

WSKAZÓWKI METODYCZNE**3.2. PROFILAKTYKA CHOROÓB PASOŻYTNICZYCH METODY EKSPERTYZY SANITARNO-PARAZYTOLOGICZNEJ RYB, MIĘCZAKÓW, SKORUPIAKÓW, PŁAZÓW, GADÓW I PRODUKTÓW ICH PRZETWÓRSTWA**

Data wprowadzenia 2001-01-01

ZATWIERDZAM

Główny Państwowy Lekarz Sanitarny Federacji Rosyjskiej – Pierwszy zastępca Ministra Ochrony Zdrowia Federacji Rosyjskiej G.G. Oniszchenko 25 października 2000 r.

1. Sfera zastosowania i przepisy ogólne

1.1. Niniejsze wskazówki metodyczne ustalają metody ekspertyzy sanitarno-parazytologicznej ryb i nierybnych obiektów połowów (mięczaków, skorupiaków, płazów, gadów), a także produktów ich przetwórstwa (dalej w tekście – produkcja rybna).

1.2. Wskazówki metodyczne przeznaczone są do zastosowania w akredytowanych (lub atestowanych lub licencjonowanych) laboratoriach (w tym kontrolno-produkcyjnych) i laboratoriach placówek państwowej służby sanitarno-epidemiologicznej i weterynaryjnej Federacji Rosyjskiej, sprawujących kontrolę jakości hydrobiontów i produktów ich przetwórstwa na zgodność z SanPiN 2.3.2.560-96* i 3.2.569-96**, a także placówek naukowych, zajmujących się badaniem chorób pasożytniczych.

* Na terytorium Federacji Rosyjskiej obowiązują SanPiN 2.3.2.1078-01;

** Na terytorium Federacji Rosyjskiej obowiązują SanPiN 3.2.1333-03, tu i dalej w tekście. – Uwaga red.

Specjaliści laboratorium powinni przejść szkolenie w zgłoszonej sferze akredytacji (atestacji, licencjonowania), posiadać metrologicznie atestowane metodyki i metody, zatwierdzone lub dopuszczone do zastosowania przez Standard Państwowy i Państwową Służbę Sanitarно-Epidemiologiczną Rosji i odpowiednich wymogów GOST P 8.563-96 "Metodyki wykonania pomiarów".

1.3. Wśród wszystkich klas pasożytów (pierwotniaki, skorupiaki, robaki i in.), spotykanych w rybach i innych hydrobiontach, niebezpiecznymi dla zdrowia człowieka są tylko larwy robaków: płazińców, przywr, nicieni i kolecogłowach. Do najbardziej znaczących społecznie i szeroko upowszechnionych chorób, przekazywanych przez ryby i inne hydrobionty, należy opistorchoza, dyflobotrioza i endemiczne dla Dalekiego Wschodu Rosji metagonimozza, nanofietozza i klonorchoza. Określone niebezpieczeństwem dla ludzi mogą być pasożyty, osiedlające się, ale nierozwijające się do stadium dorosłego u człowieka (wykorzystujące go w charakterze żywiciela przejściowego), co utrudnia diagnostykę choroby. To spirometry, gnatostomy, bolbozomy [nicienie], korinozomy i niektóre rodzaje anizakid i paragonimid. Zarażenie człowieka piramikocefalusami, apofallami kryptokotylusami następuje bardzo rzadko. Inne pasożyty (metorchisy, pseudamhistomosis, heterosies, echinocasmus i in.) można zaliczyć do pasożytów, sporadycznie spotykanych u człowieka na określonych terenach.

1.4. *Obiektami badań* są przemysłowe ryby słodkowodne i morskie, mięczaki, skorupiaki, płazy, gady i produkty ich przetwórstwa.

1.5. Potencjalne niebezpieczeństwo dla człowieka stanowią tylko żywe larwy pasożytów. W związku z tym, przy badaniu parazytologicznym hydrobiontów i produktów ich przetwórstwa należy określić zdolność życiową wykrytych plerocerkoidów, metacerkariów, akantelli i larw nematod (patrz rozdział 5).

1.6. Przy badaniu hydrobiontów i produktów ich przetwórstwa należy przestrzegać trybu pracy z materiałem inwazyjnym reglamentowanego przepisami sanitarnymi 1.2.731-99* "Bezpieczeństwo pracy z mikroorganizmami III-IV grup patogeniczności i pasożytami".

* Obowiązują SP 1.3.2322-08. – Uwaga red.

2. Pobieranie, przechowywanie i przygotowanie do analizy próbek hydrobiontów i produktów ich przetwórstwa

Pobieranie i wielkość próbek ryb, mięczaków, skorupiaków, płazów, gadów i produktów ich przetwórstwa dla badania na zgodność z wymogami bezpieczeństwa dla zdrowia człowieka według wskaźników parazytologicznych odbywa się zgodnie z wymogami:

- GOST 7631-85 "Ryby, ssaki morskie, bezkręgowce morskie i produkty i przetwórstwa. Przepisy odbioru, organoleptyczne metody oceny jakości, metody pobierania próbek do badań laboratoryjnych";
- Zmiany Nr 2 do GOST 7631-85 (p.1.2), zatwierdzonej Uchwałą Komitetu Standardu Państwowego ZSRR z dnia 25.10.89 Nr 3195;
- SanPiN 3.2.569-96 "Profilaktyka chorób pasożytniczych na terytorium Federacji Rosyjskiej, załącznik 3, p.6.2 (przy kontroli laboratoryjnej produkcji rybnej) i ppkt. 15.12, 15.13 (przy ocenie i kontroli stanu parazytologicznego rejonu połowów (biotopów);

Uwaga.

W urzędowym tekście dokumentu, na pewno, istnieje błąd: mowa o "Ogólnym trybie postępowania z próbkami, wykorzystywanymi przy prowadzeniu obowiązkowej certyfikacji produkcji. PR 50.3002-95", a nie PR 50.3.002-95 "Typowy tryb postępowania...".

- przepisów certyfikacji "Typowy tryb postępowania z próbkami, wykorzystywanymi przy prowadzeniu obowiązkowej certyfikacji PR 50.3.002-95".

2.1. Pobieranie, przechowywanie i przygotowywanie do analizy próbek hydrobiontów przy ocenie stanu parazytologicznego rejonów połowów (biotopów)

Niezbędne odczynniki i wyposażenie:

1. Odczynniki chemiczne: gliceryna; eter lub chloroform
2. Kuwety emaliowane
3. Naczynia Petriego
4. Pincety chirurgiczne i do brwi
5. Igły do preparatów
6. Szklanki chemiczne
7. Garnki emaliowane
8. Kuchenka elektryczna
9. Lodówka
10. Waga z zestawem odważników lub waga elektroniczna
11. Centymetr lub linijka
12. Gaza, wata
13. Papier filtracyjny

2.1.1. Przy ocenie stanu parazytologicznego zbiornika wodnego (rejonu połowów) należy zaczynać od badania gatunków hydrobiontów, najbardziej narażonych na zarażenie. Najlepszymi wskaźnikami złego stanu zbiornika wodnego w stosunku do inwazji larw *Opisthorchis* jest jaź, dalej w kierunku rosnącym – leszcz, lin itd. (patrz tabela 2), a w stosunku do *Diphyllbothrium latum* – szczupak i miętus (patrz tabela 1).

Tabela 1

Zróżnicowane oznaki plerocerkoidów rodz. *Diphylobothriidae*, niebezpiecznych dla zdrowia człowieka

Rodzaj pasożyta	Rozpowszechnienie geograficzne	Dodatkowi żywiciele (ryby, płazy, gady)	Lokalizacja w ciele żywiciela	Obecność lub brak otoczek	Budowa i wymiary plerocerkoidu
1	2	3	4	5	6
<i>Diphylobothrium latum</i> (<i>Bruzdogłowiec szeroki</i>)	Zbiorniki słodkowodne i zmienione w słodkowodne odcinki mórz północy Eurazji (FR, Łotwa, Litwa, Estonia, Finlandia, Dania, Szwecja, Polska, Szwajcaria), Północnych Włoch i Ameryki (USA, Kanada); dorzecza Wołgi, Dunaju, Dniepru i rzek syberyjskich	Szczupak, miętus, okoń zwyczajny, jazgarz, sum, sandacz zwyczajny, bersz, okoń żółty, sandacz amerykański i kanadyjski	Jama ciała, ikra, organy wewnętrzne, mięśnie	Zwykle bez otoczek	Larwy są koloru białomlecznego, o długości od kilku mm do 7 cm. Na ciele i skoleksie nie ma włosków, zauważalnych pod mikroskopem świetlnym. Charakterystyczna jest obecność namiele larwy głębokich fałd, które często utrzymują się także po rozluźnieniu w wodzie. Skoleks z dwoma szelinami przyssawkowymi jest zwykle wydłużony
<i>D. dendriticum</i> (<i>Tasiemiec</i>)	Słodkowodne zbiorniki wodne Europy (FR, Litwa, Łotwa, Estonia, Finlandia, Norwegia, Szwecja, Polska, Niemcy, Irlandia, Wielka Brytania) i Ameryki (Kanada, USA); słodkowodne zbiorniki Syberii (FR), Dalekiego Wschodu (Sachalin), jezioro Issyk-Kul	Peluga, omul, coregonus, golec zwyczajny, łosoś szlachetny, łososię (Clarkaa, stalowogłowy), muksun, czyr, Thymallus (sybirski i europejski), tugun, Salma Trutta, hucho, lenok, ryba siejowata sybirska i północno-amerykańska, pstrąg zwyczajny i amerykański, kiżucz, stynka, osman (ałtajski, nagi), miętus,	Na ściankach i w masie ścianek przewodu pokarmowego i żołądka, rzadziej na innych organach i w tkance mięśniowej	Zwykle w kapsułach o średnicy 2,2-11 mm. Przy lokalizacji w ikrze zwykle bez otoczek. U niektórych gatunków (na przykład, ryba siejowata) wraz z larwami w kapsułach, spotykane są wolno zalegające w jamie ciała plerocerkoidy	Larwy koloru jasnokremowego. Długość 1-10 cm, czasami do 20 cm. Po rozluźnieniu w wodzie fałdy słabo wyrażone. Skoleks wyraźnie oddzielony od ciała. Zwykle jest on wydłużony lub częściowo wydłużony, przy tym odcinki ciała wokół niego tworzą niby „ramionka”. Zakończenia płatków szczelin przyssawkowych wyglądają na

		żabogłowacze (wielkogłowy, tłusty, Asprocottus pulcher)			pofałdowane. U rozluźnionych larw skoleks nabiera kształtu owalno-migdałowego, szczeliny przyssawkowe otwierają się szeroko. Ciało pokryte jest szczecinką o długości 7- 11 mkm, która na skoleksie jest ledwo zauważalna
<i>D. luxi (D. klebanovskii)</i> <i>(Diphyllobothrium</i> <i>klebanovskii)</i>	Daleki Wschód, Czukotka, morza Oceanu Spokojnego i dorzecza rzek, wpadających do nich, w granicach arealu dodatkowych żywicieli pasożyta, za wyjątkiem północnej części Zach. Morza Ochockiego, Areal E. luxi nie przecina się z arealem D. latum	Keta, gorbusza, łosoś pacyficzny [Oncorhynchus], golec dalekowschodni, czewica	Cała muskulatura grzbietowa	Owalne otoczki z przezroczystymi ściankami (4-6x2-5 mm). W muskulaturze gorbuszy wczesnego stadium i łososia pacyficznego znajdują się larwy bez otoczek lub znajdują się one w różnych stadiach inkapsulacji Plerocerkoidy morfologicznie podobne są do larw D. latum, ale w odróżnieniu od nich zwykle są inkapsulowane.	Pory gruczołów frontalnych mieszczą się na skoleksie lub ciele larwy
<i>D. dhremum</i>	Słodkowodne zbiorniki północy Europy, Azji i Ameryki (na południe do 40-50° szer. płn.)	Łosoś szlachetny, pstrąg, arktyczny golec zwyczajny, pstrąg źródłany amerykański, sielawa (sybirska, europejska), omul, sieja pospolita, peluga, tugun, Thymallus (syberyjski, europejski), stynka (europejska, zębata), miętus, cierniki (Gasterosteus aculeatus i cierniczek północny (Pungitus Pungitus)	Błony surowicze układu pokarmowego (przewód pokarmowy, komora, przydatki piloryczne), rzadziej na innych organach wewnętrznych	W kapsułach	Plerocerkoidy są koloru białego, o długości 6-12 mm, po rozluźnieniu w wodzie ciało równomiernie wydłużone, w kształcie laski, bez fałd, skoleks oddzielony od ciała. Ciało i skoleks pokryte szczecinką o długości 0,01-0,03 mm. Przeżywa w wodzie nie dłużej niż 10 min

<i>Pyramicocephalus phocarum</i>	Strefa subarktyczna i arktyczna Wszechoceanu	Dorszowate (dorsz, mintaj, sajka, wachnia, plamiak); skorpenowate (karmazyn); głowaczowate (kur rogacz, kur diabeł), taszowate (tasza); flądrowate (zimnica, niegładzica, flądra morska), halibut	Jama ciała i błona surowicza organów wewnętrznych (wątroba, przydatki piloryczne żołądka); u mintaja i wachni spotyka się w muskulaturze szkieletowej	Bez otoczek	Morfologicznie podobne do larw r. <i>Diphyllbothrium</i> . Długość ciała 8-25 mm, do 40 mm, szerokość 1-3 mm. Zwykle ciało fałdowane. Skoleks dość masywny, o kształcie buławowato-strzałkowatym (wymiary skoleksu 2x1 mm)
<i>Spirometra erinaceieuropaei</i>	Europa i Azja. W FR najczęściej spotyka się w delcie Wołgi, Przymorzu, na Sachalinie	Płazy (żaba jeziorowa, stawowa); gady (wąż wodny, wąż zwyczajny, węże)	U żab – w mięśniach (najczęściej w biodrach), w jamie ciała, pomiędzy pętlami jelit, w organach wewnętrznych. U węży w błonie podskórnej, jamie ciała, muskulaturze, międzymięśniowej tkance łącznej	Zwykle bez otoczek, u żmij czasami w cienkich kapsułach na jelitach lub podskórnie	Larwy koloru białomlecznego. Długość od 5 mm do 30 cm i więcej, w zależności od wieku i stopnia skurczenia plerocerkoid charakteryzuje się obecnością na ciele węzłów redukcji, przeplatających się z rozluźnionymi odcinkami ciała. W skurczonych odcinkach ciało szerokie i płaskie, z głębokimi poprzecznymi fałdami, w rozluźnionych odcinkach – wąskie i pozbawione pofałdowania. Przedni koniec ciała zwykle silniej skurczony niż inne odcinki. Skoleks nieduży, od ciała nieoddzielony, wciągnięty do wewnątrz i zwykle przekreślony na bok. Szczeliny przyssawkowe znacznie krótsze niż u innych difilobothrid (0,2-0,4 mm)

Do badania na obecność metacerkariów *Opisthorchis felinus* i plerocerkoidów *D. latum* celowym jest wybieranie ryb starszych, ponieważ larwy pasożytów żyją kilka lat i ich ilość zwiększa się wraz z wiekiem ryb. Metacerkarium *Metorchis bilis (albidus)* częściej spotyka się u ryb rocznych i młodszych, a *Echinochasmus perfoliatus* – przeważnie u narybku.

2.1.2. Przed rozpoczęciem badania ryb, małży, skorupiaków, płazów i gadów należy dokładnie określić przynależność gatunkową badanego egzemplarza i w oparciu o tabelę 1-4 i p. 4.4 niniejszego dokumentu i tabela 9 SanPiN 3.2.569-96 (załącznik 3), określić, potencjalnymi nosicielami jakich rodzajów pasożytów, niebezpiecznych dla zdrowia człowieka są one.

Należy pamiętać, że ten sam, gatunek kręgowca lub bezkręgowca może być dodatkowym lub paratenicznym(fakultatywnym) żywicielem dla kilku gatunków pasożytów.

2.1.3. Należy przechowywać świeżo wyłowioną rybę i nierybne hydrobionty przed badaniem w stanie schłodzonym (w chłodni), nie dopuszczając do krystalizacji, lub w lekko podwędzonym powietrzu nie dłużej niż 3-5 dni.

2.1.4. Przed badaniem ryby (lub nierybny obiekt połowów) należy wymyć od śluzu, wytrzeć, zważyć, zmierzyć długość i wykonuje się w dzienniku wpis, dotyczący ewidencji badań (rozdział 7).

2.1.5. Do określenia wieku ryb z łuską cykloidalną kolejno bierze się z przedniej bocznej powierzchni powyżej bocznej linii ilość 15-20 dużych łusek. U ryb z ktenoidalną łuską, a także z gołą skórą brane są otolity lub kołec płetwy piersiowej.

2.1.6. Do badania na obecność metacerkariów *Metagonimus yokogawai* i *Metagonimus katuradai* pobiera się 20 łusek z różnych części ciała ryby z okolicy grzbietu, u karasia – wzdłuż linii bocznej. Duże łuski (u karpi, karasi) przed badaniem klaruje się w ciągu 15-20 min w 50%-ym roztworze gliceryny.

2.1.7. Przed badaniem żywych raków i krabów zaleca się umieścić je we wrzącej wodzie na 0,5-1,5 min. (w zależności od wymiarów skorupiaków) do zakończenia poruszania się lub uśpić je eterem (lub chloroformem).

2.2. Przechowywanie i przygotowanie do analizy produkcji rybnej przy badaniu laboratoryjnym podczas produkcji, przy certyfikacji, kontroli inspekcyjnej

2.2.1. Należy przechowywać świeże produkty lub ochłodzone hydrobionty i produkty ich rozbioru przed badaniem w chłodni w temperaturze 2-4°C. Zamrożone produkty rybne (surowce, półprodukty i gotowe wyroby) przed badaniem w temperaturze i warunkach zgodnie z dokumentacją normatywno-prawną dla nich.

2.2.2. Bezpośrednio przed badaniem mrożoną produkcję rybną rozmraża się do temperatury nie niższej niż 0°C w masie ciała ryb, mięczaków, skorupiaków, płazów, gadów i produktów ich przetwórstwa. Żywe skorupiaki są usypiane (patrz p.2.1.8).

2.2.3. Przy badaniu suszonej, solonej i wędzonej ryby wstępnie jest ona moczona w ciągu doby do rozmiękczenia mięśni, zmieniając wodę co 4-6 godz.

2.2.4. Soloną ikrę (ziarnistą, prasowaną, soloną) przetrzymuje się w wodzie w ciągu 2-3 godz. Inne rodzaje produkcji rybnej (prezerwy, ryba pieczona, farsz i in.) nie wymagają specjalnego przygotowania i przechowywane są w chłodni do czasu rozpoczęcia badania.

2.2.5. O przynależności gatunkowej badanej próbki świadczą dokumenty, towarzyszące próbce. Przy dostarczeniu hydrobiontów w postaci, pozwalającej wykonać określenie gatunku, należy go sprecyzować.

3. Metody badania parazytologicznego hydrobiontów i produktów ich przetwórstwa

Niezbędne odczynniki i wyposażenie:

1. Odczynniki chemiczne: roztwór fizjologiczny
2. Szkła przedmiotowe
3. Duże szkła przedmiotowe (6-8x12-15 cm, o grubości 3-5 mm) lub kompresorium
4. Kuwety emaliowane
5. Drewniana deska
6. Naczynia Petriego
7. Szkła zegarkowe
8. Pincety różnych rozmiarów (chirurgiczne, anatomiczne, do brwi)
9. Nożyce
10. Skalpele
11. Igły preparacyjne o różnej grubości
12. Pipetki szklane (pasterowskie)
13. Gruszki gumowe
14. Papier filtracyjny

15. Gaza, wata
16. Lupa
17. Mikroskop binokularowy typu MBC
18. Lampa dla binokularu dowolnego typu
19. Mikroskop świetlny typu Biolam, Bimam
20. Lampa do mikroskopu dowolnej marki
21. Młotek drewniany

3.1. Zasadnicze podejście i wybór metody badania hydrobiontów i produktów ich przetwórstwa

3.1.1. Przy badaniu produkcji rybnej wykorzystywane są dwa podstawowe podejścia:

1) wykrycie larw pasożytów, widocznych gołym okiem (plerocerkoidy, akantelle, larwy nematod o wymiarach >2 mm), drogą dokładnych oględzin wszystkich organów, jam i tkanek łącznych (lub paratenicznych) żywicieli;

2) wykrycie larw pasożytów, słabo lub niewidocznych gołym okiem (w podstawowym metacerkarium trematod i drobnych nematod), drogą badania organów i tkanek – miejsc najbardziej prawdopodobnej ich lokalizacji, z wykorzystaniem środków optycznych. Sprezycowanie przynależności gatunkowej larw pasożytów w obu przypadkach prowadzone jest przy zastosowaniu mikroskopów świetlnych typu MBS, Biolam lub in.

3.1.2. Porządek badania i konieczność przeprowadzenia wszystkich lub tylko poszczególnych jego etapów zależy od gatunku (gatunków) pasożyta, spotykanego w badanym hydrobioncie, typowej lokalizacji larw w nim (tabele 1-4, ppkt. 4.4.1, 4.4.2) i rodzaju produkcji.

3.1.2.1. Przy badaniu parazytologicznym świeżo wyłowionej lub schłodzonej ryby na obecność cestod, nematod i przywr należy prowadzić praktycznie cały zaproponowany niżej kompleks badań (ppkt. 3.2.1-3.2.7, 3.2.11). Przy poszukiwaniu plerocerkoidów *Diphyllbothrium dendriticum* i akantell gatunku *Bolbosoma* szczególną uwagę zwrócić na zalecenia w ppkt. 3.2.4, *Diphyllbothrium luxi* (*D. klebanovskii*) – w punkcie 3.2.11.1, *Gnathostoma hispidum* i *Gnathostoma spinigerum* – w punktach 3.2.11.3-3.2.11.4.

Na obecność metacerkariów większości gatunków trematod – bada się tylko górną warstwę tkanki mięśniowej i błonę podskórną w okolicy mięśni grzbietu (ppkt. 3.2.11.3). Dla wykrycia metacerkariów *Metagonimus yokogawai* i *Metagonimus katuradai* w pierwszej kolejności badana jest łuska (ppkt. 3.2.12), *Echinochasmus perfoliatus* - skrzela (ppkt. 3.2.9), *Apophallus muhlingi* i *Rossicotrema donicum* – tkanki płetw (ppkt. 3.2.8), *Nanophyetus salmincola* - nerki (ppkt. 3.2.7).

3.1.2.2. Mrożoną, soloną, korzenną, marynowaną, podsuszaną, suszoną i wędzoną produkcję rybną po wstępnym przygotowaniu (ppkt. 2.2.2, 2.2.3) bada się według metodyki niepełnego otwarcia parazytologicznego, przytoczonego niżej (ppkt. 3.2-3.4). Przy wykryciu larw pasożytów należy określić ich zdolność do życia (rozdział 5).

3.1.2.3. Takie produkty przetwórstwa ryb, jak prezerwy, farsz, pieczona lub zalewana ryba, wstępnie badana jest wzrokowo, a następnie jest badana metodą kompresorową (ppkt. 3.2.11.3) lub metodą przegotowywania w sztucznym soku żołądkowym (ppkt. 3.2.11.4).

3.1.2.4. Ryby patroszone z usuniętą głową, rozebraną na tuszkę, grzbiet, kawałek i filet łapki płazów, tkanki mięśniowe i płaszcz małży z dwustronną skorupą, a także płaszcz głowonogów w zależności od celów badania parazytologicznego (gatunku pasożytów) bada się według jednej z zaproponowanych metodyk badania tkanki mięśniowej (ppkt. 3.2.11).

3.1.2.5. Ikry (gonady), zarówno świeżą, jak i produkty jej przetwórstwa, bada się zgodnie z punktem 3.2.6.

3.1.2.6. Mlecz (płyn nasienne) dokładnie oglądane są z zewnątrz na obecność pasożytów płciowych. Wewnątrz mlecz nie ma pasożytów niebezpiecznych dla zdrowia człowieka.

3.2. Metody niepełnego badania parazytologicznego ryb

3.2.1. Ryby rozkrajane są przeważnie w emaliowanej kuwecie lub na szerokiej gładkiej desce. Przede wszystkim, prowadzone są zewnętrzne oględziny ryb dla wykrycia larw, prześwitujących przez skórę, wyjmowane są one igłą preparacyjną.

3.2.2. Następnie wycinana jest lewa ścianka jamy ciała i otwierany jest dostęp do kolejnej. W tym celu po obróceniu ryby brzuchem do góry, robi się krótkie nacięcie do przodu od otworu analnego, gdzie następnie wprowadzany jest tępy koniec nożyc i ryba rozcinana jest wzdłuż linii środkowej brzusznej do kąta dolnej szczęki. Robione jest łukowe nacięcie, wycinana jest lewa ścianka brzuszna, oddzielana jest ona. Przy uważnym badaniu jamy ciała i organów wewnętrznych mogą być wykryte wolno leżące i pod błoną surowiczą, lub w kapsułach larwy cestod, nematod, przywr, widoczne gołym okiem.

3.2.3. Nakładane są legatury na jelita w okolicy otworu analnego i na przewód pokarmowy w jego początkowym odcinku, aby zawartość przewodu pokarmowego nie wyszła na zewnątrz. Następnie wyjmowane

są *organy wewnętrzne*. Wycinane są jajniki (ikra) lub nasieniowody (mleczce), umieszczając je w oddzielnych naczyniach Petriego i badane są. Badany jest pęcherz pławny na zewnątrz i wewnątrz. Wycinane jest i badane serce, a także jama sercowa. W sposób kompresorowy badana jest treść, pozostała w jamie ciała. Przecierana jest ona serwetką z gazy, zeskrobywana jest otrzewna.

3.2.4. Następnie preparowany jest kompleks organów systemu pokarmowego. W pierwszej kolejności oddzielany jest pęcherzyk żółciowy, leżący na powierzchni wątroby, tak, aby jego zawartość (w tym pasożyty) nie zalała pozostałych organów wewnętrznych. Następnie oddzielany jest przewód pokarmowy, wątroba, śledziona, gruczoł podżołądkowy. Organy te oddzielane są jeden od drugiego i od otaczającej tkanki tłuszczowej i badane są. Tkanę tłuszczową kroi się na cienkie plasterki o grubości około 3 mm lub bada się metodą kompresorową pomiędzy szklami na ciemnym tle w półprzewodzącym świetle.

Badany jest uwolniony od tkanki tłuszczowej *przewód pokarmowy*, szukając larw w kapsułach lub prześwitujących przez powłoki błony surowiczej (*Diphyllbothrium dendriticum*, *Diphyllbothrium latum*, *Diocotophyme renale*, *Eustrongylides exicisus*, *Corynosoma strumosum*, *Corynosoma semerse*, *Bolbosoma caeniforme*, larwy *cem. Anisakidae*). Przydatki piloryczne (rozwinęte u miętusa, siejowatych, łososiowych) wyjmowane są i oglądane z zewnątrz (*Pyramicocephalus phocarum*). Ścianki żołądka i przewodu pokarmowego po zewnętrznych oględzinach badane są pod lupą binookularową, wybierając stopień powiększenia w zależności od obiektu.

3.2.5. Przy badaniach wizualnych zewnętrznych *wątroby* gołym okiem można zauważyć plerocerkoidy cestod (*Diphyllbothrium latum*, *Pyramicocephalus phocarum*, *Eustrongylides exicisus*) i larwy anizakid. *Gruczoł podżołądkowy, śledzionę, wątrobę* bada się z zewnątrz i rozcina na plastry o grubości około 3 mm.

3.2.6. W *jajniku* rozcina się otoczkę, treść zeskrobuje się i kompresuje. Tutaj często spotyka się plerocerkoidy *Diphyllbothrium latum*. Metodą kompresorową wygodnie jest badać tylko drobną ikrę. Przy badaniu grubej ikry należy rozbierać ją igłami preparacyjnymi w naczyniu Petriego z dodatkiem niewielkiej ilości wody.

Soloną ikrę (ziarnistą, prasowaną, soloną) po wstępnym przygotowaniu (ppkt. 2.2.4) bada się w taki sposób. Przy badaniu *plynu nasiennego (mleczcy)* dokładnie badana jest ich powierzchnia.

3.2.7. Jako ostatnim z wewnętrznych organów badane są *nerki*, leżące wzdłuż kręgosłupa. Ponieważ tkanka nerek jest bardzo pulchna, zwykle nie udaje się oddzielić jej całkowicie. Zeskrobuje się i po częściach bada się w sposób kompresorowy, dodając kilka kropli wody. Nerki to organ najbardziej prawdopodobnej lokalizacji metacerkariów *Nanophyetus salmincola*.

3.2.8. Odcina się i bada się je z wykorzystaniem mikroskopu MBS przy powiększeniu 16-48 (okular 8x, 12x, obiektyw 2x, 4x) razy w niewielkiej ilości wody. Tutaj mogą być zauważalne w postaci małych czarnych punkcików pigmentowane cysty *Apophallus muhlingi* i *Rossicotrema donicum*, a także metacerkariów *Metagonimus yokogawai* i *Metagonimus katsuradai*. Mięśnie płetw bada się w sposób kompresorowy (3.2.11.3).

3.2.9. Zdejmowana jest pokrywa skrzelowa i nożycami wycinane są wszystkie łuki skrzelowe. Po kolei są one badane w naczyniu Petriego pod binokulem, przebiegając płatki igłami preparacyjnymi i pilnując, aby były one pokryte wodą. Następnie odcina się płatki od łuku i ich podstawy i rozbierając igłami preparacyjnymi, szuka się pasożytów, które pozostały niezauważone. Na skrzelach można wykryć metacerkaria *Echinochasmus perfoliatus*, *Metagonimus yokogawai*, *Metagonimus katsuradai*, *Nanophyetus salmincola*, *Opisthorchis felineus*.

3.2.10. Po zbadaniu organów wewnętrznych z ryby zdejmowana jest skóra w kierunku od głowy do ogona, podcinając ją nożyczkami i odcinając pincetą chirurgiczną lub ręką. Badana jest wewnętrzna strona skóry, a część mięśni, które oddzieliły się ze skórą, rozcinana jest na plastry lub zeskrobywana jest i kompresowana.

3.2.11. Metoda badania mięśni wybierana jest w zależności od celów kontroli parazytologicznej (rodzaju pasożytów).

3.2.11.1. *Metoda rozcięć równoległych*. Metoda stosowana jest w celu wykrycia w tkance mięśniowej ryby larw pasożytów, widocznych bez wykorzystania przyrządów powiększających (cestod, nematod, przywr).

- Tkanka mięśniowa ostrym skalpelem rozcinana jest na plastry o grubości do 5 mm, które następnie są rozsuwane i badane w padającym świetle gołym okiem. Rozcięcia można robić zarówno w poprzek, jak i wzdłuż włókien mięśniowych. Wykonując rozcięcia mięśni i spotykając w ich masie duże larwy lub larwy w kapsułach (o wielkości około 1 cm i więcej), należy wyjąć kilka sztuk pasożytów w całości dla określenia gatunku.

- Wydzielone larwy należy umieścić w naczyniu Petriego lub na szkiełku zegarkowym z roztworem fizjologicznym.

- Przy badaniu łososi z Oceanu Spokojnego, golca dalekowschodniego i czewicy na obecność plerocerkoidów *Diphyllbothrium luxi* (*D. klebanovskii*) rozcięcia prowadzone są w poprzek włókien mięśniowych całej grzbietowej części ciała, większość larw lokalizuje się pomiędzy płetwami tłuszczowymi i grzbietowymi.

3.2.11.2. *Metoda badania tkanki mięśniowej na prześwity*. Wykorzystywana dla wykrycia larw nematod, cestod, przywr. Dla zastosowania tej metody należy wykonać specjalny przyrząd - stolik z przezroczystą

pokrywą (o wymiarach nie mniej niż 40x40 cm, najlepiej z mlecznego lub matowego szkła) i podświetleniem z dołu. Można korzystać ze stolika z mikroskopem typu MBS z podświetleniem od dołu.

- Tkanę mięśniową (lub filety) ostrym skalpelem lub nożem krojone są na plasterki o grubości nie więcej niż 2 – 3 cm.

- Kawałki mięśni umieszczane są na górnej pokrywie stolika i oglądane. Stopień jasności podświetlenia i grubość kawałków w zależności od stopnia prześwietlenia mięsa konkretnego gatunku ryby ustalana jest drogą doświadczalną.

- Wykryte larwy pasożytów wydzielane są z tkanek mięśniowych ryby przy pomocy igieł preparacyjnych.

- Wydzielone larwy umieszczane są w naczyniu Petriego lub na szkle zegarkowym z roztworem fizjologicznym.

3.2.11.3. *Metoda kompresorowa*

3.2.11.3.1. Metoda stosowana jest głównie dla wykrycia metacerkariów trematod. To bardzo drobne, niezauważalne lub mało zauważalne gołym okiem obiekty, dlatego dla ich wykrycia i zróżnicowania przynależności gatunkowej niezbędne są specjalne badania mikroskopiczne. Metoda wykorzystywana jest przy badaniu tkanki mięśniowej i organów wewnętrznych ryb, a także tkanki mięśniowej skorupiaków. Możliwe jest jej wykorzystanie przy badaniu organów wewnętrznych ryb na obecność larw nematod i cestod.

3.2.11.3.2. Celowym jest poddawanie badaniu kompresorowemu organów i odcinków tkanki mięśniowej najbardziej prawdopodobnej lokalizacji metacerkariów (tabela 2).

Tabela 2

Zróznicowane cechy metacerkariów trematod rodz. *Opisthorchidae*, *Heterophyidae*, *Nanophyetidae* i *Echinostomatidae*, niebezpieczne dla człowieka

Gatunek pasożyta	Rozprzestrzenienie geograficzne	Gatunki ryb – dodatkowych żywicieli	Lokalizacja w ciele ryby	Rozmiar (w mm) i charakterystyka cysty	Charakterystyka pęcherza wydalniczego ryb	Położenie i ruchomość larwy	Budowa i wymiary larwy uwolnionej z otoczki (w mm)
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Opisthorchis felineus</i>	Zbiorniki słodkowodne Europy; dorzecza rzek Ob., Irtysz, Jenisej, rzeki Kazachstanu: Uił, Sary-Su, Bajkonur, Uił-Żyłanszyk, Irgiz, Turgaj, Nura, Szyderty, jeziora Kurgaldży	Jazgarz, jelec, lin, wzdregą, płoć, słonecznica pospolita, kleń, leszcz, ciosa, rozpiór, strzelba zwyczajna i Czekanowskiego, świnka pospolita, sapa, ukleja, krap, kielb pospolity, koza pospolita, boleń pospolity	Górna warstwa tkanki mięśniowej (2-4 mm) i błona podskórna w okolicy grzbietu, rzadziej w płetwach, na skrzelach, w łusce	0,17-0,25x0,21-0,33 owalna, rzadziej okrągła. Otoczka dwuwarstwowa, cienka, przezroczysta. Wewnętrzna na całym obwodzie równomiernie przylega do zewnętrznej	Duży, do 1/3 części ciała. W promieniach przechodzącego światła w postaci dużej ciemnej plamy	Metacerkarium leży w cyście w położeniu zgiętym, które zmienia się z powodu prawie stałego energicznego poruszania się larwy	0,44-1,36x0,15-0,30. PII* - 0,07-0,1; БП** - 0,09-0,14. Ciało larwy niepigmentowane, pokryte kolcami do poziomu BP. Przewód pokarmowy długi (2 razy dłuższy niż farinks). Rozwidlenie jelit leży w takiej samej odległości od przedniego końca ciała i BP. Załączki przewodów nasiennych leżą na skos jeden w stosunku do drugiego na krawędziach pęcherza wydalniczego
<i>Metorchis bills</i>	Zbiorniki słodkowodne obwodu kaliningradzkiego i moskiewskiego,	"	Górna warstwa tkanki mięśniowej (2-4 mm) i	0,12-0,16x0,19-0,22 owalna. Kapsuła z cienkimi ściankami	Do 1/4 objętości tylnej części ciała czarny, okrągły	Ruchy spowolnione	0,27-0,33x0,05-0,1. RP=BP-0,05, zlokalizowana nieco z tyłu od środka ciała. Ciało

	Ukrainy, Zach. Syberii, Kazachstanu, Północnego Kaukazu, dorzecza Wołgi		błona podskórna w okolicy grzbietu	dwuwarstwowa. Pomiędzy kapsułami cysty widoczne odstęp			niepigmentowane. Pokryte kolcami o kształcie trójkątnym do poziomu tylnej krawędzi BP. Przewód pokarmowy bardzo krótki
<i>Pseudamphistomum truncatum</i>	Słodkowodne zbiorniki środkowego pasa Rosji, Powołża, Kazachstanu, Zach. Syberii, dorzecza rzek, wpadających do Morza Czarnego	Jazgarz, płóć, krap, leszcz, lin, wzdręga, płóć kaspijska, rozpiór	"	0,39-0,45x0,40-0,54. Okrągła lub lekko owalna. Kapsuła cienka przeźroczysta dwuwarstwowa. Warstwy równomiernie przylegają do siebie	Duży czarny okrągły, w postaci podkowy, zajmuje nie więcej niż 1/3 ciała	Metacerkarium złożone w środkowej części ciała w położeniu wentralnym, leży w cyście swobodnie. Ruchy rzadkie	1,28-1,54x0,34-0,40. BP, z reguły większe niż RP. Ciało pokryte kolcami dochodzącymi prawie do tylnego końca ciała. Przewód pokarmowy krótki, takiej samej długości jak farinks. Rozwidlenie jelit leży o wiele wyżej, niż u <i>O. felineus</i> , przybliżone do RP. Załączki przewodów nasiennych leżą prawie na tym samym poziomie
<i>Clonorchis sinensis</i>	Zbiorniki słodkowodne południowo-wschodnich i środkowych rejonów państw Dalekiego Wschodu (Japonia, Chiny, Korea, Wietnam). W Rosji dorzecza Amuru i Ussuri	Karpowate chińskiego kompleksu ichtiologicznego (ponad 70 gatunków); orki korejskie, ryżanka japońska, Rhinogobius, eleotris, tilapia, stynka microstoma, śledź ilisza, channa argus	"	0,13-0,15x0,15-0,18 w kształcie kulistym. Kapsuła dwuwarstwowa, wewnętrzna równomiernie przylega do zewnętrznej	Czarny, gruszkowaty, do 1/4 części ciała. Wypełniony szczególnie rozmieszczonymi granulami (do 10 mk)	Ruchy słabe	0,3-0,4x0,12-0,14. RP - 0,05, BP - 0,06. Ciało o pigmentacji żółto-brązowej. Szczecinki na całym ciele za wyjątkiem samego końca ciała. Przewód pokarmowy długi, rozgałęzia się na poziomie środka pomiędzy przełykiem i przednią krawędzią

							BP. Istnieje 14 sensorycznych papilli na krawędziach ciała, 12 wokół RP, 9 wokół BP
<i>Apophallus muehlingi</i>	Baseny Morza Bałtyckiego, Czarnego i Kaspijskiego; rzeki Karpat i Zakarpacia	Karpiowate, okoniowate; szczupak, sandacz	Tkanki płetw, skrzela	0,20-0,29x0,14-0,20, o kształcie elipsy lub kulisty. Pigmentowany w postaci małych czarnych punkcików	W kształcie Y, tylny koniec wygięty w kształcie litery S		0,50-0,58x0,10-0,12. Przewód pokarmowy dochodzi do połowy długości ciała. Kutikula pokryta jest drobnymi kolcami - łuską. Załączki przewodów nasiennych leżą jeden za drugim, na skos po bokach pęcherza wydalniczego
<i>Rossicotrema donicum</i>	Rzeki, wpadające do Morza Czarnego, limany Morza Azowskiego, dolny bieg Wołgi, rz. Tisa	Okoniowate, aterynowate, rzadziej karpiowate	Tkanki płetw i ogona, rzadziej w błonie podskórnej i mięśniach	0,26-0,34x0,20-0,23, w kształcie elipsy. Kapsuła dwuwarstwowa, otoczona pierścieniem czarnego pigmentu	W kształcie litery Y		0,49-0,53x0,13-0,15. RP - 0,035-0,045. BP mniejsza niż RP. Przewód pokarmowy 0,05-0,10 (nie dłuższy niż 1/4 długości ciała). Załączki przewodów nasiennych okrągłe, o średnicy 0,04, prawie na tym samym poziomie, nieco na skos po bokach pęcherza wydalniczego
<i>Metagonimus yokogawai, M. katsuradai</i>	Słodkowodne zbiorniki państw Dalekiego Wschodu (Japonia, Chiny, Korea, FR);	Ponad 60 gatunków ryb 7 rodzin (karpiowate, sumiaste, okoniowate, łososiowate, siejowate, thymallusowate	W łusce, rzadziej na płetwach, skrzelach, w podskórnej	0,15-0,22 kształtu kulistego lub owalnego. Kapsuła dwuwarstwowa	W kształcie litery V lub workowate, czarne, granulki drobne ciemno-brunatne	Ruchy aktywne	0,32-0,40x0,09-0,1. RP - 0,05, BP - 0,04. Larwa w kształcie liścia lub języka. Na powierzchni

	rzeki Karpat, Przykarpacia i wpadające do Morza Czarnego i Morza Kaspijskiego	[łososiokształtne], szczupakowate)	tkance łącznej, mięśniach				przedniej części ciała wyraźnie widoczne twory łuskopodobne-szczecinki. Przewód pokarmowy długi, 0,18 mm. Sinus płciowy przesunięty w bok od środkowej linii ciała
<i>Cryptocotyle lingua</i>	Morze Bałtyckie, Morze Barentsa, Północny Atlantyk	Dorszowate, śledziowate i flądrowate	Podskórna tkanka łączna, mięśnie, rogówki oczu	0,8x0,6, owalnego kształtu. Kapsuła dwuwarstwowa. Otoczona pierścieniem czarnego pigmentu	W kształcie litery V		0,45-0,48. RP - 0,03x0,04, subterminalna. BP słabo zarysowana, w tylnej części ciała. Larwa o kształcie języka. Kutikula pokryta drobną szczecinką. Przyssawka płciowa większa od RP i BP z tyłu w postaci 1 ssawki
<i>Cryptocotyle sp.</i>	Morza Dalekowschodnie Oceanu Spokojnego, jezioro Sachalin, jezioro Długie	łososiowate (gorbusza, keta, nerka, kizucz, czawycza)	Podskórna tkanka łączna	0,3-0,4 owalna. Otoczona pierścieniem czarnego pigmentu	W kształcie litery V		BP nieco większa niż RP, umieszczona z tyłu za nią. Larwa o kształcie języka
<i>Heterophyes heterophyes</i>	Morza, obmywające Palestynę, Egipt, Tunezję, Izrael, Japonię, Indie; estuaria rzeczne i zbiorniki słodkowodne (w tym gospodarstwa stawowe) tych państw	mugilowate, ostrobokowate, pielęgnicowate, morenowate [lab raks]	Muskulatura ciała, serce	0,13-0,26, białawego koloru, okrągłe lub lekko owalne. Gruba kapsuła zewnętrzna (0,004-0,012) i cienka błona wewnętrzna	W kształcie serca zajmuje 1/8 część długości ciała	Metacerkarium w cyście zgięte tak, że jego przednia część nakłada się na tylną od strony brzusznej	0,21x0,40. RP - 0,03-0,05, BP - 0,03-0,04. 3/4 ciała gęsto pokryte szczecinką łuskopodobną, przedni koniec spłaszczony dorsowentralnie, tylni okrągły. Odgałęzienia

							przewodu pokarmowego ciągną się do tylnego końca ciała, od razu za rozwidleniem, są one szersze od tylnej części
<i>Nanophyetus salmtingicola</i>	Rzeki wpadające do północnej części Oceanu Spokojnego (USA, Kanada, w FR – dorzecze środkowego i dolnego Amuru, wybrzeże cieśniny Tatarskiej, zbiorniki wodne Sachalina, wysp Komandorskich)	Łososiowate (hucho, lenok, gorbusza, keta, kizucz, czawycza, Salmo trutta, американская pstrąg źródłany, łososie stałowo głowy, atlantycki); Thymallus, głowacz białopłetwy, Phoxinus, амурские жаз i szczupak amurski	Nerki, mięśnie płetw i ciała, skrzela, wątroba, ścianki przewodu pokarmowego	0,21-0,35, okrągłe (w postaci białych punktów, widocznych gołym okiem). Przeźroczysta kapsuła i kapsuła o grubych ściankach włóknista z tkanki łącznej	Duży 0,07-0,10x0,23-0,24, ciemny, wypełniony nieprzeźroczystymi granulami		0,35-0,65x0,18-0,34. RP - 0,07-0,12, BP - 0,07-0,11, zlokalizowana pośrodku długości metacerkarium. Cała kutikula pokryta cienkimi, odgiętymi do tyłu kolcami. załączki 2 nasieniowodów w tylnej połowie ciała. Odgałęzienia przewodu pokarmowego dosięgają do załączków nasieniowodów
<i>Echinochasmus perfoliatus</i>	Zbiorniki słodkowodne Dolnego Powołża, Zach. Kazachstanu (obw. aktiubiński); dorzecza Zach. Dżwiny, Dniepru, Bereziny, Soża, Prypiati	Szczupak, karpowate (sapa, rutilus, lin, karp, jaz, rozpiór, płoć, płoć kaspijska, karaś, leszcz, ukleja, boleń pospolity i in.), jazgarz, sandacz, okoń, węgorz, sum	Skrzela (na podstawie płatków skrzelowych)	0,05-0,11x0,04-0,098, okrągłego kształtu. Kapsuła przeźroczysta, elastyczna. 0,002-0,003	Wąski wijący się w dwóch płaszczyznach poza ciałem	Ruchy słabe	0,0116-0,043. RP=BP=0,0258-0,03. Ciało larwy bardzo okrągłe. RP otoczona otoczką adroalną, jej szerokość jest mniejsza od szerokości ciała. Duże załamujące światło szczecinki zlokalizowane są dorsalnie, w

							przerywanym rzędzie z 24 szczecinek
--	--	--	--	--	--	--	---

* RP – przyssawka jamy gębowej

** BP – przyssawka brzuszna

3.2.11.3.3. Odcinek ciała najbardziej prawdopodobnej lokalizacji metacerkariów czyszczony jest z łuski, następnie skalpelem nacinana jest skóra w linii środkowej grzbietu i dwoma nacięciami od pierwszego nacięcia w linii bocznej oddzielany jest odcinek środkowej trzeciej części grzbietu. Skórę z oddzielonego odcinka podnosi się pincetą i przy pomocy skalpela oddzielana jest ona tak, żeby błona podskórna pozostała na powierzchni mięśni. Ostрым skalpelem zeszkrobuję się lub wycina cienkie plastry powierzchni warstwy mięśni, o grubości nie więcej niż 2-3 mm, umieszcza się je na dolnym szkle kompresorium, nakrywa się drugim szkłem i ścisza je. Najwygodniej jest korzystać ze szkieł kompresorowych, wyciętych ze zwykłego szkła okiennego z krawędziami obrobionymi ścierniwem. Wymiary szkieł 6-8x12-15 cm, dolne szkło nieco większe od górnego, grubość 3-5 mm. Ścinki oglądane są przy pomocy mikroskopu typu MBS, z wykorzystaniem powiększenia 16-48 razy (okular 8x, 12x, obiektyw 2x, 4x). Dla sprecyzowania diagnozy kawałki tkanki z larwami przenoszone są na szkła przedmiotowe, nakrywane nakrywkowymi i badane przy dużym powiększeniu (na przykład obiektyw 8x, 10x, okular 7x lub 10x, binokularowa nakładka 1,5x) przy pomocy mikroskopu typu Białom, Bimam.

Przy wykryciu larw można ograniczyć się do badania mięśni z jednej strony ciała. Przy braku larw należy obejrzeć także ścinek z drugiej strony. Przy badaniu młodych ryb o długości do 20-25 mm kompresowane są one w całości. Większe roczne ryby rozcinane są na dwie połowy i oglądane w kompresorium od strony rozcięcia, bez zdejmowania skóry i usuwania łuski.

Wysychające ścinki, preparaty zwilżane są wodą lub roztworem fizjologicznym z pipetki.

3.2.11.4. *Metoda przygotowywania w sztucznym soku żołądkowym.* Niezbędne odczynniki i wyposażenie (dodatkowo):

1. Odczynniki chemiczne: pepsyna; stężony HCl; NaCl; woda destylowana.
2. Waga z kompletem odważników lub waga elektroniczna
3. Szpatułki (łopatki) metalowe, szklane, drewniane
4. Lejki szklane różnych rozmiarów
5. Cylindry miarowe (0,5-0,25 l)
6. Słoiki szklane z dopasowanym korkiem dla przechowywania odczynników (0,1, 0,25, 0,5 l)
7. Słoiki szklane (lub kolby) dla wody destylowanej o pojemności 1-2 l
8. Zestaw szklanych pipetek miarowych o pojemności (od 1 do 10 ml)
9. Szklanki chemiczne
10. Szkiełka nakrywkowe
11. Sitka z oczkami 1x1 mm
12. Termostat
13. Lodówka

3.2.11.4.1. W specjalnych celach, w razie konieczności, wydzielenia larw z tkanek hydrobiontów (dla różnicowania przynależności gatunkowej, materiału dla kontrolnej próby biologicznej, przy niskiej intensywności inwazji lub dla jej obliczenia) wykorzystywana jest metoda przygotowywania. Jest ona także bardziej efektywna przy badaniu produktów przetwórstwa hydrobiontów (farszu, przerwu). Głównie wykorzystywana jest dla wyodrębnienia metacerkariów trematod, rzadziej larw nematod.

3.2.11.4.2. Metoda oparta jest na tym, że w środowisku kwaśnym metacerkaria uwalniane są z zewnętrznej otoczki, a otaczająca je tkanka mięśniowa przygotowywana jest w sztucznym soku żołądkowym.

3.2.11.4.3. *Przygotowanie sztucznego soku żołądkowego.* Na 1000 ml wody destylowanej (jeśli nie ma jej można wykorzystać przygotowaną ochłodzoną do temperatury 37-38°C wodę z wodociągu) dodaje się 7 g pepsyny, 9,0 g soli kuchennej (NaCl) i 10 ml stężonego kwasu solnego (HCl).

3.2.11.4.4. Dla wykrycia metacerkariów trematod brana jest podskórna tkanka mięśniowa (do 0,5 cm), a drobnych larw nematod – cała tkanka mięśniowa. Oddzielana jest ona od skóry, rozdrabniana nożem lub w maszynce do mięsa (przy wydzieleniu larw nanofietusa wykorzystywane są dodatkowo nerki). Następnie zalewana jest ona w proporcji 1:10 przygotowanym sztucznym sokiem żołądkowym (1 część farszu i 10 części sztucznego soku żołądkowego). Próbkę umieszczana jest w termostacie na 3 godz. w temperaturze 36-37°C, po czym zawartość filtrowana jest do szklanych cylindrów przez metalowy filtr z rozmiarem oczek 1x1 mm lub jedną warstwę bandaża. Po 15-20 min górną warstwę soku żołądkowego z przygotowaną tkanką mięśniową zlewa się, a osad przenosi się do naczynia Petriego (lub na głębokie szkło zegarkowe) i bada się pod mikroskopem. Dla lepszego oddzielenia larw do naczynia Petriego nalewa się roztworu fizjologicznego, wykonuje się kilka kolistych ruchów, w rezultacie których metacerkarium koncentruje się w środku naczynia Petriego (szkła zegarkowego), a pozostałości roztworu fizjologicznego z pozostałościami tkanki mięśniowej usuwane są pipetką. Procedura powtarzana jest do pełnego zaniku pozostałości nieprzygotowanej tkanki mięśniowej.

Efektywność metody przygotowywania, w porównaniu z kompresorową, jest o 1,5 razy wyższa. Metacerkaria trematod, wydzielone w ten sposób ze świeżych ryb, zachowują swą strukturę i zdolność do życia w roztworze fizjologicznym w ciągu 10-24 godz. w temperaturze 20-25°C i 5-7 dni w temperaturze 1-4°C i mogą być wykorzystane jako próbki biologiczne.

3.2.12. Wcześniej przygotowaną łuskę (2.1.6) bada się z wykorzystaniem mikroskopu MBS (powiększenie 16-48 razy, okular 8x, 12x, obiektyw 2x, 4x) w niedużej ilości wody na obecność metacerkariów *Metagonimus yokogawai*, *Metagonimus katsuradai*.

3.3. Metodyka niepełnego badania parazytologicznego płazów i gadów

3.3.1. Procedura i tryb badania płazów i gadów są analogiczne do tych przy badaniu ryb. Badana jest jama ciała, organy i tkanki, włącznie z tkanką mięśniową.

3.4. Metodyka niepełnego badania parazytologicznego bezkręgowców

3.4.1. Mięczaki w dwuczęściowej skorupie.

3.4.1.1. W celu otwarcia muszli cienki nóż lub skalpel wprowadzany jest pomiędzy części muszli i rozcinany jest mięsień zwieracz. Z otwartej muszli, po nacięciu płaszczu w jej przedniej części, zlewany jest ciecz płaszczowa. Pomiedzy jedną z połówek muszli i przylegającą do niej fałdą płaszczu wprowadzana jest płaska rączka skalpela. Przesuwając ją po krawędzi połówki muszli do przodu i do tyłu, na początku oddzielana jest krawędź płaszczu, przyczepiona do połówki muszli, następnie przedni i tylny mięsień zwieracz (adduktor). W kolejnym etapie oddziela się płaszcz i adduktory od drugiej połowy muszli, po czym muszlę łatwo jest usunąć.

Muszle przegrzebkwatych i ostryg mają jeden adduktor i znajduje się on w środku ciała, nieco bliżej tylnej krawędzi.

3.4.1.2. Wyjęte z muszli ciało mięczaka umieszczane jest w kuwecie (lub naczyniu Petriego) z wodą. Badany jest płaszcz i prześwitujące w części grzbietowej ciała przez półprzezroczystą skórę, organy wewnętrzne: wątroba, leżąca bezpośrednio z tyłu przedniego adduktora lub po stronie grzbietowej nad adduktorem (u przegrzebkwatych i ostryg), perikardium i graniczące z tylnym adduktorem nerki. Wykryte larwy nematod wyjmowane są igłą preparacyjną.

3.4.1.3. Fałdy płaszczu odcinane są i badane na prześwit (ppkt. 3.2.11.2) lub kompresorowo (ppkt. 3.2.11.3). Następnie odcinane i badane są skrzela.

3.4.1.4. Preparowane są gonady, zalegające w grzbietowej części nogi. Są one członowane i składają się z wielu drobnych płatów, otaczających pętle jelit. Gonady badane są w sposób kompresorowy. Tutaj najbardziej prawdopodobnym jest wykrycie larw *Echinocephalus sinensis* i *Sulcascaris sulcata*. Następnie oddzielany jest układ pokarmowy i badany jest w taki sam sposób.

3.4.1.5. Adduktory i noga badane są tak samo jak muskulatura u ryb (ppkt. 3.2.11). Adduktor przegrzebkwatych to miejsce największego prawdopodobieństwa lokalizacji *Sulcascaris sulcata*.

3.4.1.6. Wykryte larwy umieszczane są w naczyniu Petriego lub na szkle zegarkowym z roztworem fizjologicznym dla dalszego określenia rodzaju pasożyta.

3.4.2. *Mięczaki głowonogie.* U kalmarów i kałamarnic rozcinany jest płaszcz po stronie brzusznej. Rozcięcie wykonywane jest nożycami lub skalpelem po linii środkowej, zaczynając od płaszczu, do podstawy płetwy. Przy tym należy starać się by nie uszkodzić worka z atramentem. U ośmiornic, oprócz tego, rozcinana jest umięśniona podłużna przegroda, otwierając dostęp do jamy płaszczu. Odchyla się ścianki płaszczu i ogląda wnętrze. Następnie oddzielane są skrzela, gonady, układ pokarmowy. Organy wewnętrzne badane są kompresorowo. Szczególną uwagę należy zwrócić na gonadę, gdzie możliwe jest wykrycie larw nematod gatunku *Anisakis*. Uwolniony od organów wewnętrznych płaszcz bada się analogicznie do tkanki mięśniowej ryb – na prześwit (ppkt.3.2.11.2) lub metodą rozcięć równoległych (ppkt.3.2.11.1). Po wewnętrznej stronie płaszczu, w błonkach spotykane są larwy nematod gatunków *Anisakis* i *Contracaecum*.

3.4.3. Skorupiaki.

3.4.3.1. Przy badaniu krabów i raków słodkowodnych na obecność metacerkariów paragon imid w pierwszej kolejności badane są mięśnie odcinka piersiowego i serce, jako miejsca największego prawdopodobieństwa lokalizacji larw (do 90% przypadków). W tym celu u skorupiaków ścinany jest nożycami karapaks, następnie przy pomocy skalpela wycinane są mięśnie odcinka piersiowego. Przy wykorzystaniu metody kompresorowej (ppkt.3.2.11.3), badane są pod mikroskopem przy powiększeniu 16-48 razy (okular 8x, 12x, obiektyw 2x, 4x). Z tylnej części odcinka piersiowego oddziela się serce i bada w taki sam sposób.

3.4.3.2. Z bocznych stron głowo-piersi wycinane są skrzela i badane są kompresorowo w niedużej ilości wody.

3.4.3.3. Dla oddzielenia mięsa z jamy brzusznej, odcina się go od piersi i nożycami rozcina się pancerz od górnej krawędzi „szyjki” do telsonu (wachlarza [kolca]ogonowego). Kończyny (u krabów i raków) rozcinane są na części (w poprzek) w pobliżu stawów skórzastych, z równoczesnym rozcięciem płytki chitynowej, przymocowanej do stawu. Rurki pancerzowe rozcinane są wzdłuż i wyjmowane jest mięso. Kleszcze rozbijane są ostrym i silnym uderzeniem drewnianego młotka. Całą tkankę mięśniową bada się w kompresorium.

3.4.3.4. Całą wydzieloną tkankę mięśniową można badać metodą przygotowywania w sztucznym soku żołądkowym (ppkt.3.2.11.4).

4. Metody zróżnicowanej diagnostyki larw pasożytów

Niezbędne odczynniki i wyposażenie:

1. Odczynniki chemiczne: roztwór fizjologiczny; ciecz dla prześwietlania nematod (1część wody destylowanej + 1 część stężonego kwasu mlekowego + 1 część gliceryny)
2. Szkiełka przedmiotowe
3. Duże szkiełka przedmiotowe (6-8x12-15 cm, o grubości 2-4 mm)
4. Szkiełka nakrywkowe
5. Naczynia Petriego
6. Szkiełka zegarkowe
7. Pincety różnych rozmiarów (anatomiczne, chirurgiczne, do brwi)
8. Igły preparacyjne o różnej grubości
9. Pipetki szklane (pasteurowskie)
10. Gruszki gumowe
11. Binokularowy mikroskop typu MBS
12. Lupa
13. Oświetlacz dla binokularu dowolnej marki
14. Mikroskop świetlny typu Biolam, Bimam
15. Oświetlacz do mikroskopu dowolnej marki
16. Okular-mikrometr dla mikroskopu świetlnego
17. Okular-mikrometr dla mikroskopu binokularowego
18. Obiekt-mikrometr

Dla określenia przynależności gatunkowej larw pasożytów konieczne jest badanie z zastosowaniem środków optycznych.

Wyjęte z ryb, mięczaków, skorupiaków, płazów, gadów plerocerkoidy, larwy nematod, przywr, oddzielone od tkanek metacerkaria lub twory, które mogą być przyjęte za pasożyty (w tym incystiowane lub inkapsulowane), umieszczane są na szkiełku przedmiotowym w kropli wody lub roztworu fizjologicznego, nakrywane są szkiełkiem nakrywkowym i badane są na początku pod małym (56-150 razy, okular 7x, 10x, obiektyw 8x, 10x, nakładka binokularowa 1,5x), a następnie (140-600 razy, okular 7x, 10x, obiektyw 20x, 40x, nakładka binokularowa 1,5x) powiększeniem mikroskopu.

Zróżnicowana diagnostyka nematod wymaga wcześniejszego przetrzymywania larw w prześwietlającej cieczy. Duże larwy z gęstą kutikulą prześwietlane są do dwóch-trzech dni (larwy *rodz. Anisakidae*), drobne z cienką kutikulą – nie mniej niż 3-5 godz.

Dla przeprowadzenia niezbędnych pomiarów larw, poszczególnych ich części lub organów należy korzystać z okularu-mikrometru (okular, z zamontowaną w jego focalnej płaszczyźnie przezroczystą płytką z linijką o długości 1 cm z podziałką odpowiadającą 0,1 mm). Odcinek podziału skali przy wykorzystaniu różnych obiektów zmienia się i obliczany jest przy pomocy obiektu-mikrometru-preparatu, który jest naniesiony na szkło o skali z odcinkiem podziałki 0,01 mm. Jeśli m dzielenia obrazu obiektu-mikrometru pod względem wielkości odpowiada podziałce skali okularowej, dokładna wartość powiększenia obiektywu (b) będzie równa $b=10n/m$. Przy pomiarze obiektów obserwuje się, w granicach podziału ile dzieleń n skali okularowej mieści się obraz mierzonego elementu i jego rozmiar (a) obliczany jest według wzoru: $a=0,1n/m$.

W przypadku, jeśli badający nie może ustalić przynależności gatunkowej larw robaków, pasożyty należy umieścić w substancji stabilizującej (patrz rozdział 6) i wysłać na konsultację do bazowych (głównych w systemach certyfikacji lub SOKL*) laboratoriów (ośrodków) badawczych, akredytowanych w ustalonym trybie lub do profilowych instytutów naukowo-badawczych.

* SOKL [CHJIK] – sieć obserwacji i kontroli laboratoryjnej. 20

4.1. Zróżnicowana diagnostyka larw cestod

4.1.1. Cestody, zarażenie człowieka którymi odbywa się przy spożywaniu nieunieszkodliwionej produkcji rybnej, należą do rodziny *Diphyllbothriidae*.

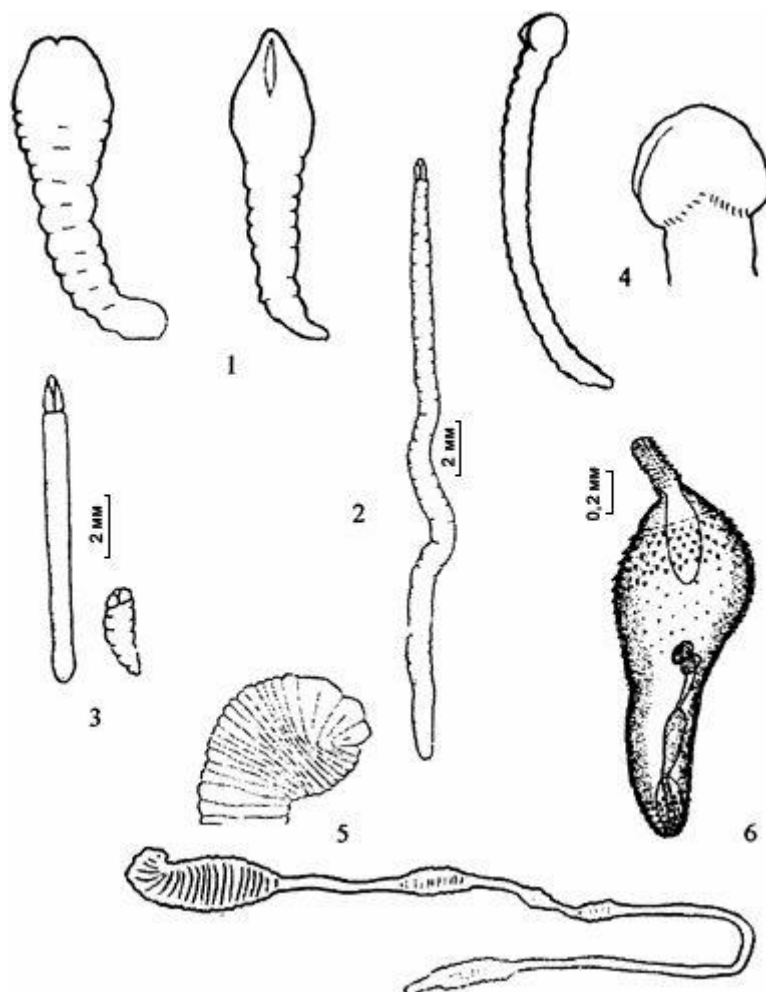
W słodkowodnych, przejściowych i morskich rybach, a także płazach i gadach pasożytuje stadium larwalne bruzdogłowca – plerocerkoid, posiadające postać nierozczłonowanego miękkiego robaka (fałdy na ciele mogą stwarzać wrażenie fałszywej segmentacji), lekko spłaszczonego w kierunku dorsowentralnym, koloru biało-mlecznego lub kremowego. Część głowowa (skoleks) nie posiada haczyków lub innych podobnych

tworów, ale ma dwie przyssawki szczelino-podobne (bothrie) – organy przyczepne. Długość ciała larwy waha się od 1-2 mm do 10 i więcej centymetrów. Ustalenie obecności larwy skoleksu ze szczelinami przyssawkowymi jest niezbędne, ponieważ za plerocerkoid mogą być przyjęte ich fragmenty lub fragmenty innych cestod. U żywych, dopiero wyjętych ze świeżej ryby plerocerkoidów, skoleks jest wyciągnięty (inwaginowany) lub częściowo wyciągnięty, ale przy umieszczeniu ich w ciepłej wodzie skoleks wyciąga się, kurcząc i osłabiając. Na wyciągniętym skoleksie widoczne stają się bothrie.

4.1.2. Dojrzałe płciowo formy robaków r. *Diphyllbothrium* spotykane są w jelitach ssaków morskich i lądowych, ptaków rybożernych. U człowieka mogą pasożytować *Diphyllbothrium latum*, *Diphyllbothrium dendriticum* i *Diphyllbothrium luxi* (*D. klebanovskii*). *Diphyllbothrium ditremum* – pasożyt ptaków rybożernych – może także osiedlać się u człowieka, ale nie osiąga dojrzałości płciowej i nie wydaje jaj, jego znaczenie medyczne jest niewielkie. Zauważa się pasożytowanie u człowieka bruzdogłowców gatunku *Dyplogonoporus* (*D. fukuokaensis* zarejestrowany u człowieka w Japonii), których zarażenie następuje od nieunieszkodliwionych ryb morskich i przejściowych. Plerocerkoidy rodziny *Dyplogonoporus* morfologicznie podobne są do takich rodziny *Diphyllbothrium*.

Przypadki sparganozy człowieka, wywołanej przez *Spirometra erinacei-europaei*, spotykane są sporadycznie w Rosji w państwach Południowo-Wschodniej Azji, rzadziej na innych kontynentach (w Australii i Ameryce rozprzestrzenione są inne rodzaje *Spirometra*). Plerocerkoidy (sparganum) rodziny *Spirometra* u człowieka nie rozwijają się w dorosłym stadium. Ich końcowi żywicieli – drapieżniki domowe i dzikie (rodz. Psowate, Kotowate).

4.1.3. Przy określaniu rodzaju plerocerkoidów wykorzystywane są cechy morfologiczne, charakter lokalizacji larw (kapsuł z larwami), skład dodatkowych żywicieli, rozprzestrzenienie geograficzne (patrz tab. 1, rys.1-5).



Rys.1-6. 1 - *Diphyllbothrium latum* (ze skoleksami inwaginowanymi i ewaginowanymi); 2 - *D. dendriticum*; 3 - *D. ditremum* (w stanie rozluźnionym i skurczonym); 4 - *Pyramicocephalus phocarum* (wygląd zewnętrzny i koniec głowowy); 5 - *Spirometra erinacei-europaei* (koniec głowowy i wygląd ogólny); 6 - *Corynosoma strumosum*.

Oprócz tego, przy badaniu świeżych i schłodzonych ryb ma znaczenie taka cecha, jak okres przeżywania larw w słodkiej wodzie. Tak więc, rozwinięte *Diphyllbothrium latum* i *Diphyllbothrium luxi* (*D. klebanovskii*) przeżywają w wodzie około doby i więcej, *Diphyllbothrium dendriticum* - do 2,5 godz. (drobne – nie więcej niż 1 godz.), a *Diphyllbothrium ditremum* (według lokalizacji larw inkapsułowanych podobnie jak *Diphyllbothrium dendriticum*) – nie więcej niż 10 min.

Sparganum *Spirometra erinacei-europaei* z nieuszkodzonym tegumentem przeżywają w wodzie wodociągowej ponad dobę, w roztworze fizjologicznym - do 8-13 dni.

4.2. Zróżnicowana diagnostyka metacerkariów trematod

4.2.1. Trematody to najbardziej rozpowszechnione pasożyty ryb morskich i słodkowodnych. Przeważająca większość z nich nie jest niebezpieczna dla zdrowia człowieka. Metacerkarium trematod - czynnik wywołujący choroby człowieka – należy do 5 rodzin: *Opisthorchidae*, *Heterophyidae*, *Nanophyetidae*, *Echinostomatidae* i *Paragonimidae*.

Przy określaniu rodziny i rodzaju trematod w pierwszej kolejności brany jest pod uwagę ich rozmiar i forma cysty, charakter jej otoczek; położenie larwy w cystie (ruchliwość*) i jej budowę, w tym rozmiar, kolor i kształt pęcherza wydalniczego; krąg dodatkowych żywicieli i lokalizację w ciele ryb lub skorupiaków (patrz tab. 2, 3). Wszystkie niebezpieczne dla zdrowia człowieka metacerkaria, spotykane w rybach, zamknięte są w cystach. Wymiary cyst nie przekraczają 1 mm. Dlatego wykryte w rybach większe lub wolne, nieincystowane metacerkaria nie wymagają dalszego badania.

* W tych przypadkach, kiedy dla metacerkariów charakterystyczna jest ruchliwość wewnątrz cysty, można ją obserwować nie tylko w świeżo wyłowionej rybie, ale i w ciągu kilku dni po tym. Ruchliwość może odnawiać się także po przemrażaniu produkcji rybnej, niewystarczającym czasowo dla zginienia larwy, przy podwyższeniu temperatury do 37°C.

Metacerkaria rodz. *Paragonimidae* mogą występować zarówno w cystach, jak i wolne.

Określenie trematod według rodzaju zgodnie z budową cysty możliwe jest tylko przy odpowiednich umiejętnościach badacza. W przeciwnym przypadku dla sprecyzowania przynależności gatunkowej trematod celowym jest wydostanie metacerkarium z cysty.

Dokładnie oddzieloną od otaczających tkanek cystę umieszcza się na szkiełku w kropli wody lub roztworu fizjologicznego. Jej otoczkę rozrywa się cienkimi igłami (najlepiej agrałkami entomologicznymi nr 00) lub przez lekkie naciskanie szkiełka nakrywkowego. Jeśli przy tym larwa sama nie wychodzi z cysty, wymywana jest ona wodą z pipetki. Wyjście metacerkarium z cyst można stymulować, oddziałując treścią duodenalną człowieka lub zwierząt, lub trypsyną (patrz ppkt.5.3.1).

Według morfologii wydzielonych cyst larw wiele można sądzić o budowie dorosłych trematod. Otwór gębowy u metacerkarium trematod wszystkich pięciu rodzin umieszczony jest na przednim końcu, otoczony przyssawką gębową. Przedni koniec ciała nie ma jakichkolwiek wyrostków lub przyssawek bocznych. Przyssawka brzuszna zarysowana jest mniej lub więcej. Organ Brandsa z tyłu przyssawki brzusznej nie istnieje. Jelita z bifurkacją, Gałęzie jelit bez odgałęzień.

Dalsze określanie metacerkariów, posiadających wyżej wymienione oznaki, prowadzone są w następujący sposób:

1(2) Metacerkaria zlokalizowane są w różnych tkankach skorupiaków

rodz. *Paragonimidae* (ppkt.4.2.6)

2(1) Metacerkaria zlokalizowane są w różnych tkankach ryb

3(4) Przedni koniec ciała wyposażony jest w szczecinki

rodz. *Echinostomatidae* (ppkt.4.2.5)

4(3) Przedni koniec ciała nie ma szczecinek

5(8) Gałęzie jelit długie, do końca ciała

6(7) Gałęzie jelit proste. Nie ma szczecinek wokół otworu gębowego. Przyssawka brzuszna, z reguły, większa niż gębową.

Nie ma przedgardzieli. Pęcherz wydalniczy duży, ciemny

rodz. *Opisthorchidae* (ppkt.4.2.2)

7(6) Końce gałęzi jelit bardziej lub mniej zginają się do wewnątrz, do środkowej linii ciała. Istnieje przedgardziel

rodz. *Heterophyidae* (ppkt.4.2.3)

8(5) Gałęzie jelit krótkie, nie przechodzą za poziom tylnej krawędzi załączków nasieniowodów

rodz. *Nanophyetidae* (ppkt.4.2.4)

4.2.2. Do rodz. *Opisthorchidae* należą trematody z wydłużonym, spłaszczonym i zawsze zauważalnie zwężonym do przodu ciałem. Przyssawki dość słabo rozwinięte i zbliżone. Gałęzie jelit długie, przewód pokarmowy o różnej długości. W dorosłym stadium – pasożyty dróg żółciowych wątroby, pęcherza żółciowego i gruczołu podżołądkowego ssaków, ptaków, gadów.

1(2) Cysta z grubą otoczką, sferyczna.

Metorchis xanthosomus (rys.8)*

* Nie ma znaczenia medycznego.

2(1) Cysta z cienkimi ściankami, sferyczna lub owalna

3(6) Przewód pokarmowy długi, rozwidlenie jelit oddalone od przyssawki gębowej

4(5) szczecinki na całym ciele. Żółto-brązowa pigmentacja ciała. Przyssawka gębowa mniejsza niż brzuszna

Clonorchis sinensis (rys.11)

5(4) szczecinki do tylnej krawędzi przyssawki brzusznej*. Ciało niepigmentowane. Przyssawka gębowa i brzuszna mniej więcej jednakowej wielkości

Opisthorchis felineus (rys.7)

* szczecinki łatwo odrywają się przy wyciągnięciu larwy z cysty i nie zawsze są widoczne. Nie udaje się badanie ich bez wyjęcia larwy z cysty.

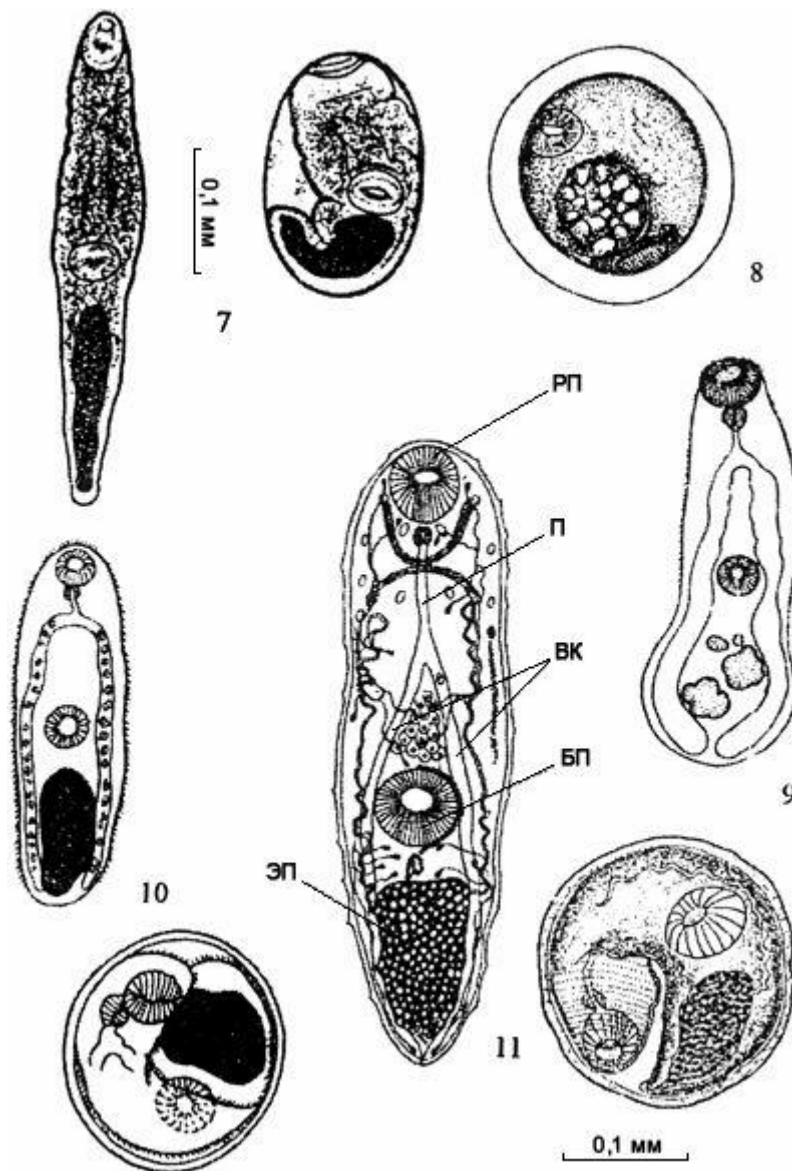
6(3) Przewód pokarmowy krótki, rozwidlenie jelit przybliżone do przyssawki gębowej

7(8) Ciało pokryte kolcami, dochodzącymi prawie do tylnego końca ciała. Przyssawka brzuszna większa od gębowej

Pseudamphistomum truncatum (rys.9)

8(7) szczecinki do poziomu tylnego końca przyssawki brzusznej. Przyssawki jednakowej wielkości

Metorchis bilis (rys.10).



Rys.7-11. 7 - *Opisthorchis filineus* (larwa poza cystą i w cystie); 8 - *Metorchis xanthosomus*; 9 - *M. bilis* (*M. albidus*); 10 - *Pseudamphistomum truncatum* (larwa poza cystą i w cystie); 11 - *Clonorchis sinensis* (larwa poza cystą i w cystie). RP (PI) – przyssawka gębowa; P (II) – przewód pokarmowy; OJ (BK) – odgałęzienia jelit; PB (БП) – przyssawka brzuszna; PW (ЭП) – pęcherz wydalniczy.

4.2.3. Do rodz. *Heterophyidae* należą drobne trematody z ciałem, pokrytym kolcami [szczecinką] łuskopodobnymi, których liczba zmniejsza się do tylnego końca. Przyssawki słabo rozwinięte. U gatunków, posiadających znaczenie medyczne, przyssawka gębowa bez szczecinki. Załączki nasieniowodów w tylnym końcu ciała, zwykle w jednej poziomej linii lub lekko na skos. Po stronie brzusznej istnieje bardziej lub mniej rozwinięte wgłębienie – sinus genitalny, w którym bywa ukryta zredukowana przyssawka brzuszna. Istnieje przyssawka płciowa, która często łączy się z brzuszną w ogólny kompleks.

Zwykle pasożyty jelit ptaków i ssaków zjadających ryby. Przypadki zarażenia człowieka *Heterophyes heterophyes* zostały opisane w Japonii, Indiach, Palestynie, Egipcie, Tunezji. Choroby człowieka, spowodowane pasożytowaniem *Metagonimus yokogawai*, rejestrowane są tylko w państwach Azji Południowo-Wschodniej i południowej części Dalekiego wschodu FR, w tym czasie kiedy w Europejsko-Kaukaskiej części arealu trematodę wykryto jedynie u ssaków i ptaków.

1(2) Pęcherz wydalniczy w kształcie serca

Heterophyes heterophyes (rys.13)

2(1) Pęcherz wydalniczy innego kształtu (w kształcie litery V, Y lub w postaci worka)

3(4) Sinus płciowy przesunięty w bok

Metagonimus yokogawai, *Metagonimus katuradai* (rys.12)

4(3) Sinus płciowy umieszczony medialnie

5(8) Przyssawka płciowa reprezentowana jest przez dwie bardziej lub mniej wyrażone przyssawki z przodu przyssawki brzusznej

6(7) Przedgardziel długa, przewód pokarmowy osiąga połowę długości ciała. Przeważa u ryb karpowatych

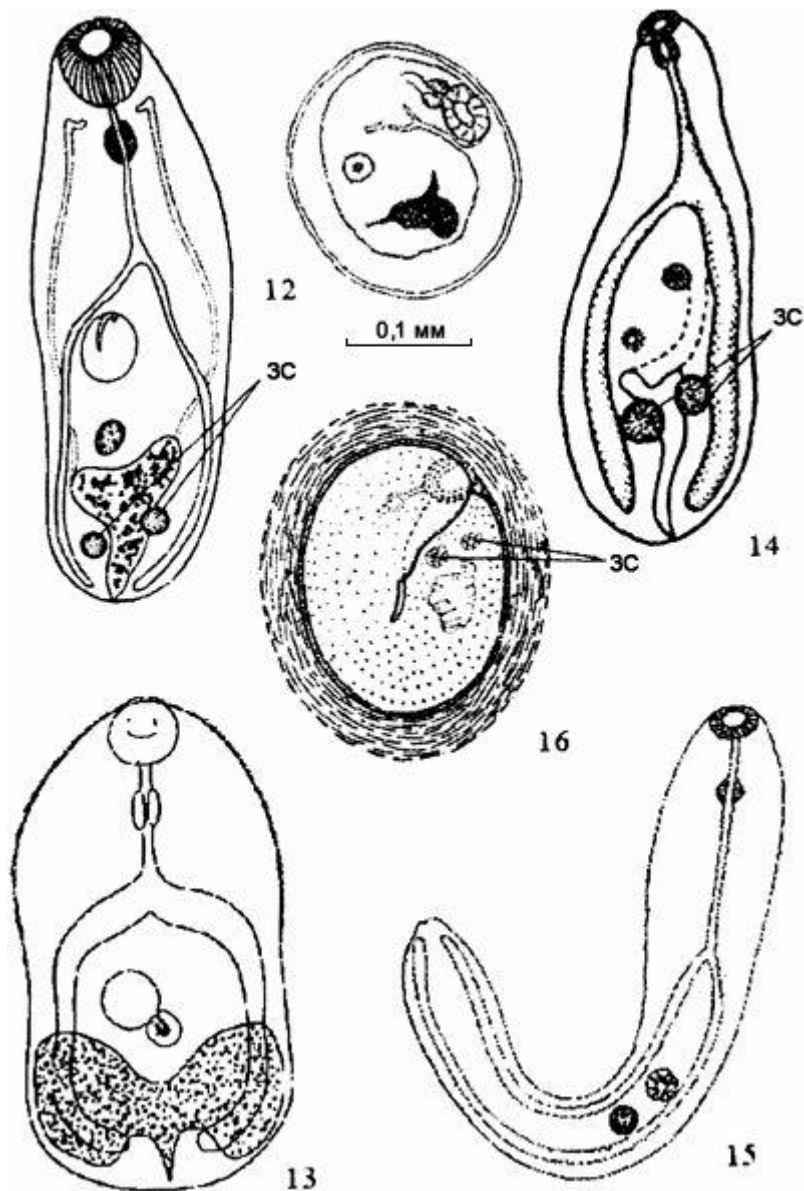
Apophalus muehlingi (rys.15)

7(6)Przedgardziel krótka, przewód pokarmowy nie dłuższy niż 1/4 ciała. Przeważa u ryb okoniowatych

Rossicotrema donicum (rys.14)

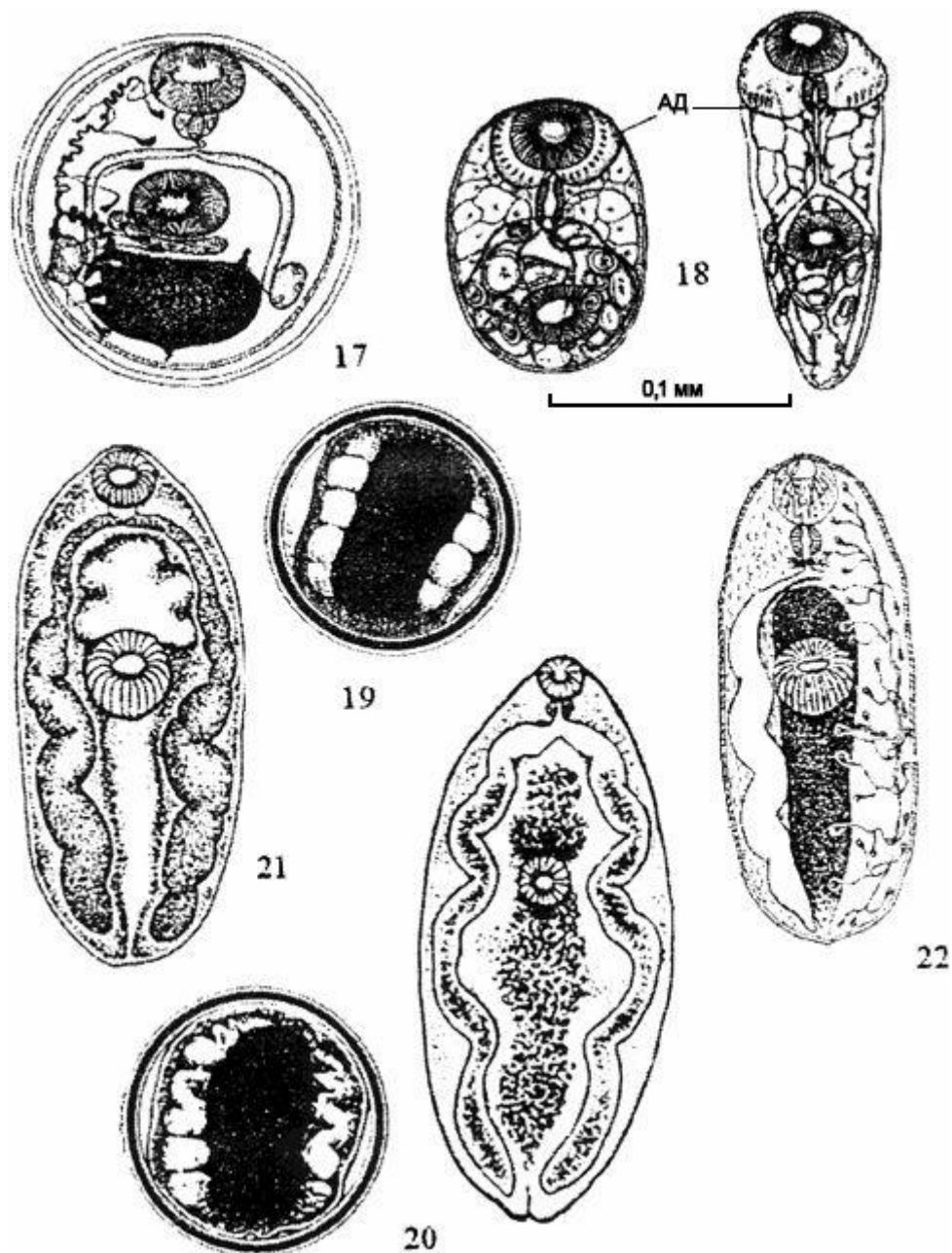
8(5) Przyssawka płciowa reprezentowana jest przez jedną przyssawkę, zlokalizowana z tyłu przyssawki brzusznej

r. *Cryptocotyle* (rys.16)



Rys.12-16. 12 - *Metagonimus yokogawai* (larwa poza cystą i w cystie); 13 - *Heterophyes heterophyes*; 14 - *Rossicotrema donicum*; 15 - *Apophallus muchlingi*; 16 - *Cryptocotyle lingua*. 3C - zalążki nasieniowodów.

4.2.4. Do rodz. *Nanophyetidae* należą malutkie gruszkowate lub wydłużone trematody. Przyssawka gębowa subterminalna, dobrze rozwinięta. Przelyk istnieje. Przewód pokarmowy bardzo krótki, jelita o różnej długości (gałęzie nie przechodzą poza poziom tylnej krawędzi zalążków nasieniowodów). Przyssawka brzuszna w środkowej trzeciej części ciała. Zalążki nasieniowodów leżą symetrycznie w tylnej części ciała. Pęcherz wydalinowy workowaty. Pasożyty jelit człowieka, ssaków i ptaków rybożernych (*Nanophyetus salmincola*) (rys.17).



Rys.17-22. 17 - *Nanophyctus salmincola*; 18 - *Echinochasmus perfoliatus* (larwa w cyście i poza cystą); 19 - *Paragonimus westermani* westermani; 20 - P. w. *ichunensis* (larwa poza cystą i w cyście); 21 - P. w. *mexicanus*; 22 - P. *mexicanus*. АД – tarcza adoralna.

4.2.5. U trematod rodz. *Echinostomatidae* przedni koniec ciała tworzy osobliwy kołnierz (tarczę adoralną), otaczający przyssawkę gębową i noszący na krawędzi pojedynczy lub podwójny rząd dużych szczecinek, których ilość i rozmieszczenie określone jest dla poszczególnych rodzin i gatunków. Określenie związane jest z trudnościami, ponieważ w pierwszych etapach rozwoju (10-12 dni) larwy nie mają tarczy adoralnej. Dojrzałe płciowo robaki r. *Echinochasmus* – pasożyty jelit ptaków rybożernych. Opisano przypadki zarażenia człowieka *Echinochasmus perfoliatus* (rys.18).

4.2.6. Ciało ekscystowanej metacerkarii rodz. *Paragonimidae* ma kształt wydłużono-owalny. W żywej postaci metacerkarium zdolne jest do silnego wydłużania się i skracania. Tegument uzbrojony jest w gęste rzędy szczecinek, których wielkość zmniejsza się w kierunku tylnego końca. Przyssawki są słabo rozwinięte, o jednakowych wymiarach, w gębowej prawie wszędzie istnieje bagno. Przewód pokarmowy jest krótki, gałęzie jelit dosiegają końca ciała, całą przestrzeń pomiędzy nimi wypełnia duży workowaty czarny (w przechodzącym świetle) pęcherz wydalinowy. Z przodu przyssawki brzusznej umieszczonych jest 14 dużych komórek gruczołowych (rys.19-22), które rozdzielone są na dwie grupy.

W tab. 3 przytoczono oznaki diagnostyczne metacerkariów paragonimid, wiarygodnie zarejestrowanych w charakterze czynników wywołujących różne formy paragonimozę u człowieka. Tym nie mniej, należy uważać, że potencjalne znaczenie medyczne mają wszystkie rodzaje paragonimid: jedne wywołują typową paragonimozę płucną, inne dają większy procent atypowych lokalizacji, a trzecie nie rozwijają się w człowieku do stadium mezocerkarium [Digenea], a wykorzystują go jako żywiciela paratenicznego.

Tabela 3

Zróznicowane cechy metacerkariów trematod rodz. Paragonimidae, niebezpiecznych dla zdrowia człowieka

Rodzaj robaków	Rozprzestrzenienie geograficzne	Rodzaje słodkowodnych skorupiaków – drugich dodatkowych żywicieli	Wymiary i kształt cysty (mm)	Budowa i wymiary larwy uwolnionej od cysty (w mm)
1	2	3	4	5
<i>Paragonimus westermani westermani</i>	Indie, Sri Lanka, Tajlandia. Malezja, Indonezja, ChRL, Japonia, Rosja (południowe i środkowe rejony Chabarowskiego kraju, Południowe Przymorze)	Kraby r. Parathelphysa, Candidopotamon, Potamon i in., raki r. Cambaroides	0,259-0,300 sferyczna trójwarstwowa kapsuła	0,8-1,1x0,27-0,38. RP - 0,065-0,08x0,09-0,1, BP - 0,115-0,14x0,0117-0,147 umieszczona preekwatorialnie. Powierzchnia ciała gęsto pokryta włoskami. Piony jelitowe robią trzy zgięcia i ciągną się do końca ciała
<i>P. w. ichunensis</i>	ChRL, Rosja (południowe i środkowe rejony Chabarowskiego kraju, Południowe Przymorze)	Raki Cambaroides schrencki, C. dauricus	0,259-0,347 sferyczna trójwarstwowa kapsuła	0,4-0,86x0,22-0,15. RP - 0,08-0,09, стилет - до 0,017, BP - 0,10-0,11. Ekscystowane metacerkarium jest bardzo ruchome. Cała powierzchnia gęsto pokryta pojedynczymi szczecinkami
<i>P. w. fuipinus</i>	Filipiny	Kraby Sundathelphysa picta, S. phitippina	0,295x0,278, kapsuła dwuwarstwowa	0,432-0,624x0,192-0,269. RP - 0,074x0,079, stylilet 0,012-0,019. BP - 0,079-0,096x0,084-0,101
<i>P. heterotremus</i>	Tajlandia, ChRL, Laos	Kraby r. Potamin, Potamon	0,274-0,319x0,217-0,251, kapsuła trójwarstwowa*	0,34x0,08, RP - 0,04-0,07, bagnet podobny do kindżału, BP - 0,05-0,08x0,06. Gałęzie jelit pogrubiają się w kierunku tyłu, tworząc 2-3 zgięcia
<i>P. kellicotti</i>	Północna Ameryka	Raki p. Cambaroides, Orconectes	0,381-0,457x0,381-0,447, dwuwarstwowa	0,524-0,866x0,209-0,295. RP - 0,06x0,08, stylilet

			kapsuła	0,09 -0,022, BP - 0,067x0,111. Gałęzie jelit wąskie przy bifurkacji rozszerzają się do tyłu
<i>P. pulmonalis</i>	Japonia, Tajwan, ChRL, Korea, ewentualnie Rosja (Południowe Przymorze)	Kraby Eriocher japonicus, raki Cambaroides similis	0,389-0,450 sferyczna, trójwarstwowa kapsuła	RP nieco większa niż BP. Ciało pokryte rzadkimi szczecinkami. Piony jelitowe lekko zwijają się
<i>P. skrjabini</i>	ChRL	Kraby Potamon denticulatus, P. yaanensis	0,427-0,436 sferyczna, trójwarstwowa kapsuła 0,010-0,014	0,453-1,138x0,188-0,533. Piony jelitowe kręte
<i>P. mexicanus</i>	Peru, Panama, Kostaryka, Gwatemala, Ekwador, Honduras, Salwador, Meksyk	Kraby r. Potamocarinis, Psendothelphysa, Ptychophalium	Nie incystuje się	
<i>P. uterobilateralis</i>	Kamerun, Liberia, Nigeria, Gwinea, Gabon	Kraby r. Liberonautes, Sudanonautes	Kapsuła jednowarstwowa	

* Warstwa zewnętrzna cienka (0,004 mm), silnie załamująca światło, warstwa środkowa posiada charakterystyczne pogrubienia przy przeciwległych biegunach.

4.3. Zróżnicowana diagnostyka larw nematod

4.3.1. Nematody, zarażenie którymi odbywa się przez produkcję rybą, należą do różnych grup systematycznych i są różnorodne pod względem budowy morfologicznej. Ogólne cechy systematyczne: wydłużony i wrzecionowaty kształt; obecność kutikuli; dobrze rozwinięty układ pokarmowy; oddzielne układy płciowe – nieparzysty u samców, parzysty u samic (w stadium larwalnym różnią się one głównie kształtem końcówki ogonowej); rozwój z 4 linieniami i 5 stadiami. Cykl życia przebiega z udziałem jednego lub dwóch żywicieli przejściowych, często także żywiciela paratenicznego, u których najczęściej odbywa się linienie stadium III i IV.

Wielkość larw, charakter uzbrojenia części głowowej, budowa układu pokarmowego wykorzystywane są w systematyce nematod dla diagnostyki zróżnicowanej (tab.4).

Tabela 4

Zróżnicowane cechy larw nematod rodz. *Diectophymidae*, *Gnathostomatidae*, *Anisakidae*, niebezpiecznych dla zdrowia człowieka

Rodzaj robaków	Rozprzestrzenienie geograficzne	Rodzaje zwierząt, wypełniających najczęściej rolę żywicieli przejściowych lub paratenicznych	Lokalizacja w ciele żywiciela przejściowego lub paratenicznego	Budowa i wymiary larw	Charakterystyka uzbrojenia głowowego i układu nerwowego	Osobliwości budowy układu pokarmowego i wydalniczego
1	2	3	4	5	6	7
<i>Diectophyme renale</i>	Dorzecza rzek Amu-Darii, Bachsz, Morze Aralskie	Ryby: łopatonos amurski, szczupak, boleń pospolity, jaź, ciosa, płoć, kielb turkietański, brzana aralska i szemaja aralska, piekielnica, sum, sumik karłowaty, gambusia, okoń Płazy: żaba jeziorna	U ryb: ścianka jelit i żołądka, różne organy i tkanki u żab: w ściance żołądka, w mięśniach brzucha, grzbietu i kończyn	Ciało nitkowate, ze zwężającym się końcem głowowym i tępo kończącym się tylnym, żółtawe lub blade różowe. Długość 6,9-8,0, szerokość 0,11-0,20 mm. U larw obu płci ogon symetryczny. W kapsułach z tkanki łącznej	Na zakończeniu głowowym 12 ssawek czuciowych, umieszczonych w 2 pierścieniach po 6 w każdym (zewnętrzne większe od tych samych w pierścieniu wewnętrznym). Pierścień nerwowy przesunięty w kierunku końca głowowego i oddalony od niego 0,05 mm	Otwór gębowy prowadzi do wąskiej kapsuły gębowej, przechodzącej w przewód pokarmowy z grubymi ściankami, długość którego wynosi 2,02-2,41, szerokość 0,18-0,19 mm. Przy przejściu przewodu pokarmowego w jelito umieszczona jest trójczęściowa zastawka. Jelito środkowe składa się z jednego rzędu komórek.
<i>Eustrongylides excisus</i>	Dorzecza Morza Kaspijskiego, Dunaju, Dniestru, Obi	Jesiotrowate (jesiotr, bieluga); śledź-czarnogrzbietka, szczupak, karpowate (boleń pospolity, leszcz, płoć kaspijska, wzdręga); sum, okoń	Jama ciała, mięsniotrawa, ścianki jamy brzusznej, rzadziej ścianki jelit, wątroba, nasieniowody	Ciało zwęża się z obu końców. Długość ciała 8-50, szerokość 0,11-0,19 mm. Koniec głowowy w postaci piramidy, ogonowy asymetryczny (u larw samców) i	Na końcu głowowym 2 pierścienie papill po 6 w każdym. Ssawki zewnętrznego pierścienia krótkie, z szeroką podstawą, w postaci wżgórków z tępych wierzchołkami.	Długość jamy gębowej 0,09, przewodu pokarmowego 2,46-4,53, jelita końcowego 0,13-0,56 mm. Zastawka przewodu pokarmowego słabo

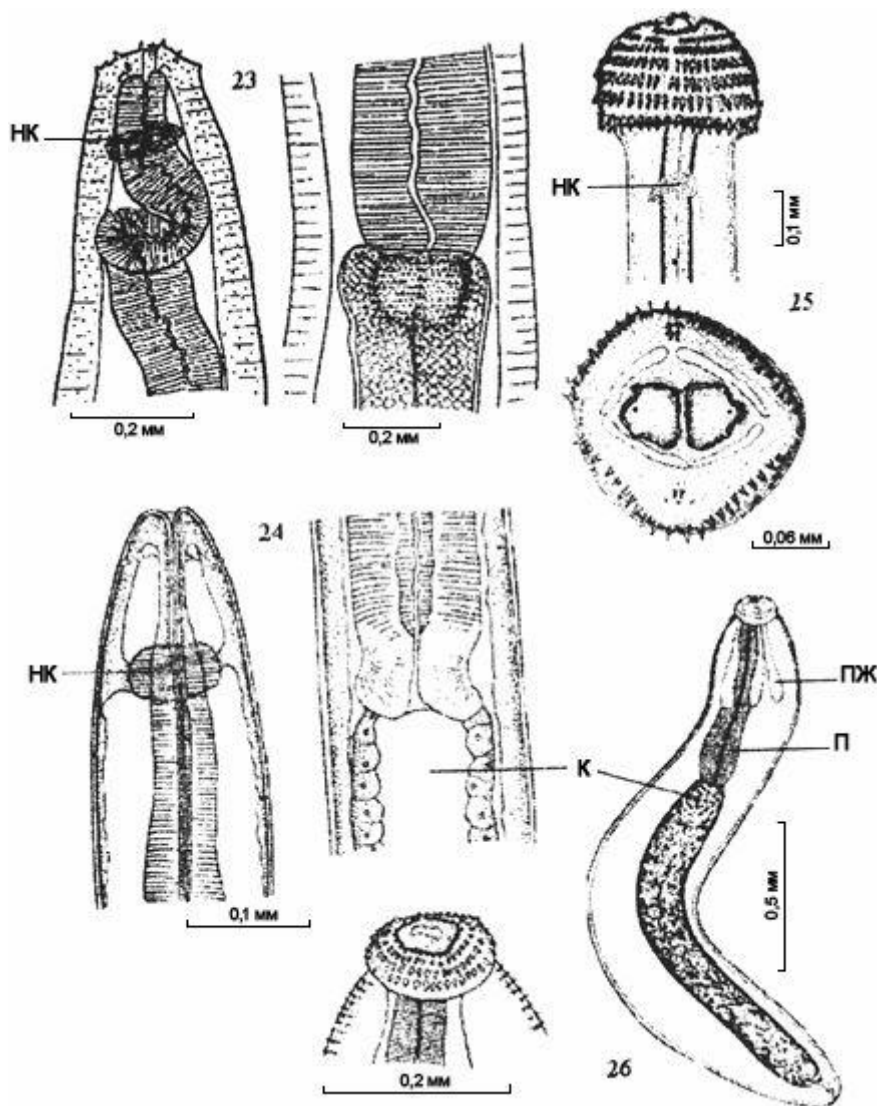
				symetryczny, zaokrąglony (u larw samic). W kapsułach lub swobodnie	Pierścień nerwowy w odległości 0,09-0,11 mm od końca głowowego	rozwinięta
<i>Echinocephalus sinensis</i>	Wody morskie tropikalne i subtropikalne (Hongkong, południowe Chiny, Cejlon, zachodnia Australia)	Mięczaki z muszlami dwuczęściowymi: ostryga zwyczajna i gigantyczna, pinctada, amusium Gady: Karetta (głowiasty żółw morski - karetta)	U mięczaków: w prześwicie gonoduktu z porażeniem epithelium z rzęskami u żółwi: w żołądku i jelitach	Larwy II stadium: samce - 6,470,8 mm; samice - 7,171,2 mm; III stadium: samce - 11,671,1 mm; samice - 11,270,8 mm. W kapsułach z tkanki łącznej	U larw II stadium stożkowy koniec głowowy z 6 rzędami szczecinek, III stadium - bulbus z 7 rzędami szczecinek (pierwszy z 6 małych). Pierścień nerwowy przybliżony do końca głowowego	Przewód pokarmowy składający się z odcinka mięśniowego i gruczołowego. W miejscu przejścia jednej części w drugą centralnie otwiera się otwór odbytniczy
<i>Gnathostoma hispidum</i>	Morze Aralskie; rzeki Amurdaria i Bachsz; dolny bieg i delta Wołgi; rz. Czerwona (Północny Wietnam)	Ryby: karpowate; sum, gambusia, okoń, sandacz Płazy: żaby Gady: żółwie słodkowodne Ryby: zmiogłowowate	Muskulatura, rzadziej jama ciała i organy wewnętrzne	Larwa III st., zwinięta w spiralę o średnicy 1 mm, w kapsule. Długość ciała 1,3-2,3, szerokość 0,40 mm. Kutikula przeźroczysta, wyraźnie zarysowana, uzbrojona w liczne rzędy drobnych szczecinek na całym ciele lub w jego przedniej połowie	Zaokrąglone wybrzuszenie głowowe uzbrojone jest w 4 rzędy szczecinek po 30-40 w każdym. Na jego przednim końcu trójczłonowe wargi, każda z trzema ssawkami. Pierścień nerwowy na granicy przejścia przewodu pokarmowego w jelito	Podział przewodu pokarmowego na część mięśniową i gruczołową słabo wyrazisty. Wzdłuż przewodu pokarmowego prawie do jego środka umieszczone są 4 gruczoły pokarmowe. Otwór wydalniczy oddalony od przedniego końca ciała na 0,15-0,20 mm
<i>G. spinigerum</i>	Zbiorniki słodkowodne Dalekiego Wschodu (Japonia, Tajlandia, Chiny, w FR – dorzecze Amuru)	Łososiowate; węgorz, bambuza, karp, misgurnus, sum amurski, okoń chiński; zmiogłowowate	"	Larwa III stadium zwinięta w spiralę o średnicy 1 mm. Ciało larwy pokryte poprzecznymi rzędami (ponad 200) prostych zaokrąglonych szczecinek o długości 0,01 mm	Wybrzuszenie głowowe uzbrojone w 4 rzędy szczecinek, których liczba w rzędzie zwiększa się w kierunku do tyłu (zwykle >40). Pierścień nerwowy na granicy przejścia przewodu pokarmowego w jelito	Przewód pokarmowy podzielony na dwa odcinki. 4 jednokomórkowe gruczoły pokarmowe wyraźnie zaznaczone. Otwór odbytowy przybliżony do końca głowowego

<i>Anisakis simplex</i>	Wody arktyczne; Ocean Spokojny i Atlantycki, zbiorniki słodkowodne Kamczatki, Sachalina, Japonii	Ryby: koleń pospolity, śledź, sałaka, gorbusza, keta, kiżucz, nerka, czawycza łosoś szlachetny, Salma trutta, Salvelinus, nelma, coregonus, stynka, gromadnik, srebrzyk, dorsz atlantycki, Micromesistius, sajka, wachnia, płamiak, merlang, czarniak, mintaj, miętus, Merluccius (hek), Marcourus, gard łosz atlantycki, sandacz morski, stawryda, kielec właściwy, zębacz, stek, snek, okoń morski, terpugi, gładzica i inne Mięczaki głowonogie: ośmiornice, kalmary, mątwy	U ryb – w jamie ciała, na błonie surowiczej organów wewnętrznych, pod nabłonkiem perytonealnym, w mięśniach (przeważnie ścianki brzuszej, a łososi z Oceanu Spokojnego - szkieletowych) w kapsułach lub swobodnie; u głowonogów – w płaszczu i na organach wewnętrznych	Larwy III stadium koloru jasno- kremowego lub białawego zwinięte w płaską spiralę wewnątrz przezroczystej kapsuły, rzadziej leżą swobodnie bez kapsuły. Długość 7- 33 mm. Szerokość ciała u dużych form stanowi 0,5-0,7 mm. Przez powłoki ciała dobrze widoczny komora	Na końcu głowowym trzy wykształcone wargi i dobrze rozwinięty kołec wiercący, umieszczony wentralnie w stosunku do otworu gębowego pomiędzy wargami laterowentralnymi. Pierścień nerwowy przesunięty w stosunku do przedniego końca	Komora o wydłużonym kształcie. Jego tylna część, stykająca się z jelitem, ścięta tak że strona centralna okazuje się dłuższa niż dorsalna. Brak jest wrostków żołądkowego i jelitowego. Otwór odbytniczy otwiera się na głowie pomiędzy wargami laterowentralnymi z dołu, tzn. na zewnątrz od granicy centralnego kolca wiercącego
<i>A. schupakovi</i>	Morze Kaspijskie, delta Wołgi	Jesiotr, szyp, sterlet, bieługa, siewruga, alosa, śledź azowski [Alosa brashnikovi brashnikovi], czarnogrzbietka, łosoś kaspijski, szczupak, płoc kaspijska, wyrozub, lin, wzdregą, alburnus, certa, ciosa, karp, boleń pospolity, brzana pospolita,	Powłoki śluzowe organów jamy brzuszej, u śledzia azowskiego spotyka się w mięśniach	Larwy III stadium, koloru żółtego, o długości 6,69-15,8, szerokości 0,12-0,40 mm. Kutikula z poprzecznym i podłużnym zarysowaniem	Na przednim końcu dobrze widoczny kołec larwowy i 4 ssawki, 2 z których umieszczone są dorsolateralnie [w kierunku boczno- górnym] i 2 subwentralnie. Pierścień nerwowy oddalony od przedniego końca ciała 0,16-0,29 mm	Przewód pokarmowy mięśniowy o długości 0,74-1,42 mm, maksymalna szerokość 0,05-0,09 mm. Komora wydłużona, 0,20- 0,46x0,06-0,18 mm. Proporcja długości ciała do długości przewodu pokarmowego 8,2- 11,8:1, długości ciała

		leszcz, sapa, ryciepa, sopa, ukleja, sum, okoń, sandacz, sandacz morski, bersz, byczek				do długości żołądka 23,7-27,6:1. Otwór odbytniczy otwiera się na końcu głowowym
<i>Pseudoterranova decipiens</i>	Północny Atlantyk i wody arktyczne, Północno-Zachodni Pacyfik, Antarktyda; zbiorniki słodkowodne Kamczatki, Sachalina	Ryby; rekin, płaszcza, śledź, golec zwyczajny, łososie z Oceanu Spokojnego, Thymallus, stynka, dorsz atlantycki, Micromesistius, molwa pospolita, wachnia, płamiak, brośma, ostrosz, nototenia, zębacz czarny i płamisty, lira kalion, snek (barakuda), bass małogębowy i karmazyn, terpuga, kur diabeł, skarp wielkogęby, flądra szkarłacia, Hippoglossiodes Dubiu, złocica europejska, niegładzica, zimnica, halibut czarny i niebieski, żabnica Mięczaki: kalmary	U ryb: BW muskulaturze swobodnie, bez kapsuł; w jamie ciała swobodnie lub pokryte kapsułami, przymocowane do powłok śluzowych organów wewnętrznych; u kalmarów: w płaszczu i w organach wewnętrznych	Larwy III stadium 14,0-33,0 mm długości, zabarwione na brązowo lub czerwono	Koniec głowowy ma 3 dość wyraźne wargi i niewielki kołec wiercący, umieszczony pomiędzy wargami laterowentralnymi. Pierścień nerwowy oddalony od przedniego końca ciała 0,25-0,31 mm	Wydłużony przewód pokarmowy przechodzi w okrągły, owalny lub czterokątny żołądek. Wyrostek żołądkowy nieobecny. Dystalny koniec wyrostka jelitowego przymocowany do ścianki ciała wiązką mięśni. Otwór odbytniczy na końcu głowowym pomiędzy wargami laterowentralnymi na dole
<i>Contracaecum osculatum</i>	Wody arktyczne, ocean Atlantycki (Morze Bałtyckie); jezioro Bajkał z odcinkami przed ujściem rzek; zbiorniki wodne	Ryby; śledź, lenok, łososie Oceanu Spokojnego, łosoś szlachetny, omul, Thymallus zwyczajny i bajkałski, stynka, dorsz atlantycki,	Na błonie śluzowej organów wewnętrznych (wątroba, przydatki piloryczne, mezenterium).	Larwy z gęstą kutikulą, 13-28 mm długości i 0,41-0,52 mm szerokości. Mogą być w kapsułach lub bez nich	Zalążki warg na końcu głowowym wyraźne. Kołec larwowy umieszczony pomiędzy zalążkami warg laterowentralnych,	Przewód pokarmowy cylindryczny, z małym żołądkiem. Istnieją wyrostki jelitowy i żołądkowy, skierowane w przeciwną stronę.

	Kamczatki Sachalina	miętus, witlinek, molwa pospolita, głowacz dwuskrzydły i żółtoskrzydły, okoń morski, kur diabeł, kur rogacz; głowacz przegopłety, głowacz Kesslera, głowacz płaski, głowacz tłusty; gołomianka, flądra Hippolossoides dubius, gładzica, zimnica, czarny halibut Mięczaki: kalmary			jeszcze nierozdzielonych przegrodą. Pierścień nerwowy 0,37-0,42 mm od przedniego końca ciała	Wyrostek jelitowy zwykle jest dłuższy od połowy przewodu pokarmowego. Otwór odbytniczy otwiera się z wentralnej strony głowowego końca przy podstawie warg subventralnych
<i>Sulcascaris sulcata</i>	Kosmopolit: ciepłe i umiarkowane wody Wszechocanu, włącznie z Morzem Czerwonym, Morzem Śródziemnym i Karaibskim; Południowym, Środkowym i Zachodnim Oceanem Atlantyckim; Zach. Pacyfikiem (Australia, Cejlon)	Jadalne mięczaki z dwuczęściową muszlą: ostrygi, Spondylus multimuricatus, pinctada, przyszynka szlachetna, almeja [Spisula], Mactra chinensis; przegrzebki morskie (pecten, agropecten, chlamys, amusium) żółwie morskie: żółw (zielony lub zielony żółw morski), Karetta (głowiasty żółw morski - Karetta)	W almejach [Spisula] – we wszystkich tkankach: w organach wewnętrznych - w 60%, w nodze – w 27%, w adduktorze - w 12%, w płaszczu - w 1%; w przegrzebkach – w mięśniu-adduktorze i gonadach; u żółwi – w żołądku i jelitach, przymocowane do ścianki	W mięczakach - larwy IV stadium (8,3-45 mm długości), rzadko III stadium (4,2-4,3 mm); w żółwiach - IV stadium (19-33 mm) i dorosłe. Larwy mogą być w kapsułach z tkanki łącznej. Drobne larwy - białe i mało zauważalne, większe koloru od żółtego do jasno-pomarańczowego lub brązowego. W przypadku ich porażenia gaplosporidiami (hiperparazytoza) stają się one ciemnobrązowe, prawie czarne	Koniec głowowy larwy IV stadium niesie trzy uformowane wargi, krawędzie których charakteryzują się rzadkim zachodzeniem na siebie. Pomiedzy głównymi wargami umieszczone są w interlabii. Pierścień nerwowy odstaje od przedniego końca ciała larwy na odległość 0,25-0,67 mm	Przewód pokarmowy 1,3-4,0 mm długości przy szerokości 0,08-0,23 mm. Komora wydłużonego kształtu. Istnieje krótki wyrostek jelitowy. Otwór wydalniczy otwiera się na głowowym końcu przy podstawie wentralnej interlabii

4.3.2. Do rodz. *Diectophymidae* należą nematody z prostym końcem głowowym (bez przyrostka mięśniowego). Kutikula porysowana poprzecznie. *Diectophyme renale* – w stanie dorosłym pasożyty dzikich i domowych zwierząt, rzadko człowieka. Żywiciele pośredni – skąposzczety (oligoachety), rolę żywicieli paratenicznych pełnią płazy i ryby, w których rozwój jest wstrzymany – larwy w III stadium (rys. 24). Zauważono przypadki zarażenia człowieka diektofimidami *Eustrongylides excisus*. Zwykle są to pasożyty żołądka ptaków wodnych. W rybach, grających rolę drugiego żywiciela pośredniego lub żywiciela dodatkowego, spotykane są w III i IV stadium rozwoju. U ryb rodziny jesiotrowatych w określonych warunkach *Eustrongylides excisus* mogą rozwijać się do stadium zdolności płciowej. W tym przypadku nie stanowią one niebezpieczeństwa dla człowieka.



Rys.23-26. 23 - *Eustrongylides excisus*, larwa (koniec głowowy i odcinek przejścia przewodu pokarmowego i jelita); 24 - *Diectophyme renale*, larwa III (przedni koniec i okolica granicy przewodu pokarmowego i jelit); 25 - *Echinocephalus sinensis*, larwa III (przedni koniec – widok z boku i z góry); 26 - *Głathostoma hispidum*, larwa III (koniec głowowy i widok ogólny). HK – pierścień nerwowy; П – przewód pokarmowy; ПЖ – gruczoł pokarmowy; К - jelita.

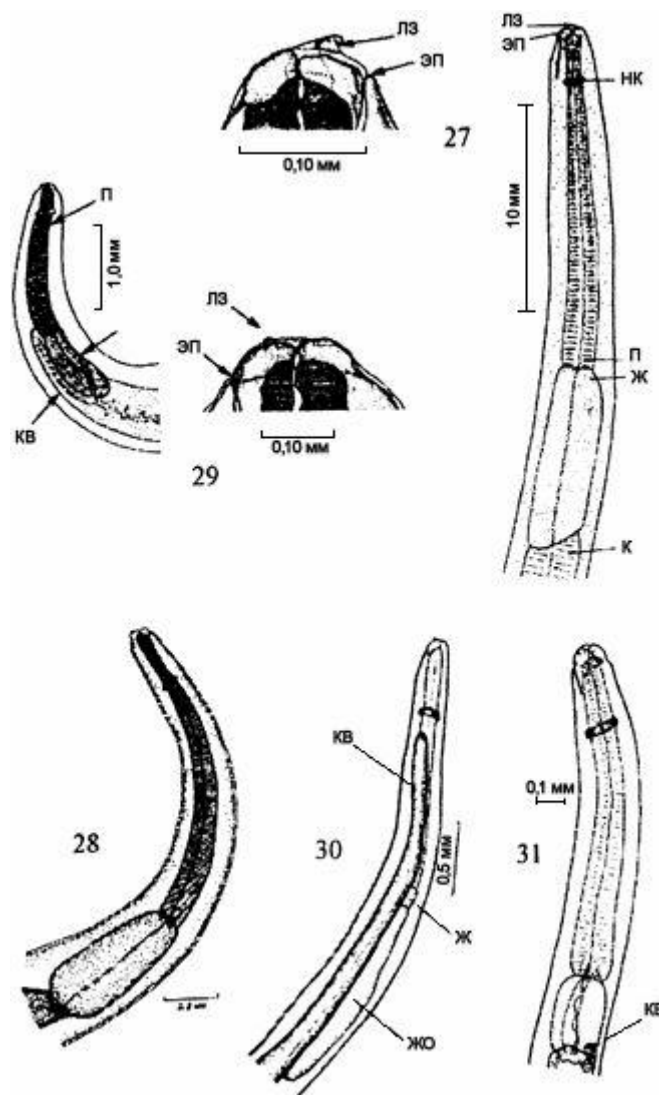
4.3.3. Do rodz. *Gnathostomatidae* należą nematody z 4-6 jednokomórkowymi gruczołami pokarmowymi. Przewód pokarmowy składa się z odcinka mięśniowego i gruczołowego. Wargi (pseudolabie) duże trójkątne lub kopułowe.

Larwy *Echinocephalus sinensis* (rys.25) i *Echinocephalus sp.* stwarzają potencjalne zagrożenie dla zdrowia człowieka. W doświadczeniu zarażane są kocięta i makaki-rezusy: larwy III stadium przenikają przez ścianki żołądka, jelita grubego i cienkiego. Zarażenie człowieka jest możliwe przy spożywaniu jako posiłek surowych (lub nieprzegotowanych) jadalnych mięczaków morskich. Nie można wykluczyć jako czynnika

zarażenia także żółwi morskich, w jelitach i żołądku których spotykane są larwy IV stadium. Obligatoryjnymi żywicielami ostatecznymi są morskie płaszczki.

Przedstawiciele rodz. *Gnathostomatidae* pasożytują u człowieka, ale nie rozwijają się do stadium dojrzałości płciowej. Żywicielami ostatecznymi są kot, pies, świnia, rzadziej krowa. Żywicielami paratenicznymi są płazy, gady, ryby. Żywe larwy *Gnathostoma hispidum* (rys.26) i *Gnathostoma spinigerum* zawierają krwisto-czerwoną ciecz w jamie ciała.

4.3.4. Najbardziej rozprzestrzenionymi pasożytami prawie wszystkich gatunków ryb morskich, przejściowych, półprzejściowych, a także niektórych ryb słodkowodnych, ekologicznie związanych ze strefami mórz z wodą słodką [zmniejszonym zasoleniem], są larwy rodz. *Anisakidae* III stadium (rys.27-31). Cienkie larwy z bardziej lub mniej wyrażonymi wargami wokół otworu gębowego i kołcem wiercącym. Kutikula gładka, z delikatnymi pierścieniowymi rysunkami. Jama gębowa (stoma) i przełyk słabo wyrażone, a przewód pokarmowy – dobrze. Dla diagnostyki larw *Anisakis* w charakterze zróżnicowanych oznak należy wykorzystać strukturę przedniego odcinka przewodu pokarmowego, wielkość proporcji długości ciała do długości przewodu pokarmowego, długości ciała do długości żołądka, a także położenie otworu odbytowego.



Rys.27-31. 27 - *Anisakis simplex*, larwa III (koniec głowowy i widok ogólny); 28 - *F. schupakovi*, larwa III; 29 - *Pseudoterranova decipiens*, larwa III (widok ogólny i koniec głowowy); 30 - *Contraecum osculatum*, larwa III; 31 - *Sulcascaris sulcata*, larwa III. ЛЗ – kołec larwowy; ЭП – otwór odbytowy; НК – pierścień nerwowy; П – przewód pokarmowy; Ж – komora; ЖО – wyrostek komory; К – jelita; KB – wyrostek jelitowy.

Brak jest specyfiki żywicielskiej (gostalnej) do II przejściowych żywicieli lub jest ona słabo zarysowana. Są nimi zwykle drobne ryby, a paratenicznymi – duże ryby i mięczaki głowonogi (kalmary, ośmiornice i

mątwy), w których gromadzą się larwy 3-go stadium. Ostatnie linienie odbywa się u kręgowców – ostatecznych żywicieli (płetwonogich i walen).

U jadalnych mięczaków morskich w muszlami dwuczęściowymi i żółwi morskich spotykane są larwy *Sulcascaris sulcata* (rys.31). W chwili obecnej ta nematoda nierozpatrywana jest jako stanowiąca zagrożenie dla zdrowia człowieka. Jednak obecność u niej hiperpasożytów (*Urosporidium spisuli*) praktycznie w 100% przypadków i to, że ostrygi i przegrzebki jedzone są zarówno gotowane, jak i surowe, wymaga wybrakowania mięczaków z nematodami z powodów estetycznych (psuje się wygląd towarowy). Problem anizakidoz człowieka jest szczególnie istotny dla Japonii, Korei, USA, Wielkiej Brytanii, Francji, Holandii, państw Skandynawii, przybrzeżnych rejonów Rosji (wybrzeże Oceanu Spokojnego, wybrzeże mórz północnych, Morza Bałtyckiego i Kaspijskiego), gdzie jako pożywienie spożywane są surowe lub słabo obrabione kulinaria, tzn. nieunieszkodliwione ryby morskie. Diagnostyka zachorowania u człowieka jest utrudniona ponieważ pasożyt nie rozwija się do dojrzałości płciowej. W związku z tym niezbędna jest dokładna ekspertyza parazytologiczna ryb morskich.

4.4. Zróżnicowana diagnostyka larw kolecogłowych

Możliwe jest zarażenie człowieka kolecogłowami, należącymi do rodz. *Polymorphidae* (*r. Corynosoma* i *r. Bolbosoma*). W dorosłym stadium pasożytują one w jelitach ssaków morskich i ptaków rybożernych. Ryby mogą być zarówno żywicielem paratenicznym, jak i żywicielem ostatecznym u różnych gatunków kolecogłowach. W żywicielu paratenicznym, jak i ostatecznym larwa migruje z jelit do jamy ciała, następnie do innych organów i mięśni, gdzie incystuje się i pozostaje w stadium larwy – akantelli. Dla larwy (jak i dla dorosłych) kolecogłowach charakterystyczna jest obecność na przednim końcu trąbki, uzbrojonej w zagięte do tyłu haczyki. U larwy, znajdującej się w rybie, trąbka zwykle jest wywrócona do środka i wywraca się na zewnątrz przy umieszczeniu jej w wodzie lub przy trafianiu w żywiciela ostatecznego. Akantelle lokalizują się u ryb w jamie ciała, organach wewnętrznych i tkankach (krezka jelita cienkiego, gonady, wątroba, nerki, powłoki śluzowe surowicze żołądka i jelit, mięśnie). Larwy znajdują się w przeźroczystych kapsułkach.

4.4.1. *R. Corynosoma*. Gatunki tej rodziny rozpowszechnione są w różnych rejonach Wszechocanu, we wszystkich morzach, omywających Rosję, a także w Morzu Kaspijskim i Jeziorze Ładoga, rzekach, wpadających do nich.

Innym żywicielem przejściowym są różnorodne ryby morskie, przechodzące, a także ryby słodkowodne, zamieszkujące dolne biegi rzek i niektóre kontynentalne zbiorniki wodne (łososiowate, stynkowate, śledziowate, dorszowate, morszczukowate, nototeniiowate, białokrwiste, terpurowate, flądrowate) i minogi. Zwyczajnymi są także akantelle *r. Corynosoma* dla jesiotrowatych Morza Kaspijskiego.

Najczęściej zarażone są ryby przydenne.

Rozmiar kapsuł z larwami 2-4 mm. Ciało larwy ma kształt gruszkowy, jest rozszerzone w przedniej części, ma długość do 10 mm. Powierzchnia przedniej części larwy pokryta jest szczecinkami: większymi, rozmieszczonymi w formie szachownicy – w pierwszej trzeciej części ciała i drobniejszymi, rozmieszczonymi chaotycznie, - w pozostałej części. Trąbka jest prawie cylindryczna, lekko rozszerzająca się w środku. U *C. strumosum* (rys.6) na trąbce jest 18 podłużnych rzędów haczyków po 10-12 w każdym rzędzie. Ciało ma długość 3,5-9 mm, szerokość do 1,5 mm. U *C. semerse* na trąbce jest 22-24 podłużnych rzędów haczyków, długość larwy do 5 mm.

Formy dojrzałe płciowo – pasożyty jelitowe morskich ssaków i ptaków rybożernych.

4.4.2. *R. Bolbosoma*. Akantelle bolbosom spotykane są w jamie ciała i na organach wewnętrznych u ryb makrełowatych w Północnym Atlantyku; morszczukowatych, pałaszowatych w Południowym Atlantyku; u lososiowatych, skorpenowatych, beryksowatych, gempylowatych i makrełowatych w Oceanie Spokojnym.

U *B. caeniforme* ciało larwy jest zwykle cylindryczne, ale w przedniej części tworzy rozszerzenie bulbusowe, którego przednia część uzbrojona jest w szczecinki. Akantelle o wymiarach 7-12x0,9-1,2 mm. Żywe larwy mają kolor różowo-czerwonawy. Na cylindrycznej trąbce jest 18 podłużnych rzędów haczyków po 6 w każdym rzędzie.

Dojrzałe płciowo formy lokalizują się w jelitach ssaków morskich.

5. Metody ustalania zdolności życiowej robaków

Przy wykryciu larw w produkcji rybnej, w tym przy ocenie efektywności jej odkażania, należy określić ich zdolność życiową.

5.1. Według oznak morfologicznych i zdolności życiowej

Niezbędne odczynniki i wyposażenie:

1. Odczynniki chemiczne: roztwór fizjologiczny
2. Szkiełka przedmiotowe
3. Szkiełka nakrywkowe
4. Naczynia Petriego
5. Szkiełka zegarkowe
6. Kolba (0,1-0,2 l)
7. Probówki
8. Pincety do brwi
9. Lampa spirytusowa
10. Termometr spirytusowy do wody
11. Igły preparacyjne o różnej grubości
12. Mikroskop binokularowy typu MBS
13. Lupa
14. Oświetlacz dla binokularu dowolnej marki
15. Mikroskop świetlny typu Biolam, Bimam
16. Oświetlacz do mikroskopu dowolnej marki

5.1.1. Larwy cestod, nematod i kolcogłowach umieszcza się w naczyniu Petriego lub na szkiełku zegarkowym z podgrzanym roztworem fizjologicznym (37-40°C) i obserwuje się pod lupą binokularową (mikroskopem typu MBS) przy powiększeniu, odpowiednim dla rozmiaru larwy lub jej obserwowanej części. Incystowane larwy wyjmowane są z otoczek. Żywe larwy mogą nie przejawiać oznak aktywności. Ich ruchy można stymulować przy pomocy podrażniania fizycznego, klucia larwy ostrą igłą preparacyjną. U żywej larwy uklucia powodują skurcze ciała. Larwy anizakid (w roztworze fizjologicznym) umieszczane są na 2 godz. do termostatu z $t=37^{\circ}\text{C}$. Zmiana koloru, odwarstwienie powłok, inne zmiany destrukcyjne ciała wskazują na brak zdolności życiowej larw. Jeśli nie ma widocznych zmian, ale nie udaje się także wykryć oznak życia to stosowana jest metoda oddziaływania chemicznego (ppkt.5.3.2).

5.1.2. Metacerkaria trematod, wyodrębnionych z tkanek ryb (lub skorupiaków) przy pomocy igły preparacyjnej, umieszczane są w kropli ciepłej wody lub roztworu fizjologicznego (37-40°C) na szkiełku przedmiotowym, nakrywane są szkiełkiem nakrywkowym i badane pod małym i dużym powiększeniem mikroskopu. Jawne naruszenie całości otoczek cyst, poważne zmiany budowy wewnętrznej larwy, rozkład jej zawartości, zniszczenie pęcherza wydalniczego są oznakami zgnięcia metacerkarium.

Metacerkaria posiadają zdolność wykonywania ruchów, będąc w cyście. Obecność nawet najsłabszych samodzielnych ruchów larwy świadczy o jej zdolności życiowej. Brak ruchu nie świadczy jeszcze o zgnięciu. Ruchy można stymulować słabym przyciskaniem metacerkarium szkiełkiem nakrywkowym.

5.2. Metoda stymulowania elektrycznego (с использованием постоянного электрического тока)

Niezbędne odczynniki i wyposażenie:

1. Odczynniki chemiczne: roztwór fizjologiczny lub woda
2. Duże szkiełka przedmiotowe (6-8x12-15 mm, o grubości 2-4 mm)
3. Naczynia Petriego
4. Pincety do brwi
5. Igły preparacyjne różnej grubości
6. Źródło prądu stałego (bateria z napięciem 1,5 V)
7. Cienki drut
8. Papier filtracyjny
9. Mikroskop binokularowy typu MBS
10. Lupa
11. Oświetlacz dla binokularu dowolnej marki

5.2.1. Stosowana tylko dla larw nematod, cestod i kolcogłowych. Larwy umieszczane są na mokrym papierze filtracyjnym i oddziałuje się na nie stałym prądem elektrycznym (0,5-1,5 V), przepuszczanym przez larwę. W tym celu dwa cienkie izolowane przewody od bieguna dodatniego i ujemnego elementu (źródła prądu stałego) doprowadzane są do dwóch igieł preparacyjnych. Przejawy ruchów skurczowych kontrolowane są pod mikroskopem typu MBS.

5.3. Metoda oddziaływania chemicznego (z wykorzystaniem chemicznych substancji rozdrażniających)

Niezbędne odczynniki i wyposażenie:

1. Odczynniki Chemiczne: roztwór fizjologiczny, treść duodenalna, uzyskana przy sondowaniu człowieka, lub żółć zwierzęca (apteczna), trypsyna (0,5%-y roztwór, przygotowany na roztworze fizjologicznym: 0,5 g trypsyny rozpuszcza się w 100 ml roztworu fizjologicznego)

2. Szkiełka przedmiotowe
3. Szkiełka nakrywkowe
4. Naczynia Petriego
5. Szkiełka zegarkowe
6. Igły preparacyjne o różnej grubości
7. Lampa spirytusowa
8. Kolba (0,1-0,2 l)
9. Probówki
10. Pincety do brwi
11. Termometr spirytusowy do wody
12. Mikroskop binokularowy typu MBS
13. Lupa
14. Oświetlacz dla binokularu dowolnej marki
15. Mikroskop świetlny typu Biolam, Bimam
16. Oświetlacz do mikroskopu dowolnej marki
17. Termostat

5.3.1. Ruch larw można wywoływać, oddziałując treścią duodenalną, uzyskaną przy sondowaniu człowieka, lub żółcią zwierząt, lub trypsyną. Metoda stosowana jest głównie dla określenia zdolności życiowej metacerkariów trematod.

Na wyodrębnione metacerkaria nanoszonych jest kilka kropli odczynnika chemicznego tak, aby całkowicie pokryć larwy. Dla przyspieszenia ekscytowania szkiełko przedmiotowe (zegarkowe) z larwami można lekko podgrzać nad płomieniem lampy spirytusowej lub dodać wcześniej podgrzaną 37-40°C trypsynę (lub żółć), albo postawić do termostatu o temperaturze 37°C na 10 min. Za kilka sekund pod oddziaływaniem chemicznej substancji rozdrażniającej zaczyna się wychodzenie larw z cyst i ich aktywne poruszanie się, co jest wskaźnikiem zdolności życiowej. Proces ekscytowania larw kontrolowany jest pod mikroskopem typu MBS.

Brak w ciągu 30 min jakiegokolwiek reakcji ruchowej świadczy o zginieciu larw.

5.3.2. Dla określenia zdolności życiowej larw nematod z ryb (mięczaków), poddawanych wcześniej zamrażaniu lub wędzeniu na zimno, robaki inkubowane są w termostacie w $t=37^{\circ}\text{C}$ w roztworze fizjologicznym lub w 0,5%-ym roztworze trypsyny. Larwy inkubowane są przez trzy dni, codziennie sprawdzając zdolności życiowe.

5.3.3. Dla określenia zdolności życiowych larw robaków można wykorzystać metodę przygotowywania produkcji rybnej w sztucznym soku żołądkowym (pkt.3.2.11.4).

5.4. Metoda fluorescencji (z wykorzystaniem światła ultrafioletowego)

Niezbędne odczynniki i wyposażenie:

1. Lampa luminescencyjna
2. Stół z przezroczystą pokrywą górną (o wymiarach ni mniej niż 40x40 cm)
3. Okulary ochronne (niebieskie)
4. Duże szkiełka przedmiotowe (6-8x12-15 cm, o grubości 2-4 mm)
5. Skalpel
6. Pincety (chirurgiczne i do brwi)
7. Igły preparacyjne o różnej grubości

5.4.1. Metoda oparta jest na zdolności żywych i martwych tkanek wielu zwierząt do fluorescencji pod wpływem światła ultrafioletowego. Metoda stosowana jest głównie dla larw nematod.

5.4.2. Kawałki mięśni ryb (lub kalmarów) lub filety o grubości nie więcej niż 2 cm naświetlane są promieniami ultrafioletowymi na początku z jednej, a później z drugiej strony. Przy obserwowaniu badacz powinien korzystać z okularów ochronnych (niebieskich). Szczególną fluorescencję przejawiają martwe robaki w produktach rybnych, poddawanych zamrażaniu. Charakter świecenia jest niejednakowy u różnych gatunków: larwy *Anisakis* mają fluorescencję błękitnawo-białą (błądą u żywych i ostrą u martwych); larwy r. *Contracaecum* – od bladej (u żywych) do ostrej żółtej (u martwych).

5.5. Metoda zabarwiania (z wykorzystaniem barwników)

Niezbędne odczynniki i wyposażenie:

1. Odczynniki chemiczne: roztwór fizjologiczny; r-r błękitu metylenowego (błękit metylenowy - 0,05 g, soda żrąca - 0,5 g, kwas mlekowy - 15 ml); czerwień obojętna (Neutralrot) w rozcieńczeniu 1:1000 (0,1 g czerwieni obojętnej rozpuszcza się w 100 ml wody destylowanej); 0,3%-y r-r kwasu rozolowego (auryna) (0,3 g kwasu rozolowego rozpuszcza się w 100 ml 70° spirytusie); KOH (0,1 N roztwór)

2. Szkiełka przedmiotowe
3. Szkiełka nakrywkowe
4. Naczynia Petriego
5. Szkiełka zegarkowe
6. Pincety do brwi
7. Igły preparacyjne różnej grubości
8. Papier filtracyjny
9. Mikroskop binokularowy MBS
10. Lupa
11. Oświetlacz dla binokularu dowolnej marki
12. Mikroskop świetlny typu Biolam, Bimam
13. Oświetlacz do mikroskopu dowolnej marki

5.5.1. W zależności od wykorzystywanego barwnika zabarwiane są albo żywe, albo martwe robaki.

5.5.2. Larwy nematod, cestod i kolcogłowach umieszczane są w naczyniu Petriego (lub na szkiełku zegarkowym) z roztworem błękitu metylenowego. Martwe larwy zabarwiają się na kolor niebieski. Dobrze zabarwiają się włókna nerwowe i jądra komórek.

5.5.3. Żywe plerocerkoidy zabarwiane są wodnym roztworem Neutral-rot w ciągu 5-20 min, nabierając stałego zabarwienia różowego. Dla kontroli larwy wyjmowane są z barwnika, umieszczane w czystym roztworze fizjologicznym i w nim badany jest stopień zabarwienia. Martwe larwy nie nabierają stałego zabarwienia.

5.5.4. Dla określenia zdolności życiowej metacerkariów trematod wykorzystywane jest zabarwianie roztworem kwasu rozolowego (auryny).

- Kawalki mięśni z larwami oczyszczane są z tłuszczu. Na tkankę nanoszone są 2 krople kwasu rozolowego, a po 2 min - 0,1 N roztwór *KOH*, równomiernie rozdzielając go po tkance. Nadmiar płynu z preparatu usuwany jest papierem filtracyjnym. Nakrywane są szkiełkiem nakrywkowym i badane pod mikroskopem.

- Tkanka ryby zabarwia się na kolor różowy, żywe larwy nie zabarwiają się wcale, a martwe stają się różowe.

5.6. Metoda próby biologicznej

Niezbędne odczynniki i wyposażenie:

1. Odczynniki chemiczne: roztwór fizjologiczny
2. Zwierzęta laboratoryjne (chomiki złociste, białe myszy i szczury)
3. Szkiełka przedmiotowe
4. Szkiełka nakrywkowe
5. Duże szkiełka przedmiotowe (6-8x12-15 cm, grubości 2-4 mm)
6. Strzykawki 2 ml z rurkami
7. Skalpele
8. Naczynia Petriego
9. Szkiełka zegarkowe
10. Pincety różnych rozmiarów (chirurgiczne, anatomiczne)
11. Skalpele różnych rozmiarów
12. Korcangi
13. Nożyce różnych rozmiarów
14. Igły preparacyjne o różnej grubości
15. Mikroskop binokularowy typu MBS
16. Lupa
17. Oświetlacz dla binokularu dowolnej marki
18. Mikroskop świetlny typu Biolam, Bimam
19. Oświetlacz do mikroskopu dowolnej marki

5.6.1. W niektórych przypadkach dla ostatecznego wniosku o gatunku robaków, zdolności życiowej i inwazyjności larw konieczna jest próbka biologiczna – zarażenie zwierząt laboratoryjnych. Metoda oparta jest na zdolności większości gatunków robaków, pasożytujących u człowieka, do osiedlania się na innych ssakach. Najwygodniejszym zwierzęciem laboratoryjnym do tego celu jest chomik złocisty. W niektórych przypadkach należy wykorzystywać inne zwierzęta (kocięta, białe myszy, szczury).

5.6.2. Kawałki organów wewnętrznych lub mięśni żywicieli dodatkowych (lub paratenicznych) z larwami podawane są jako karma zwierzętom laboratoryjnym. Po czasie, określonym dla każdego gatunku robaków (patrz niżej) w fekaljach zwierzęcia odkrywane są jaja pasożyta. Następnie zwierzę jest usypiane (uśmiercane) i otwierane [sekcja] metodą niepełnego otwarcia parazytologicznego. Wykryte robaki określone są pod względem gatunku.

5.6.3. *Cestody*.

5.6.3.1. Dla dyfilobothrid w charakterze zwierząt laboratoryjnych można wykorzystywać chomiki złociste, które karmione są po 5-10 plerocerkoidami.

5.6.3.2. Jaja cestod mogą być wykryte w fekaljach zwierzęcia laboratoryjnego po 2-3 tygodniach dla *Diphyllbothrium latum* i *Diphyllbothrium luxi* (*D. klebanovskii*), po 1-2 tygodniach dla *Diphyllbothrium dendriticum*. Przy zarażeniu chomików złocistych sparganumami *Spirometra erinaceieuropaei* pozostają one w stadium larwalnym i nie wyodrębnia się jaj.

5.6.3.3. Przy sekcji zwierząt dojrzałe płciowo wieloczlone r. *Diphyllbothrium* mogą być wykryte w jelicie cienkim, sparganumy spirometry w jamie ciała, organach wewnętrznych, podskórnej błonie komórkowej, mięśniach. Dla uzyskania spirometry ze zdolnością płciową można zarażać psa lub kota. W tym przypadku jaja robaka można wykryć po 12-15 dniach u psów i po 10-14 – u kotów.

5.6.4. *Trematody*.

5.6.4.1. *Opisthorchis felinus*, *Metorchis bilis*, *Clonorchis sinensis*, *Nanophyetus salmincola* osiedlają się u chomików złocistych. W wątpliwych przypadkach zróżnicowanej diagnostyki pomiędzy *Opisthorchis felinus* i *Pseudamphistomum truncatum* zarażane są małe kocięta, ponieważ *Pseudamphistomum truncatum* nie osiedla się u chomików. *Metagonimus yokogawai*, *Metagonimus katsuradai*, *Rossicotrema donicum*, *Apophallus muehlingi* rozwijają się także tylko u kociąt i szczeniąt psa domowego. Dla zarażenia czynnikami wywołującymi paragonimozę najczęściej wykorzystywane są myszy i szczury laboratoryjne.

5.6.4.2. Istnieją dwa podstawowe sposoby zarażenia zwierząt metacerkariami.

- Pierwszy – zarażenie larwami, zawartymi w tkance mięśniowej ryb (lub skorupiaków). W tym celu ryba badana jest w sposób kompresorowy (ppkt.4.2.11.3), obserwuje się lokalizację cyst i patrząc w mikroskop MBS (powiększenie: okular 8x, obiektyw 2x), górne szkiełko ostrożnie przesuwane jest na bok i igłami preparacyjnymi wybierane są kawałki tkanki z meta cerkariami (starając się nie uszkodzić ich). W taki sposób, nabiera się po 30 larw i karmi się nimi zwierzęta doświadczalne (chomiki złociste o masie 70-90 g, białe myszy o masie 18-25 g).

- Drugi sposób polega na wprowadzeniu przez pysk larw, uzyskanych w rezultacie gotowania ryb (lub skorupiaków) w sztucznym soku żołądkowym (patrz ppkt. 3.2.11.4). Metacerkaria obmywane są w roztworze fizjologicznym, zliczane i wprowadzane do żołądka przy pomocy strzykawki ze specjalną rurką. Opistorchidy wprowadzane są w ilości 50 larw na jedną sztukę, a paragonimidy – w ilości 20 egzemplarzy na sztukę.

5.6.4.3. Wydzielenie jaj *Opisthorchis felinus*, *Pseudamphistomum truncatum*, *Metorchis bilis*, *Clonorchis sinensis* rozpoczyna się po 20-25 dobach po zarażeniu. Przy sekcji zwierząt po 3-5 tygodniach po zarażeniu zdolne płciowo trematody odkrywa się w drogach żółciowych wątroby, pęcherzyku żółciowym i śledzionie.

5.6.4.4. Wydzielenie jaj *Metagonimus yokogawai*, *Metagonimus katsuradai*, *Nanophyetus salmincola*, *Rossicotrema donicum*, *Apophallus muehlingi* rozpoczyna się w 11-16 dobie po zarażeniu. Przy sekcji zwierząt robaki odkrywane są w jelicie cienkim.

5.6.4.5. Sekcja zwierząt po zarażeniu meta cerkariami paragonimid prowadzona jest po 40-60 dniach. W pierwszej kolejności badane są płuca. Następnie kolejno badane są wszystkie organy i tkanki, w których mogą być wykryte larwy, w przypadku rozwoju paragonimozы larwalnej lub paragonimozы z atypową lokalizacją.

5.6.5. *Nematody*. Zwierzęta laboratoryjne (najlepiej kocięta i szczenięta) karmione są (lub wprowadza im się przy pomocy pincety) kawałki ryby z larwami w ilości 20-25 egzemplarzy. Po 3-6 dniach zwierzęta są zabijane i wykonywane jest badanie parazytologiczne żołądka i jelit.

6. Metody stabilizacji i przechowywania pasożytów

Niezbędne odczynniki i wyposażenie:

1. Odczynniki chemiczne: etanol 96° (dla uzyskania alkoholu 70° do 100 ml spirytusu 96° dodać 37 ml wody, a dla 80° - 20 ml wody); formalina (40% procentowy roztwór formaldehydu); roztwór fizjologiczny lub roztwór Ringera (chlorek sodu - 0,65 g, chlorek wapnia - 0,025 g, węglan sodu - 0,02 g, dwuchlorek wapnia -

0,03 g, woda bidestylowana - 100 ml. Sole rozpuszczane są w ustalonym porządku. Nie należy gotować); woda destylowana

2. Szkiełka przedmiotowe
3. Duże szkiełka przedmiotowe (6-8x12-15 cm, o grubości 2-4 mm)
4. Naczynia Petriego
5. Probówki
6. Waga z zestawem odważników lub waga elektroniczna
7. Szpatułki (łopatki) metalowe, szklane, drewniane
8. Lejki szklane różnych rozmiarów
9. Cylindry miarowe (0,5-0,25 l)
10. Słoiki szklane z dopasowanym korkiem do przechowywania odczynników (0,1, 0,25, 0,5 l)
11. Słoiki szklane (lub kolby) dla wody destylowanej (1-2 l)
12. Zestaw szklanych pipetek miarowych (od 1 do 10 ml)
13. Pipetki szklane (pasteurowskie)
14. Gruszki gumowe
15. Boksy różnych rozmiarów
16. Pęcherzyki penicylinowe
17. Pęsety
18. Igły preparacyjne różnej grubości
19. Papier filtracyjny
20. Lampa spirytusowa
21. Termometr spirytusowy dla wody
22. Wata, gaza
23. Mikroskop binokularowy typu MBS
24. Luoa
25. Oświetlacze dla binokularów dowolnej marki

6.1. Dla ustalenia należy brać żywe larwy pasożytów. Przed ustalaniem pasożytów należy oddzielić je od otaczających tkanek (metacerkarium trematod i drobnych larw nematod najlepiej przy pomocy metody przegotowywania w sztucznym soku żołądkowym- ppkt.. 3.2.11.4). Przed zanurzeniem w cieczy ustalającej pozycję dla oddzielenia larw od krwi, śluzu i innych zanieczyszczeń, a także w razie konieczności ich rozłożenia larwy cestod i przywr należy umieścić w wodzie, a larwy trematod i nematod – w roztworze fizjologicznym Ringera na 15-30 min.

6.2. Objętość cieczy ustalającej pozycję powinna przekraczać objętość materiału dla którego ustala się pozycję o 20-40 razy.

6.3. Larwy cestod, trematod, przywr i pasożytów o nieustalonej przynależności systematycznej ustalone są 70° alkoholu. W tym celu aby aparat czepny przywr i skoleks u cestod był w stanie wywróconym, stosowany jest sposób ostrożnego, ale dość silnego ściskania robaków pomiędzy szkiełkami, zakraplając pipetką alkohol o mocy 80°. Nadmiar płynu stabilizującego odciągany jest bibułą filtracyjną od strony, przeciwnej do pipetki. Przetrzymany jest 15-20 min. Następnie szkiełko należy podnieść ostrożnie i larwa przenoszona jest do alkoholu 70°.

Stabilizowane w alkoholu, formalinie i innych stabilizatorach metacerkariów trematod źle zachowują pierwotną strukturę i nie może być określony ich gatunek. W związku z tym dopuszczalne jest przechowywanie płytek z tkanką mięśniową z meta cercariami trematod w ciągu 7-10 dni w temperaturze 1-4°C.

6.4. Larwy okrągłych robaków zaleca się stabilizować i przechowywać w cieczy Barbagallo (4%-y roztwór formaliny w roztworze fizjologicznym). Aby ciało larwy przy stabilizacji nie skręcało się, zaleca się stabilizowanie gorącą (do 70°C) cieczą Barbagallo.

6.5. Pasożyty przechowywane są w probówkach ze stabilizatorem, zamkniętych szczelnym tamponem z waty. Probówki wkładane są do słoika z dopasowanym korkiem, wypełnionego takim samym stabilizatorem. Do środka probówki wkładana jest etykieta, napisana ołówkiem T, 2T (lub dowolnym innym środkiem, nierozpuszczalnym w odczynnikach), odwrócona napisem do szkła. Na etykietce wskazywany jest rodzaj pasożyta, Nr badań według dziennika, data, gatunek ryby (produktu rybnego), z których wyodrębniono pasożyty, miejsce połowu (lub przedsiębiorstwo – producent).

Nieduże pasożyty dość długo przechowują się w stabilizatorze w pęcherzykach penicylinowych z korkiem polietylenowym.

7. Rejestracja rezultatów badań produkcji rybnej

7.1. Rezultaty badań wpisywane są do dziennika laboratoryjnego. W protokole każdego otwarcia [sekcji] wpisywane są następujące informacje:

- numer otwarcia [sekcji] (lub próbki);

- data (dostarczenia i badania);
- miejsce połowu ryb, mięczaków, skorupiaków itd.: terytorium administracyjne (konkretny biotop), zbiornik wodny (ocean, morze, rzeka itp. i konkretne miejsce połowu) lub miejsce produkcji wyrobów (przedsiębiorca-producent);
- miejsce (firma, przedsiębiorstwo) pobrania próbek;
- jaka organizacja dostarczyła produkcję, Nr zlecenia;
- nazwa gatunkowa (rodzajowa) badanego egzemplarza;
- rodzaj produkcji rybnej (świeża, mrożona, filet, farsz, konserwy itd.);
- wielkość i masa (wiek) i ilość próbki;
- numer porządkowy badanego egzemplarza;
- metody badania parazytologicznego;
- rodzaj wykrytych larw i ich ilość;
- miejsce lokalizacji larw (organy i tkanki);
- zdolność życiowa larw

7.2. Po przeprowadzeniu badania niezbędnej ilości (masy) egzemplarzy (patrz SanPiN 3.2.569-96, ppkt. 6.2, ppkt. 15.12, 15.13) rejestrowane są następujące wskaźniki:

- *stopień zarażenia lub ekstensywność inwazji* – ilość zarażonych egzemplarzy ryb (produkcji) w próbce, zarysowana w procentach;
- *intensywność inwazji* – amplituda intensywności – minimalna i maksymalna ilość pasożytów w jednej zarażonej sztuce lub produkcji rybnym, średnia intensywność inwazji – ilość larw, przypadających średnio na jedną zarażoną rybę (produkt rybny);
- *indeks obfitości* – ilość pasożytów, średnio przypadająca na jedną badaną rybę lub produkt rybny (nie tylko zarażone) danego gatunku; oblicza się drogą dzielenia ogólnej ilości wykrytych larw danego gatunku przez ilość badanych ryb;
- *średnia ilość pasożytów na 1 kg masy* (uzyskiwana jest przez dzielenie ogólnej ilości pasożytów w próbce przez ogólną masę próbki).

Dla ułatwienia obliczania pasożytów wykrytych przy kontroli, cyfry stopnia zarażenia każdej sztuki (intensywność) zapisywane są w postaci tabeli roboczej, jak pokazano w poniższym przykładzie

Cyfry prawej pionowej kolumny uzyskiwane są drogą mnożenia odpowiedniego rzędu poziomego dwóch poprzednich kolumn. Zapisywana jest także masa ogólna próbki: dla naszego przykładu przyjmujemy 30 kg.

Z wykonanych zapisów określone są następujące wskaźniki. Ekstensywność inwazji: $(15:32 \times 100) = 46,9\%$. Amplituda intensywności: od 0 do 23. Indeks obfitości: $(67:32) = 2,1$ pasożytów. Średnia ilość pasożytów na 1 kg masy: $(67:30) = 2,2$. Ostatni wskaźnik określany jest także przy wykryciu pasożytów, niestanowiących niebezpieczeństwa dla zdrowia człowieka i porównywany jest on z „dopuszczalną średnią ilością pasożytów na 1 kg masy” (K) (tab.3 SanPiN 3.2.569-96, załącznik 3)

7.3. Rezultaty badań sporządzane są w postaci protokołu.

Ilość pasożytów w rybach (kawałku)	Ilość ryb (kawałków), zawierających odpowiednią ilość pasożytów	Ogólna ilość pasożytów w rybach, zarażonych jednakowo
0	17 – ilość ryb niezarażonych	0
1	6	6
2	4	8
3	1	3
5	2	10
17	1	17
23	1	23
	Łącznie zbadano ryb (kawałków) – 32	Ogólna ilość pasożytów w próbce - 67

8. Aparatura, materiały, naczynia laboratoryjne i odczynniki

8.1. Aparatura i instrumentarium

Waga laboratoryjna z zestawem odważników (lub waga elektroniczna)
Igły preparacyjne o różnej grubości
Źródło prądu stałego (bateria z napięciem 1,5 V)
Kleszczyki opatrunkowe [korncangi]
Kuwety emaliowane
Nożyce medyczne
Lampa iluminescencyjna
Lupa
Mikroskop binokularowy typu MBS
Mikroskop biologiczny typu Biolam, Bimam
Młotek drewniany
Okular-mikrometr dla mikroskopu świetlnego
Okular-mikrometr dla mikroskopu binokularowego
Obiekt-mikrometr
Oświetlacze dla mikroskopu typu [OI] OИ-7, OИ-9, OИ-18, OИ-19 lub innej marki
Okulary ochronne (niebieskie)
Pęsety medyczne
Metr lub linijka
Sitka z oczkami 1x1 mm
Skalpel chirurgiczny
Stolik z przezroczystą pokrywą górną (o wymiarach nie mniej niż 40x40 cm)
Termostat
Lodówka domowa elektryczna (lub otrzymywana z importu)
Szpatułki (łopatki) metalowe, plastikowe, drewniane
Kuchenska elektryczna

8.2. Naczynia i materiały laboratoryjne

Słoiki szklane z dopasowanym korkiem do przechowywania odczynników (0,1, 0,25, 0,5 l)
Papier filtracyjny
Boksy o różnych wymiarach
Wata medyczna higroskopijna
Lejki szklane o różnych wymiarach
Gruszki gumowe
Zwierzęta laboratoryjne (chomiki złociste, białe myszy i szczury)
Garnki emaliowane
Ołówek do szkła

Kolby o nominalnej pojemności 200, 400, 1000, 1600 cm
Gaza medyczna
Pipetki szklane (pasteurowskie)

Pipetki o pojemności 1-10 cm
Probówka
Probówka
Pęcherzyki penicylinowe
Lampa spirytusowa laboratoryjna szklana
Szkienka przedmiotowa dla mikropreparatów
Szkienka przedmiotowa (6-8x12-15 cm, o grubości 3-5 mm)
Szkienka nakrywkowa dla mikropreparatów
Szkienka zegarkowa
Termometr cieczowy (nie rtęciowy)
Cylindry miarowe (0,5-0,25 l)
Naczynia biologiczne (Petriego)
Strzykawki 2 ml z rurkami
Szklenki chemiczne

8.3. Odczynniki

Gliceryna
Woda destylowana
Żółć sucha lub żółć natywna zwierząt gospodarskich
Wodorotlenek wapnia
Chlorek wapnia
Dwuchlorek wapnia
Kwas solny
Wodorotlenek sodu
Chlorek sodu
Kwaśny węglan sodowy
Czerwień obojętna (neutral-red)
Błękit metylenowy
Kwas mleczny
Pepsyna
Roztwór fizjologiczny
Kwas rozolowy (auryna)
Alkohol etylowy rektyfikowany
Trypsyna
Formalina
Chloroform
Eter

Spis literatury

1. Bejer S.A., Bielakowa J.W., Sidorow E.G. Metody badania żywicieli pośrednich czynnika wywołującego opisthorchozę. - Alma-Ata, 1987. - 85 str.
2. Bychowska-Pawłowska I.E. Badanie parazytologiczne ryb. - L., 1985. - 120 str.
3. Wałowaja M.A., Kawtaradze D.N. Mikrotechnika. Zasady. Reguły. Sztuka. Eksperyment. - M., 1993. - 240 str.
4. Karasiew A.B., Mitieniew W.K., Dowaglew A.S., Sergijew W.P. Pasożyty Morza Barentsa, niebezpieczne dla zdrowia człowieka. - Murmańsk, 1997. - 32 str.
5. Kotelnikow G.A. Badania parazytologiczne środowiska naturalnego. - M., 1991. - 144 str.
6. Kuroczkin J.W. Trematody fauny ZSRR. Paragonimidy. - M., 1987. - 150 str.
7. Wyznacznik pasożytów ryb słodkowodnych / Pod red. O.N. Bauera. - L., 1987. - T. 3. - 583 str.
8. Podjapolskaja W.P., Kapustin W.F. Robaczycze człowieka. - M., 1958.
9. Skriabin K.I. Trematody zwierząt i człowieka. - M., 1952. - T. 1, 4, 6.
10. Disease of marine animals. // Editor Otto Kinne. - Hamburg, 1983. - V. II. - 571 p.
11. Disease of marine animals. // Editor Otto Kinne. - Hamburg, 1990. - V. III. - 696 p.
12. Disease of marine animals. // Editor Otto Kinne. - Hamburg, 1984. - V. IV. - Part 1. - 541 p.
13. Disease of marine animals. // Editor Otto Kinne. - Hamburg, 1985. - V. IV. - Part 2. - 341 p.
14. SanPiN 15-6/44, 1990. Przepisy sanitarne w zakresie ekspertyzy sanitarno-parazytologicznej ryb i warunki unieszkodliwiania ich od larw tasiemca bruzdogłowca [Diphyllobothriasis] i przywr kocich [Opisthorchosis].
15. SanPiN 2.3.2.560-96. Wymogi higieniczne wobec jakości i bezpieczeństwa surowców spożywczych i produktów żywnościowych.
16. SanPiN 3.2.569-96. Profilaktyka chorób wywołanych przez pasożyty na terytorium Federacji Rosyjskiej. Załącznik 3. Profilaktyka robaczyc, przekazywanych przez ryby, skorupiaki, mięczaki, płazy, gady i produkty ich przetwórstwa.
17. SanPiN 2.3.4.050-96. Produkcja i sprzedaż produktów rybnych.
18. GOST 0001.8.1.0057, 08.12.93. Przepisy certyfikacji ryb, produktów rybnych i owoców morza na zgodność z wymogami bezpieczeństwa.
19. Przepisy wykonania bhp, sanitarne w przemyśle, o trybie przeciwepidemiologicznym i higienie osobistej przy pracy w laboratoriach (wydziałach, oddziałach) instytucji sanitarno-epidemiologicznych systemu Ministerstwa Ochrony zdrowia ZSRR. Zatw. przez MZ ZSRR 20 października 1981 r. nr 2455-81.

20. Metodyka badania parazytologicznego ryb morskich i produkcji rybnej (ryby morskie- surowe, ryby schłodzone i mrożone). Zatw. przez Ministerstwo Gospodarki Rybnej ZSRR 29.12.88. - M., 1989.

Uwaga.

W oficjalnym tekście dokumentu, wyraźnie widać błąd: mowa o „Ogólnym trybie postępowania z próbkami, wykorzystywanymi przy prowadzeniu obowiązkowej certyfikacji produkcji. PR 50.3002-95”, a nie PR 50.3.002-95 "Typowy tryb postępowania...".

21. Przepisy certyfikacji PR 50.3.002-95. Typowy tryb postępowania z próbkami, wykorzystywanymi do prowadzenia obowiązkowej certyfikacji produkcji.

22. Przepisy sanitarne 1.2.731-99. Bezpieczeństwo pracy z mikroorganizmami III - IV grupy patogeniczności i pasożytami.

23. GOST 7631-85. Ryby, ssaki morskie, bezkręgowce morskie i produkty ich przetwórstwa. Przepisy odbioru, organoleptyczne metody oceny jakości, metody pobierania próbek do badań laboratoryjnych. n

24. Zmiana nr 2 do GOST-u 7631-85. Ryby, ssaki morskie, bezkręgowce morskie i produkty ich przetwórstwa. Zatwierdzona Uchwałą Państwowego Standardu ZSRR z dnia 25.10.89 N 3195.

25. GOST P 8.563-96. Metodyki wykonywania pomiarów.

26. GOST 7636-85. Ryby, ssaki morskie, bezkręgowce morskie i produkty ich przetwórstwa. Metody analizy.

27. System akredytacji laboratoriów Państwowej Służby Sanitarnej-Epidemiologicznej Federacji Rosyjskiej. Zatwierdzony i wprowadzony w życie Uchwałą Państwowego komitetu Nadzoru Sanitarnej-Epidemiologicznego Rosji i Standardem Państwowym Rosji z dnia 02.07.93 nr 6/13.

28. Przepisy prowadzenia certyfikacji produktów pokarmowych i surowców spożywczych. Zatw. Uchwałą Państwowego Standardu Rosji z dnia 28.04.99 nr 21.

Arkusze informacyjne

Przy opracowaniu Wskazówek metodycznych wykorzystano materiały: T.W. Bezgranicznej, M.G. Karpińskiego (Ogólnorosyjski Instytut Naukowo-Badawczy Gospodarki Rybnej i Oceanografii); G.N. Rodiuk, O.A. Szuchgaler (Atlantycki Instytut Naukowo-Badawczy Morskiej Gospodarki Rybnej i Oceanografii); L.W. Łarcowej, L.I. Biserowej (Kaspijski Instytut Naukowo-Badawczy Gospodarki Rybnej); G.P. Wiałowej, W.W. Steksowej (Sachaliński Instytut Naukowo-Badawczy Morskiej Gospodarki Rybnej i Oceanografii); T.N. Cybinej (FCGSEN); W.N. Żeleźniaka (CGSEN w rejonie chimikińskim MO).

Spis treści

1. Sfera zastosowania i zapisy ogólne.....	1
2. Pobieranie, przechowywanie i przygotowanie próbek hydrobiontów i produktów i przetwórstwa do analizy...	2
3. Metody badania parazytologicznego hydrobiontów i produktów ich przetwórstwa.....	7
4. Metody zróżnicowanej diagnostyki larw pasożytów.....	19
5. Metody ustalania zdolności życiowej pasożytów.....	39
6. Metody ustalania i przechowywania pasożytów.....	44
7. Rejestracja rezultatów badań produkcji rybnej.....	45
8. Aparatura, materiały, naczynia laboratoryjne i odczynniki	46
Spis literatury.....	48