијају напредне технологије дизајнирања вакцина како би се открили новији типови ефикасних вакцина.

15.1. Мртве вакцине

Мртве вакцине су конвенционалне врсте вакцина припремљених убијањем инфективног агенса и употребом као антигена да изазове имуни одговор домаћина. Већина комерцијалних вакцина које се тренутно користе у аквакултури су мртве врсте вакцина. Главне предности ових вакцина су следеће: лако се дизајнирају, стабилне су у складиштењу, мање су скупе и нема проблема са вирулентношћу. Припрема стратегија ових вакцина је да већину времена циљају спољашњу површину микроорганизама или унутрашње делове без избегавања могућности репликације када се даје домаћину. Вирус инфективне хематопоетске некрозе и инфекције изазване са *Aeromonas salmonicida* су неке болести које се могу спречити мртвим вакцинама.

15.2. Атенуиране вакцине

Ово су такође конвенционалне вакцине који се користе код животиња и људи за производњу хране и за превенцију болести. Припремају се понављањем лабораторијских пасажа, физичким и хемијским слабљењем микрооорганизма да изгубе своју вируленцију без да се убију. Лабораторијске студије су показале ефикасност инактивисаних вакцина код риба. Оне изазивају мукозни, ћелијски и хуморални имунитет. Ослабљени микроорганизам се реплицира у циљном домаћину без било каквих клиничких знакова.

15.3. ДНА вакцине

Ове вакцине у новије време су резултат напретка молекуларне биологије. Да се развије ДНК вакцина, нема потребе да се као вакцина користи антиген, него ген који кодира антиген се узима молекуларним техникама и може се давати као вакцина. ДНК вакцине садрже један или више гена патогена. Интрамускуларна ињекција ових вакцина пружа тренутну и трајну заштиту од болести салмонида као што су инфективна хематопоетска некроза и хеморагична септикемија.

15.4. Рекомбинантне векторске вакцине

Рекомбинантне векторске вакцине су резултат биотехнолошког напретка и припремљене су узимањем само имуногених региона патогена изражавајући га у хетерологном домаћину. Имуноген део микроорганизма узет је и испољен носиоцима. Протеини се тада производе у великим количинама *in vitro*, а затим се пречишћени употребљавају као вакцина. Лако се производи и ефикасно изражава антигени протеин који је одабран као главни фактори имуногености. Инфективна анемија лососа и заразна хематопоезна некроза су болести које могу да се контролишу овим типом вакцина.

15.5. Субјединичне вакцине

Када је култивисање организма тешко, ове вакцине постају корисне узимањем имуногених делова и користећи га као вакцину. Субјединичне вакцине су безбеднеза употребу, али је њихова имуногена природа веома лоша у поређењу са инактивисаниме вакцинма од цело микроорганизма. Адјуванси су потребни за побољшање имуногености.

15.6. Генетски модификоване вакцине

Ове вакцине засноване су на чињеници да *in vitro* пасаже микроорганизама резултирају нагомилавањем геномских мутација које га ослабе. Генетски микроорганизми могу бити ослабљени и молекуларним приступима који укључују уклањање гена одговорних за његову патогеност. Живе ослабљене вакцине ће се реплицирати до нижег титра и могу стимулисати хуморални и ћелијски имунитет. *Aeromonas salmonicida* инфекције код лососа се може контролисати овим вакцинама.

15.7. Синтетске пептидне вакцине

Ове врсте вакцина су произведене од кратких секвенци синтетски припремљених аминокиселина да делују као антигени. Оне се могу користити као погодно антигенско место. Студије су показале да је вакцинација риба са овим вакцинама мање изводљива због недостатка разумевање имуног одговора риба на различите антигене, а нису довољно моћне због тога што захтевају носач молекула.

15.8. Начини администрације вакцина

- ◊ Орална вакцинација
- ◊ Имерзиона вакцинација
- ◊ Инъекциона вакцинација

Орална вакцинација

Орална вакцинација се лако примењује и не доводи до стреса код риба. Вакцина се угради у храну током производње, или може бити обложена пелетама или инкапсулирана. Орална вакцинација се препоручује за секундарне или допунске вакцинације. Недостаци оралне вакцинације укључују да она можда неће дати једнаку заштиту код свих риба, захтева велику дозу и може имати додатне трошкове инкапсулације.

Имерзиона вакцинација

Приликом примене потапања, вакцине се примењују на површине рибе. Унос антигена се врши преко шкрга, коже и бочне линије. Риба се може потопити на кратко време у концентровани раствор вакцине. Раствор вакцине се такође може прскати на рибу. Вакцинација потапањем је посебно погодна за ситну рибу и млађ, који су непрактични инјекционо руковање. Друга предност је што изазива минимални стрес код рибе а раствор вакцине се може поново користити. Недостаци овакве вакцинације су што је радно интензивна и скупа а потребна је и куповина резервоара и специјализоване опреме.

Инјекциона вакцинација

Вакцинација инјекцијом генерално резултира најбољом заштитом и једини је избор за помоћне вакцине. Предности су што се овако постиже висока заштита и потребна је релативно минимална доза јер је тачан прорачун дозе лак и економичан за веће рибе. Такође се на овај начин може користити и мултивалентна вакцина. Недостаци су што није погодно за мале рибе, формирају се адхезије, јавља се стрес код риба и смањујењ уноса хране. Оштећења настала током инјекционе администрације могу изазвати вишеструке смрти риба, а не дају се веома младом насаду због развој имунитета није довољан за заштиту.

У табели 16 приказане су комерцијално доступне вакцине за употребу у аквакултури.

Табела 16. Комерцијално доступне вакцине за употребу у аквакултури (Assefa & Abbuna, 2018).

Име вакцине	Врста/фамилија рибе	Болест
Aeromonas salmonicida Bacterin	Салмониде	Фурункулоза
Arthrobacter Vaccine	Салмониде	Колумнарис
Vibrio Anguillarum-Ordalii	Салмониде	Вибриоза
Infectious Salmon Anemia Vaccine	Салмониде	Инфективна анемија лососа
Yersinia Ruckeri Bacterin	Салмониде	Јерсиниоза
Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Vaccine	Салмониде	Инфективна хематопоетска некроза
Edwardsiella Ictalurii Vaccine	Сом	Едвардсиелоза
Flavobacterium Columnare Vaccine	Сом	Колунмарис
Vibrio anguillarum-Ordalii	Калифорнијска пастрмка	Вибриоза
Vibrio salmonicida Bacterin	Салмониде	Вибриоза
Vibrio anguillarum-salmonicida Bacterin	Салмониде	Вибриоза
Edwardsiella ictaluri Bacterin	Сом	Ентерична септикемија
Spring viremia of carp virus	Шаран	Пролећна виремија шарана
Koi herpes virus (KHV)	Шаран и кои шаран	Кои херпес вироза
Biofilm and free-cell vaccines of *Aeromonas hydrophila*	Шаран (индијски хибриди)	Хидропсија (водена болест)
Streptococcus agalactiae (group B) vaccine	Тилапија	Стрептококоза
Betanodavirus	Шкарпина	Бетанода вироза
Enteric Redmouth (ERM) vaccine	Салмониде	Ентерична болест црвених уста
Pasteurella vaccine	Салмониде	Пастерелоза
Aeromonas hydrophila vaccine	Салмониде	Инфекција покретним аеромонадама
Carp Erythrodermatitis	Шаран	Еритродерматитис
Piscirickettsia salmonis vaccine	Салмониде	Писцирикетоза
Gaffkaemia vaccine	Јастог	Гафкемија
Nodavirus vaccine	Бранцин	Вирусна нервна некроза
Pancreas disease virus vaccine	Салмониде	Болест панкреаса

15.9. Радни задатак – вакцинација

Питања:

1. На које врсте се могу класификовати вакцине у аквакултури?

   _____

   _____

   _____

2. Наведите начине администрације вакцина у аквакултури?

   _____

   _____

   _____

3. Код ДНК вакцина за стимулацију имуног одговора користи се (заокружи тачан дговор)?

   1. антиген
   2. ген који кодира антиген
   3. носач вируса

4. За које категорије рибе је погодна имерзиона вакцинација ?

   _____

   _____

   _____

5. Наведите главне недостатке вакцина које се користе у аквакултури и имунитета насталог као посљедица вакцинације ?

   _____

   _____

   _____

   _____

ОДАБРАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Novakov N, Radosavljević V, Ćirković M. Bolesti slatkovodnih riba. Poljoprivredni fakultet Novi Sad: Štamparija Futura; 2015.
2. Fijan N. Zaštita zdravlja riba. Poljoprivredni fakultet Osijek, 2006.
3. Noga EJ. Fish disease: diagnosis and treatment. 2nd ed. Iowa State University Press Ames. 2010.
4. Meyers T. Fish pathology section laboratory manual, special publication No. 12. Alaska Department of Fish and Game, 1996.
5. Rico A, Satapornvanit K, Haque MM, et al., Use of chemicals and biological products inAsian aquaculture and their potential environmental risks: A critical review. Rev Aquac 2012; 4(2):75–93.
6. Fish dissection. Available at: https://www.instructables.com/Fish-Dissection/
7. Salmon dissection. Available at: http://www.pskf.ca/sd/
8. Jeremić S. Bolesti riba sa atlasom kliničkih i patomorfoloških manifestacija. Naučni institut za veterinarstvo Srbije Beograd, 2006.
9. Bruno DW. A Colour Atlas of Salmonid Diseases. Springer Science, Business Media, 2013.
10. Mitchell AJ, Hoffman GL. Submitting samples for fish disease diagnosis. U.S. Fish and Wildlife Service, Fish Farming Experimental Station, Stuttgart, 2008.
11. AFS-FHS. Procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens. 6th edition. Fish Health Section, American Fisheries Society, 2004.
12. CA-NV FHC. Histological sampling of fish tissues. S.O.P., California-Nevada Fish Health Center. Anderson, CA, 1997.
13. Plumb JA, Bowser PR. Microbial fish disease laboratory manual. Alabama Agricultural Experimental Station, Auburn University, 1983.
14. Diagnostic methods and procedures for the surveillance and confirmation of infectious salmon anemia (ISA). Official Journal of the European Union. 2015; 247: 48-55.
15. Thoesen JC. Suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens (4th Edition). Fish Health Section, American Fisheries Society, Bethesda, 1994.

ПРИЛОГ

ЕВІДЕНЦІЈА О ПРІСУТНОСТІ И АКТІВНОСТІ НА ВЕЖБАМА

РЕДНІ БРОЈ	ВЕЖБА	ОВЕРА	АКТІВНОСТ	ЕСПБ БОДОВІ
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				
6.				
7.				
8.				
9.				
10.				
11.				

12.				
13.				
14.				
15.				
УКУПНО				