

Opća pretraga riba

Svrha vježbi	2
Uzimanje krvi i pripremanje razmaza	2
Koeffcijent uhranjenosti	3
Određivanje svježine lešine	4
Pretraga vanjskih organa;	4
Mikroskopska pretraga kože na parazite i bakterije	5
Pregled škrga	6
Tjelesna šupljina	6
Peritoneum, mezenterij i površina organa	6
Probavni sustav	7
Pretraga probavnog sustava	7
Pregled organa	7
Riblji mjehur	7
Bubreg	8
Srce i perikard	8
Mišićno tkivo	8
Mozak	8
Obdukcijski protokol	9
Detaljni sekcijski zapisnik	10
Literatura	11
Indeks	11

Svrha vježbi je upoznati studente s načinom utvrđivanja promjena na ribama i pripremanja službenog dopisa ovlaštenoj instituciji.

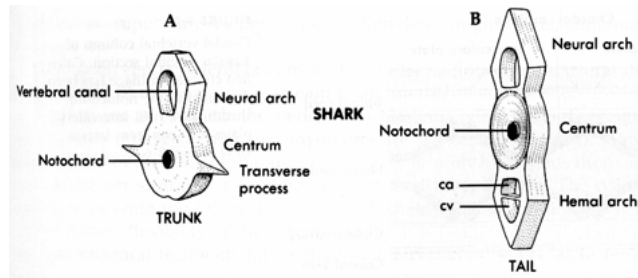
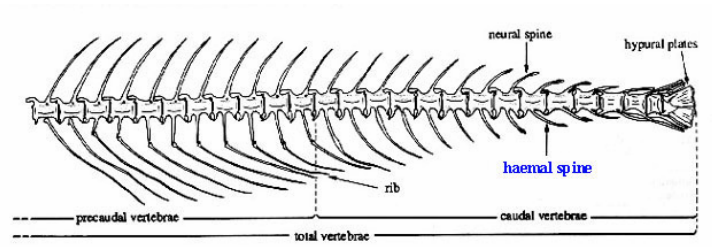
Uzimanje krvi i pripremanje razmaza

Krv se vadi dok je riba živa. Stoga odmah na početku vježbi treba pripremiti sve za vađenje krvi i pripremanje razmaza: iglu, predmetnice i pokrovna stakalca.

Krv se vadi iz kaudalnih krvnih žila smještenih u hemalnom kanalu. Mjesto uboda se nalazi u sjecištu bočne linije i linije koja odvaja trup od repa (početak podrepne peraje).

U naznačeno mjesto iglu zabadamo toliko dugo dok ne osjetimo kralješnicu.

Fotografije izradio Emil Gjurčević



Vrh igle usmjerimo ventralno tako da probijemo koštani hemalni kanal. Nakon probadanja krvnih žila smještenih u hemalnom kanalu u kapilari se pojavi krv.

Krv riba se grušava vrlo brzo pa je potrebno razmazak napraviti u vrlo kratkom vremenu. Dobro osušeni krvni razmazak se boji po Pappenheimu* (Unna-Pappenheim stain)

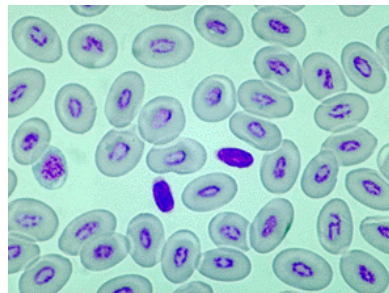
Pappenheim, bojenje po Pappenheimu: Kontrastno bojenje s otopinom metilenskog zelenila. To je najčešća boja za krvne razmaske. Najčešće se rabi za uočavanje plazma stanica čija citoplazma se boji crveno jer ima veliku koncentraciju RNA, i za uočavanje RNA i DNA u tkivnim pripravcima.

Preparat se fiksira tijekom 3 minute u May-Grünwald boji, rezredi se s jednakom količinom destilirane vode i boji se 3 minute. Otopina se ukloni i preparat se nastavi bojiti u otopini Giemse tijekom 15-20 minuta. Nakon toga slijedi sušenje preparata.

Mikroskopski se u razmazu uočavaju krvni elementi i eventualni krvni paraziti. Krvni paraziti se dobro vide i u nativnim preparatima.

Za potrebe serološke pretrage potrebno je oko 2 ml krvi. Krv se vadi pomoću injekcijske igle i brizgalice. Mjesto uboda se obriše i dezinficira alkoholom.

Eritrociti riba – s jezgrom



Nakon vađenja krvi potrebno je ribu eutanazirati*

Eutanazija; lagana, bezbolna smrt.

Eutanazija riba. Preporuka Australijske Veterinarske Asocijacije; letalna doza anestetika koju propiše veterinar je preporučena metoda eutanazije. Razaranje leđne moždine, bilo skalpelom, bilo bušenjem je preporučeno. Bušenje je preporučeno za ribe duže od 10 cm.

Eutanazija riba, Approved Animal Use Policies, protokoli koje propisuje IACUC, UNIVERSITY OF WASHINGTON

- 1) Primarne metode eutanazije riba (metode koje se mogu koristiti same) uključuju:
 - a) MS-222/TMS - doza: 50 do 250 mg/L .
 - b) Benzocaine - doza: 50 do 500 mg/L
 - c) Alka-Seltzer® doza: (1 tableta/ 20L)
 - d) Natrij bikarbonat doza: (30g/L)
 - i) **Upozorenje:** Riba eutanazirana MS-222, Benzocaine, natrijevim bikarbonatom ili Alka-Seltzer® se ne mogu rabiti za ljudsku prehranu..
 - e) Izlaganje otopini zasićenoj s ugljičnim dioksidom (CO₂):
 - f) Hlađenje tropskih riba
- 2) Sekundarne metode eutanazije riba (metode koje se ne mogu rabiti same; iza njih mora slijediti dodatna metoda koje će osigurati smrt):
 - a) Oštar udarac u glavu. Ova metoda mora biti upotpunjena iskrvarenjem (putem rasijecanja velikih branhijskih žila ili kaudalnog dijela velike repne žile ili dekapitacijom (pomoću oštrog noža)
 - b) Izmjenična ili jednosmjerna električna struja dovoljne snage.
 - c) Hlađenje riba koje nisu tropske u soli.

Prije sekcije i pretrage riba potrebno je utvrditi vrstu, starost, dužinu (cm) i kondiciju. Kondicija se može odrediti grubo općim pregledom uhranjenosti ili precizno određivanjem koeficijenta uhranjenosti.

Koeficijent uhranjenosti K se računa po formuli (J.E.Williams 1951):

$$K = \frac{100,000 W}{L^3}$$

Gdje je W masa u g, a L dužina u mm.

Određivanje svježine lešine

Kriteriji za određivanje svježine lešine su: miris, izgled očiju, škruga, prisutnost i stupanj mrtvačke ukočenosti i pH mišića. Obzirom na brze postmortalne promjene riba, za pretragu su pogodne samo vrlo svježe lešine. Ukoliko je rožnica zamučena – mliječno bijele boje, boje škruga promijenjena (do svijetlo ružičasta), te ako se tkivo škruga već raspada, riba nije prikladna za pretragu. Sekciju je ipak uputno izvršiti ukoliko nije moguće dobiti bolji uzorak. Mrtvačka ukočenost ribe ukazuje da je lešina dovoljno svježa za sekciju.

Pretraga vanjskih organa;

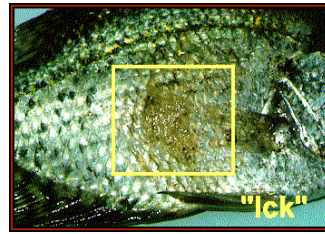
1. Koža:
 - a. povećana količina sluzi,
 - b. upale,
 - c. erozije,
 - d. čirevi,
 - e. vezikule,
 - f. duboke rane,
 - g. promjene u pigmentaciji,
 - h. zaraslice,
 - i. krvarenja,
 - j. čvorići,
 - k. paraziti,
 - l. plijesni
2. Peraje (kožni nabori poduprti koštanim žbicama) → isto kao i koža
3. Usta → isto kao i koža
4. Škržni poklopac, vanjska i unutarnja površina, isto kao i koža
5. Nosnice;
 - a. prisutnost sluzi,
 - b. upala,
 - c. gljivica ili
 - d. defekata
6. Oči;
 - a. zamučene,
 - b. krvarenja,
 - c. egzoftalmus ili endoftalmus,
 - d. sljepoća ili
 - e. paraziti u očnoj jabučici.
7. Očni paraziti su smješteni uz leću.
Pretraga oka. Kod manjih riba se cijela očna jabučica stisne između dva predmetna stakalca, a kod većih se očna jabučica razreže i izvadi se leća s nešto okolnog tkiva te se stisne između predmetnih stakalaca. Promatra se pod malim povećanjem mikroskopa.
8. Anus;
 - a. upala,
 - b. ispučanje,
 - c. mogućnost istiskanja fecesa pri laganom do umjerenom pritisku abdomena,
 - d. boja,
 - e. konzistencija,
 - f. količina fecesa.

Ovaj dio pretrage potrebno je obaviti brzo kako ne bi došlo do sušenja kože i škruga koje moraju biti vlažne za slijedeće faze pretrage.

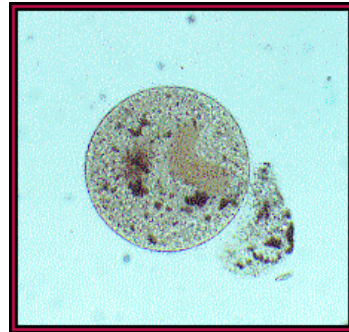
Mikroskopska pretraga kože na parazite i bakterije

Dvije predmetnice s kapljicom vode na njima je potrebno pripremiti te:

- Ostrugati kožu tupom stranom skalpela i staviti uzorak u kap vode na predmetnicu (pomoću pincete). Uzorke je potrebno uzeti s predjela gdje su paraziti ili bakterije brojnije, odnosno s vidljivo promijenjenih područja. Ukoliko nema područja s jasnim promjenama, područja izbora su smještena iza leđne, grudne ili trbušne peraje, te na dorzalnom dijelu glave.
- Nakon smještaja uzorka na predmetnicu, potrebno ga pokriti s potkrovnicom. Pri pretrazi većih parazita, preparat je potrebno pregledati prvo pod najmanjim povećanjem, zatim pod srednjim, a po potrebi pod imerzijom. Kod malih riba najjednostavnije je odrezati cijelu peraju i mikroskopski je pregledati.
- **Jasne promjene.** Ukoliko se vide upalna područja ili čirevi na koži, potrebno je pripremiti obojene razmaze tih područja. Obzirom da u samom centru promjene zbog uznapredovanih patoloških procesa količina i/ili zastupljenost patogenog mikroorganizma može bitno alternirati, materijal za pretragu valja uzeti i s ruba promjene i iz tkiva gdje je promjena najintenzivnija. Materijal se pomoću sterilne bakteriološke uške ili skalpela uzme i jednolično razmaže u tankom sloju na najmanje dvije predmetnice.



Primjeri Ihtiofirijaze na koži i repu (gore), te trofozoit *Ichthyophthirius multifiliis*-a u tkivu škrge (lijevo) i sam (desno).



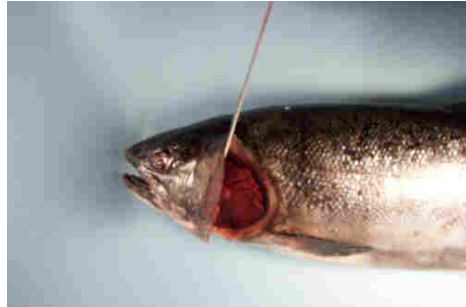
Pregled škrge

Škrge valja pregledati in situ. U tu svrhu potrebno je odrezati škržne poklopce.

Uočiti valja:

- Boja – stupanj svježine lešine, anemija
- Količina sluzi
- Prisutnost parazita
- Nekrotična područja
- Krvarenja
- Ciste
- Regenerirana područja.

Potom se izrežu svi škržni lukovi na obje strane i mikroskopski se pregledaju. Lukovi se stave na komad stakla ili kod manjih riba na predmetnicu i pregledaju pod malim povećanjem. Kod većih riba odreže se škarama nekoliko škržnih listiće i pregleda se pod mikroskopom na prisutnost gljivica, parazita, bakterija i promjena u strukturi. Osobito je važno na taj način pregledati promijenjena područja. Ukoliko postoji sumnja na prisutnost patogenih bakterija, treba primijeniti obojene razmaze.



Tjelesna šupljina

Ribu otvaramo pomoću tri reza*. Nakon što je odstranjena postrana stjenka trbušne šupljine, treba obratiti pažnju na položaj organa, prisutnost tekućine, slobodnih parazita ili drugog sadržaja. Ukoliko je prisutna tekućina, valja pripremiti razmazak te tekućine i opisati količinu, boju, zamućanost i karakter sadržaja.

Otvaranje trbušne šupljine pomoću tri reza:

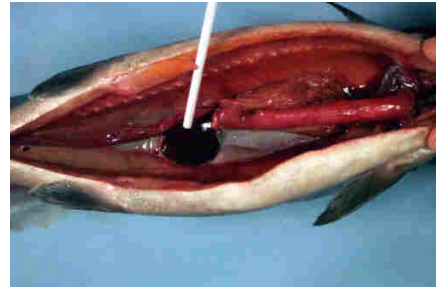
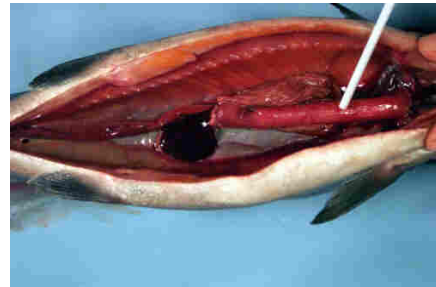
- ✚ Škarama se zareže ispred anusa i tupi kraj škara se uvede u trbušnu šupljinu. Prvi rez ide ventralno po medijalnoj liniji i završava između škržnih poklopaca.
- ✚ Drugi rez počinje na istom mjestu, ide kraniodorzalno uz gornju stjenku trbušne šupljine, sve do dorzalnog ruba škržne šupljine.
- ✚ Treći rez ide uz rub škržnog poklopca i povezuje prva dva reza.

Peritoneum, mezenterij i površina organa su normalno glatki, sjajni, umjereno vlažni i prozirni. Potrebno ih je pregledati na prisutnost krvarenja, parazita, zamućenost, zadebljanja itd.

Probavni sustav

Pretraga probavnog sustava počinje rezom jednjaka u kraniodorzalnom dijelu trbušne šupljine i stražnjeg crijeva pred anusom. Time je probavni sustav odvojen od ostatka tijela. Nakon toga je potrebno osloboditi jetru od veza sa stjenkom trbušne šupljine, te izvaditi probavne organe i gonade. Riblji mjehur i bubrezi ostaju u položaju. Jetru i slezenu je potrebno odvojiti od crijeva.

Pregled organa. Potrebno je uočiti boju, površinu i rubove organa. Zadebljanje rubova upućuje na povećanje organa uslijed edema, degeneracije, upale itd. Jetru i slezenu je potrebno presjeći i uočiti njihovu boju, konzistenciju i građu. Crijeva se otvaraju po dužini škarama i promatra se količina, boja, izgled i konzistencija sadržaja, vrsta hrane i eventualnu prisutnost parazita i promjena na stjenci crijeva. Ukoliko se procjeni potrebnim, uzima se uzorak za mikroskopski pregled na parazite (kopolološi?). Nakon toga se ispire stjenka probavnog trakta i promatra prisutnost i eventualna kvaliteta promjena na stjenci.



Riblji mjehur (Swim bladder) je potrebno izvaditi i pregledati obzirom na oblik, veličinu i boju. Nakon otvaranja mjehura poželjno je potrebno posvetiti sadržaju – ukoliko ga ima; količini i svojstvima, unutarnjoj površini mjehura i eventualnoj prisutnosti parazita. Ukoliko ima promjena, potrebno ih je promotriti na mikroskopskom preparatu.



Riblji mjehur salamonida



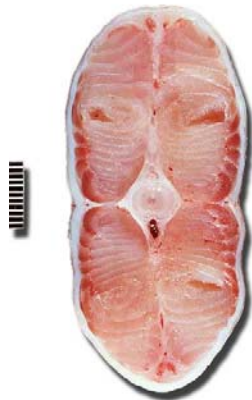


Baterijska bolest bubrega, uzrokovano s *Renibacterium salmoninarum*

Bubreg. Cijeli srednji bubreg postaje vidljiv nakon uklanjanja ribljeg mjehura. Potrebno je procijeniti boju, veličinu, oštrinu rubova, prisustvo parazita i čvorova. Bubreg je potrebno prerezati i pogledati nekoliko preereza. Tanki listić tkiva bubrega stavi se na predmetnicu i pokrije drugom predmetnicom kako bi se mikroskopski pregledalo na prisutnost parazita. Ukoliko se ukaže potrebnim, pripremaju se otisci bubrega; komad tkiva s kojeg dodirno vate uklonimo suvišnu krv prislonimo uz čistu predmetnicu. Nakon sušenja otiska slijedi bojenje bilo hematološkom bilo bakteriološkom metodom. Prednji bubreg smješten je ekstraperitonealno ispod kranijalnog dijela kralješnice, a ispred pregradnog zida koji dijeli perikardijalnu od peritonealne šupljine. Prednji bubreg se promatra na isti način kao i srednji.

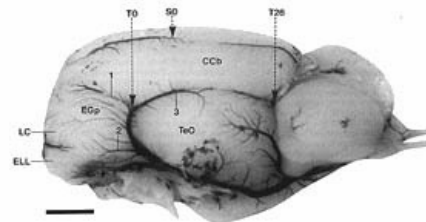
Srce i perikard.

Perikardijalnu šupljinu potrebno je pogledati na eventualnu prisutnost tekućine. Na vanjskoj i unutarnjoj stijenci srca, poglavito komore i arterijske lukovice, treba obratiti pažnju na krvarenja i parazitarnu i gljivične čvoriće.



Mišićno tkivo treba pregledati pomoću nekoliko longitudinalnih rezova na prisutnost patoloških promjena i parazite.

Mozak se pregledava; boja, krvarenja i paraziti.



Obdukcijski protokol

Kako univerzalna shema za sastavljanje obdukcijskog protokola ne postoji, a nepravilno sastavljeni obdukcijski zapisnik može dovesti do prekršajnih, pa čak i krivičnih prijava, predlažemo dvije osnovne predloška:

- Za veterinare s bogatim iskustvom u obdukciji riba predložak s manjim brojem obaveznih naslova – veterinar će na osnovi iskustva odlučiti što i koliko treba opisati. Oprez: izostavljanje podataka odnosno skraćivanje zapisnika obducent čini na osobnu odgovornost!
- Predložak sa svim bitnim naslovima

Obducent i ustanova: _____

Broj: _____

Mjesto: _____

Obdukcijski protokol broj: _____

Dana __. __. 20__ godine u __:__ sati na području _____, izvršena je obdukcija riba iz ribnjaka _____.

Vlasnik _____

Obdukciju je izvršio veterinar _____ u prisutnosti _____

Anamneza:

Vanjski nalaz:

Unutrašnji nalaz:

Patološko-anatomski nalaz:

Rezultati specijalističkih (pomoćnih) pretraga:

Mišljenje:

Potpis obducenta – veterinara
Eventualno potpis prisutnih - svjedoka

Detaljni sekcijski zapisnik

Obducent i ustanova:

Broj obdukcijskog protokola:

Datum:

Mjesto:

Svjedoci:

Obdukcijski protokol dostaviti (zaokružiti):

Zavod za biologiju i patologiju riba i pčela,
Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
Heinzelova 55, 10000 Zagreb

Arhivu
 Vlasniku, na adresu:

Sudskom vještaku na adresu:

Ostalo:

Porijeklo ribe

Vlasnik

Kontakt podaci;

Tel: _____, Email: _____,

Web stranica: http://www. _____

Vrsta; _____

Dob; _____

Prosječna težina: _____

Ukupan broj jedinki; _____, od toga živih; _____,
uginulih; _____, svježe uginulih; _____ s početnim
znacima raspadanja; _____, nepodesnih za sekciju

Procjena okoline:

Anamneza:

Ponašanje ribe:

Izgled:

Krv:

Kondicija ili koeficijent uhranjenosti

Koža makroskopski:

Mikroskopski pregled kože (bris):

Peraje:

Usta:

Nosni otvori:

Oči:

Anus:

Škržni poklopci:

Škrge:

Usna šupljina:

Peritoneum:

Peritonealna šupljina:

Površina organa:

Probavni trakt:

Jetra:

Slezena:

Žučni mjehur:

Riblji mjehur:

Bubreg:

Gonade:

Srce:

Perikardijalna šupljina:

Mišićno tkivo:

Mozak:

Kosti:

Sekcijska dijagnoza (patološko anatomski
nalaz):

Ostali nalazi;

Virusološki
 Bakteriološki
 Parazitološki
 Histološki
 Hematološki
 Toksikološki

Konačna dijagnoza:

Preporučena terapije:

Katamnestički podaci (nakon terapije):

Potpis obducenta – veterinara
Eventualno potpis prisutnih - svjedoka

Literatura

- ✚ Hemalni kanal:
 - http://www.fishbase.org/Glossary/Glossary_cfm?TermEnglish=espina%20hemal%3F%3F
 - <http://www.biology.eku.edu/RITCHISO/342skellab.htm>
- ✚ Mozak <http://www.flmnh.ufl.edu/fish/tropical/JSA/neural.htm>
- ✚ Srce: <http://www.vet.ohio-state.edu/docs/vm608/anatomy/anatomy.html>
- ✚ Bubrege <http://oregonstate.edu/dept/salmon/projects/salmon-bacteria.html>
- ✚ Riblji mjehur, probavni organi <http://www.pskf.ca/sd/>
- ✚ Ichthyophthirius <http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/ichthyophthirius.html>

Indeks

- Bubreg, 8
- Eritrociti riba, 3
- Eutanazija, 3
- Eutanazija riba, 3
- Hemalni kanal, 2
- Ichthyophthirius multifiliis, 5
- Koeficijent uhranjenost, 3
- Krv, 2
- Literatura, 11
- Mezenterij, 6
- Mišićno tkivo, 8
- Mozak, 8
- Očni paraziti, 4
- Određivanje svježine lešine, 4
- Opća pretraga riba, 2
- Otvaranje trbušne šupljine, 6
- Pappenhim bojenje, 2
- Peritoneum, 6
- pH mišić, 4
- Postmortalne promjene riba, 4
- Pregled organa, 7
- Pregled škrge, 6
- Pretraga kože, 5
- Pretraga oka, 4
- Pretraga probavnog sustava, 7
- Pretraga vanjskih organa, 4
- Pripremanje razmaza, 2
- Probavni sustav, 7
- Renibacterium salmoninarum*, 8
- Riblji mjehur, 7, 11
- Serološka pretraga, 3
- Srce i perikard, 8
- Svježina lešine, 4
- Tjelesna šupljina, 6
- Uzimanje krvi, 2