

**ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ
ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΙΧΘΥΩΝ**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο σκοπός αυτής της σειράς εργαστηριακών ασκήσεων και των σημειώσεων που τις συνοδεύουν είναι να παρουσιάσουν τις γενικές αρχές και διαδικασίες που διέπουν, σε επίπεδο ρουτίνας, την παθολογική διερεύνηση δειγμάτων ψαριών.

Μετά από ένα εισαγωγικό εργαστήριο ανατομικής φύσεως, επικεντρώνονται στο μακροσκοπικό έλεγχο των εξωτερικών και εσωτερικών επιφανειών των ψαριών για τη παρατήρηση τυχόν αλλοιώσεων, τραυματισμών και παρασίτων και στη μικροσκοπική παρατήρηση νωπών επιχρισμάτων με ή χωρίς βαφή. Η ανεύρεση παρασίτων ακολουθείται από ταυτοποίησή τους με τη χρήση εικονογραφημένου υλικού.

Συνεχίζουν με τη λήψη δειγμάτων από εσωτερικά και εξωτερικά σημεία των ψαριών για τη διενέργεια μικροβιολογικού ελέγχου. Τυχόν ανάπτυξη αποικιών βακτηρίων ταυτοποιείται σε επίπεδο γένους και εάν είναι δυνατό και είδους.

Βακτηριακά είδη που είναι ήδη ταυτοποιημένα χρησιμοποιούνται για την άσκηση των φοιτητών στο χειρισμό τους και τη ταυτοποίησή τους. Γίνονται αντιβιογράμματα.

Οι φοιτητές επισκέπτονται το εργαστήριο ιστολογίας του Βοστανείου Νοσοκομείου για να δουν από κοντά τη διαδικασία παρασκευής ιστολογικών δειγμάτων.

Στο εργαστήριο εκπαιδεύονται στην αναγνώριση ιστολογικών δειγμάτων από φυσιολογικούς ιστούς και από ιστούς που παρουσιάζουν αλλοιώσεις.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ Νο 1 Η ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΗΣ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ & ΤΟΥ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ

Υλικό: Τσιπούρες και λαβράκια έως και 2 ώρες από το θάνατό τους, διατηρημένα σε πάγο.

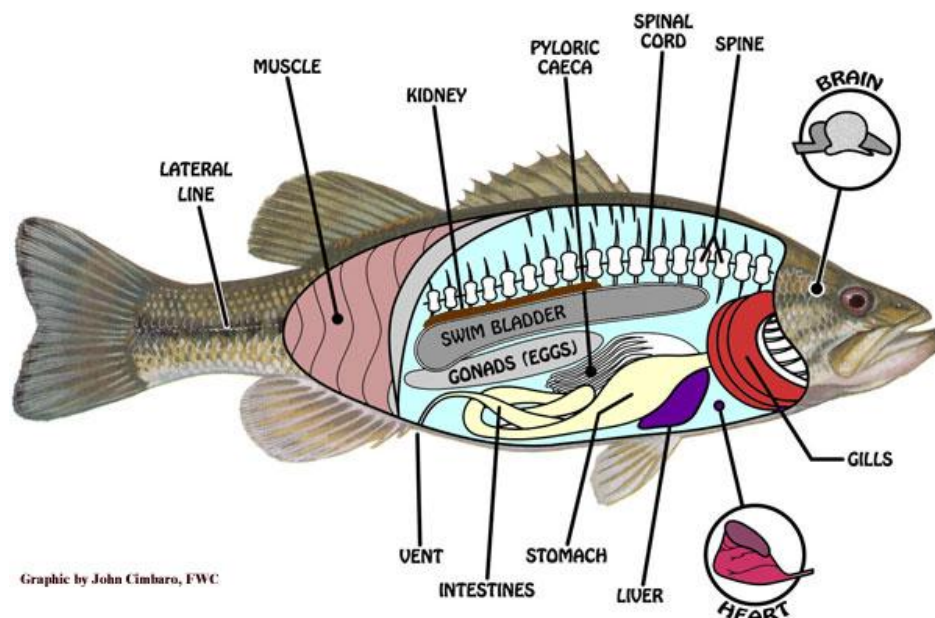
Διαδικασία: Το ψάρι τοποθετείται στο πλάι πάνω στο δίσκο ανατομίας. Ελέγχεται και από τις δύο πλευρές του για τυχόν αλλοιώσεις, τραυματισμούς και εξωπαράσιτα στο δέρμα, στα μάτια, στο στόμα και τα πτερύγια.

Ανασηκώνονται τα βραγχιακά επικαλύμματα και ελέγχονται τα βράγχια ως προς το χρωματισμό τους, εστίες αποχρωματισμού, αλλοιώσεις και ύπαρξη ορατών παρασίτων.

Το ψάρι συγκρατείται ανάσκελα με το κεφάλι του μακριά από εμάς και βρέχεται με αιθανόλη. Με ένα νυστέρι που έχει προηγουμένως απολυμανθεί (εμβάπτιση σε αιθανόλη και φλόγιση) γίνεται με προσοχή μία μικρή τομή 1cm προσθίως του πρωκτού. Το νυστέρι εξέρχεται και στη τομή εισέρχεται απολυμασμένο ψαλίδι. Εφαρμόζοντας στο ψαλίδι τάση προς τα επάνω ώστε να ανασηκώνεται το κοιλιακό τοίχωμα, αρχίζουμε να τέμνουμε με κατεύθυνση προς το κεφάλι και στη μέση γραμμή της κοιλιάς μέχρι τα οστά της βάσης των θωρακικών πτερυγίων.

Το ψαλίδι εξέρχεται, απολυμαίνεται ξανά και αφού τοποθετηθεί εκ νέου στην αρχική τομή (το σώμα του ψαριού έχει τοποθετηθεί τώρα πλαγίως), τέμνουμε προς τη ράχη και μετά πλαγίως ακολουθώντας τα όρια της κοιλιακής κοιλότητας μέχρι να φτάσουμε στο πρόσθιο όριό της.

Το ψαλίδι τοποθετείται πάλι στο οινόπνευμα και με μία απολυμασμένη λαβίδα ανασηκώνουμε το κοιλιακό τοίχωμα που έχουμε κόψει, το «ανοίγουμε» και το συγκρατούμε πάνω στον ανατομικό δίσκο.



Παρατηρούμε τη γενική κατάσταση των σπλάγγνων και (υγρό στη κοιλιακή κοιλότητα, πετέχειες, αιμορραγίες, αλλοιώσεις) και με μία απολυμασμένη λαβίδα

ανασηκώνουμε και παρατηρούμε τον σπλήνα, κατόπιν το ήπαρ και τα έντερα (προσοχή: δεν καταστρέφουμε λόγω υπερβολικής πίεσης κανένα όργανο και δεν τρυπάμε το έντερο).

Με τη λαβίδα ανασηκώνουμε τα έντερα και τα βγάζουμε έξω από τη κοιλιακή κοιλότητα. Ελέγχουμε τη κατάσταση της νηκτικής κύστης που βρίσκεται ραχιαία στη κοιλιακή κοιλότητα και κατόπιν την αφαιρούμε με προσοχή για να αποκαλύψουμε το νεφρό ο οποίος είναι κολλημένος πάνω στη κάτω πλευρά της σπονδυλικής στήλης. Ελέγχουμε το νεφρό για τυχόν αλλοιώσεις.

Αφού απολυμάνουμε πάλι τα εργαλεία μας, βγάζουμε και κόβουμε τα σπλάγχνα ώστε να αδειάσει η κοιλιακή κοιλότητα και να έχουμε καλύτερη πρόσβαση για έλεγχο της καρδιάς. Εναλλακτικά, μπορούμε να κόψουμε με κατεύθυνση προς τα βράγχια τα σημεία που συγκρατείται το κοιλιακό τοίχωμα για να αποκαλύψουμε τη καρδιά. Η καρδιά ελέγχεται για τυχόν αλλοιώσεις.

Τέλος εργαστηρίου.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ Νο 2 ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΟΣ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΨΑΡΙΩΝ

Υλικό: Τσιπούρες και λαβράκια έως και 2 ώρες από το θάνατό τους, διατηρημένα σε πάγο.

Διαδικασία: Το ψάρι τοποθετείται στο πλάι πάνω στο δίσκο ανατομίας. Ελέγχεται και από τις δύο πλευρές του για τυχόν αλλοιώσεις, τραυματισμούς και εξωπαράσιτα στο δέρμα, στα μάτια, στο στόμα και τα πτερύγια.

Με τη βοήθεια μίας καλυπτρίδας, γδέρνουμε την επιφάνεια του σώματος (κατά προτίμηση σε σημείο με αλλοιώσεις) και τοποθετούμε το υλικό μαζί με μία σταγόνα νερό πάνω σε αντικειμενοφόρο. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για πτερύγια με αλλοιώσεις, μόνο που εδώ μπορούμε να κόψουμε και κομμάτι. Εάν δικαιολογείται χρώση τότε το δείγμα μονιμοποιείται όπως περιγράφεται παρακάτω.

Ανασηκώνονται τα βραγχιακά επικαλύμματα και ελέγχονται τα βράγχια ως προς το χρωματισμό τους, εστίες αποχρωματισμού, αλλοιώσεις και ύπαρξη ορατών παρασίτων.

Χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα λαβίδα και ψαλίδι, κόβουμε ένα κομμάτι βραγχίων (εάν υπάρχουν αλλοιώσεις ή παράσιτα κατά προτίμηση αυτά τα κομμάτια) και το τοποθετούμε σε δύο αντικειμενοφόρους (δεν χρειάζεται η τοποθέτηση μεγάλων κομματιών γιατί θα μας δυσκολέψουν στη παρατήρηση).

Πάνω στη μία αντικειμενοφόρο τοποθετούμε μία σταγόνα αποστειρωμένου δ-τος 2% NaCl, καλύπτουμε με καλυπτρίδα και εφαρμόζουμε μικρή πίεση.

Στην άλλη αντικειμενοφόρο, αφού τοποθετήσουμε μία σταγόνα αποστειρωμένου δ-τος 2% NaCl, ομογενοποιούμε το υλικό, το απλώνουμε σε όλη την επιφάνεια της αντικειμενοφόρου με τη βοήθεια μιας καλυπτρίδας και την αφήνουμε να στεγνώσει στον αέρα. Μόλις στεγνώσει περνάμε την κάτω πλευρά της αντικειμενοφόρου 2-3 φορές πάνω από φλόγα για να μονιμοποιήσουμε το δείγμα.

Όση ώρα περιμένουμε να στεγνώσουν τα δείγματα που θα χρωσθούν, παρατηρούμε τα νωπά παρασκευάσματα στο μικροσκόπιο.

Χρώση δειγμάτων: Με την εφαρμογή μιας απλής χρώσης σε δείγματα ιστών μπορούμε να διαπιστώσουμε εάν τυχόν αλλοιώσεις οφείλονται σε κάποιο/α βακτήρια. Η χρώση που χρησιμοποιείται είναι η Gram. Η διαδικασία έχει ως εξής:

- α) Τοποθετείστε το διάλυμα ammonium oxalate-crystal violet στο μονιμοποιημένο δείγμα για 1min.
- β) Ξεπλύνετε με νερό.
- γ) Τοποθετείστε το διάλυμα iodine για 1min.
- δ) Αδειάστε το τελευταίο διάλυμα από την αντικειμενοφόρο.
- ε) Αποχρωματίστε το δείγμα με διάλυμα αιθανόλης/ακετόνης (95% / 5%) μέχρι να μην βγαίνει πια βιολέ/μπλε χρώμα.
- στ) Ξεπλύνετε καλά με νερό.
- ζ) Τοποθετείστε το διάλυμα safranin για 2min.

η) Ξεπλύνετε με νερό, στεγνώστε την αντικειμενοφόρο και παρατηρήστε το δείγμα στο μικροσκόπιο.

Τα Gram αρνητικά βακτήρια φαίνονται κόκκινα/ροζ και τα Gram θετικά βακτήρια μπλε/μωβ.

Τέλος εργαστηρίου.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ Νο 3 ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Υλικό: Τσιπούρες και λαβράκια έως και 2 ώρες από το θάνατό τους, διατηρημένα σε πάγο.

Διαδικασία: Το ψάρι τοποθετείται στο πλάι πάνω στο δίσκο ανατομίας. Ελέγχεται και από τις δύο πλευρές του για τυχόν αλλοιώσεις, τραυματισμούς και εξωπαράσιτα στο δέρμα, στα μάτια, στο στόμα και τα πτερύγια.

Το ψάρι συγκρατείται ανάσκελα με το κεφάλι του μακριά από εμάς και βρέχεται με αιθανόλη. Με ένα νυστέρι που έχει προηγουμένως απολυμανθεί (εμβάπτιση σε αιθανόλη και φλόγιση) γίνεται με προσοχή μία μικρή τομή 1cm προσθίως του πρωκτού. Το νυστέρι εξέρχεται και στη τομή εισέρχεται απολυμασμένο ψαλίδι. Εφαρμόζοντας στο ψαλίδι τάση προς τα επάνω ώστε να ανασηκώνεται το κοιλιακό τοίχωμα, αρχίζουμε να τέμνουμε με κατεύθυνση προς το κεφάλι και στη μέση γραμμή της κοιλιάς μέχρι τα οστά της βάσης των θωρακικών πτερυγίων. Το ψαλίδι εξέρχεται, απολυμαίνεται ξανά και αφού τοποθετηθεί εκ νέου στην αρχική τομή (το σώμα του ψαριού έχει τοποθετηθεί τώρα πλαγίως), τέμνουμε προς τη ράχη και μετά πλαγίως ακολουθώντας τα όρια της κοιλιακής κοιλότητας μέχρι να φτάσουμε στο πρόσθιο όριό της.

Παρατηρούμε τη γενική κατάσταση των σπλάγχων και (υγρό στη κοιλιακή κοιλότητα, πετέχειες, αιμορραγίες, αλλοιώσεις) και με μία απολυμασμένη λαβίδα ανασηκώνουμε τμήμα του εντέρου και με απολυμασμένο ψαλίδι κόβουμε ένα κομμάτι 10cm. Ανοίγουμε το έντερο κατά μήκος.

Τοποθετούμε μικρό δείγμα από το περιεχόμενο του εντέρου σε μία αντικειμενοφόρο μαζί με μία σταγόνα νερού και κατόπιν τοποθετούμε μία καλυπτρίδα.

Ξεπλένουμε με νερό το περιεχόμενο και με μία καλυπτρίδα γδέρνουμε το επιθήλιο και το δείγμα μεταφέρεται μαζί με μία σταγόνα νερό πάνω σε μία αντικειμενοφόρο και καλύπτεται με τη καλυπτρίδα.

Τα δείγματα ελέγχονται στο μικροσκόπιο για την ύπαρξη τυχόν παρασίτων.

Τέλος εργαστηρίου.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ Νο 4 ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΨΑΡΙΩΝ

Υλικό: Τσιπούρες και λαβράκια έως και 2 ώρες από το θάνατό τους, διατηρημένα σε πάγο.

Διαδικασία: Το ψάρι τοποθετείται στο πλάι πάνω στο δίσκο ανατομίας. Ελέγχεται και από τις δύο πλευρές του για τυχόν αλλοιώσεις, τραυματισμούς και εξωπαράσιτα στο δέρμα, στα μάτια, στο στόμα και τα πτερύγια.

Το ψάρι συγκρατείται ανάσκελα με το κεφάλι του μακριά από εμάς και βρέχεται με αιθανόλη. Με ένα νυστέρι που έχει προηγουμένως απολυμανθεί (εμβάπτιση σε αιθανόλη και φλόγιση) γίνεται με προσοχή μία μικρή τομή 1cm προσθίως του πρωκτού. Το νυστέρι εξέρχεται και στη τομή εισέρχεται απολυμασμένο ψαλίδι. Εφαρμόζοντας στο ψαλίδι τάση προς τα επάνω ώστε να ανασηκώνεται το κοιλιακό τοίχωμα, αρχίζουμε να τέμνουμε με κατεύθυνση προς το κεφάλι και στη μέση γραμμή της κοιλιάς μέχρι τα οστά της βάσης των θωρακικών πτερυγίων. Το ψαλίδι εξέρχεται, απολυμαίνεται ξανά και αφού τοποθετηθεί εκ νέου στην αρχική τομή (το σώμα του ψαριού έχει τοποθετηθεί τώρα πλαγίως), τέμνουμε προς τη ράχη και μετά πλαγίως ακολουθώντας τα όρια της κοιλιακής κοιλότητας μέχρι να φτάσουμε στο πρόσθιο όριο της.

Το ψαλίδι τοποθετείται πάλι στο οινόπνευμα και με μία απολυμασμένη λαβίδα ανασηκώνουμε το κοιλιακό τοίχωμα που έχουμε κόψει, το «ανοίγουμε» και το συγκρατούμε πάνω στον ανατομικό δίσκο.

Παρατηρούμε τη γενική κατάσταση των σπλάγγων και (υγρό στη κοιλιακή κοιλότητα, πετέχειες, αιμορραγίες, αλλοιώσεις) προβαίνουμε στη λήψη υλικού για μικροβιολογικό έλεγχο.

Έχουμε μπροστά μας ένα πετρί με υλικό καλλιέργειας βακτηρίων γυρισμένο ανάποδα (στη περίπτωση μας Tryptone Soya Agar – TSA – με 2%NaCl), χωρισμένο με μαρκαδόρο σε τρία τμήματα που έχουν διαφορετικά γράμματα το καθένα (S για σπλήνα, L για ήπαρ και K για νεφρό), ένα βακτηριολογικό κρίκο και φλόγιστρο.

Πυρώνουμε τον κρίκο μέχρι να γίνει κόκκινος, αφήνουμε να κρυώσει λίγο και κατόπιν τον βάζουμε μέσα στη σπλήνα. Τον στρίβουμε για να πάρουμε υλικό, τον βγάζουμε από το σπλήνα, ανοίγουμε το πετρί, ενοφθαλμίζουμε στη κατάλληλη περιοχή και κλείνουμε το πετρί. Ξαναπυρώνουμε τον κρίκο και τον αφήνουμε να κρυώσει.

Προσοχή: δεν δουλεύουμε σε ρεύματα αέρα, δεν αναπνέουμε μέσα στο πετρί και όλες οι εργασίες γίνονται κοντά στο φλόγιστρο.

Πυρώνουμε τον κρίκο και με την ίδια διαδικασία παίρνουμε υλικό από το συκώτι και ενοφθαλμίζουμε στη σχετική περιοχή του πετρί. Ξαναπυρώνουμε τον κρίκο και τον αφήνουμε να κρυώσει.

Με τη λαβίδα ανασηκώνουμε τα έντερα και τα βγάζουμε έξω από τη κοιλιακή κοιλότητα. Ελέγχουμε τη κατάσταση της νηκτικής κύστης που βρίσκεται ραχιαία στη κοιλιακή κοιλότητα και κατόπιν την αφαιρούμε με προσοχή για να αποκαλύψουμε το νεφρό ο οποίος είναι κολλημένος πάνω στη κάτω πλευρά της σπονδυλικής στήλης.

Ελέγχουμε το νεφρό για τυχόν αλλοιώσεις.

Πυρώνουμε τον κρίκο μέχρι να γίνει κόκκινος, αφήνουμε να κρυώσει λίγο και κατόπιν τον βάζουμε μέσα στο πρόσθιο τμήμα του νεφρού (το τμήμα που βρίσκεται προς το κεφάλι). Τον στρίβουμε για να πάρουμε υλικό, τον βγάζουμε από τον νεφρό, ανοίγουμε το πετρί, ενοφθαλμίζουμε στη κατάλληλη περιοχή και κλείνουμε το πετρί. Ξαναπυρώνουμε τον κρίκο και τον αφήνουμε να κρυώσει.

Τα πετρί τοποθετούνται για επώαση στους 18-22°C για 24-48h και κατόπιν αρχίζουν να ελέγχονται για ανάπτυξη μικροοργανισμών.

Τέλος εργαστηρίου.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ Νο 5 & Νο 6 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Με τα μέσα που διαθέτουμε στο εργαστήριο μπορούμε να κάνουμε ταυτοποίηση των βακτηρίων σε επίπεδο γένους και σπάνια σε επίπεδο είδους. Εν τούτοις πρέπει να γνωρίζουμε ότι η ταυτοποίηση είναι υποθετική γιατί στηρίζεται σε χαρακτηριστικά των βακτηρίων που είναι ασταθή και μεταβαλλόμενα ανάλογα με το υλικό καλλιέργειας, τις συνθήκες καλλιέργειας, τη παλαιότητα του απομονωμένου στελέχους, κ.λ.π.

Ρεαλιστική ταυτοποίηση γίνεται με τη χρήση ειδικών ανοσολογικών και μοριακών δεικτών και τεχνικές όπως ELISA και PCR.

Για τους σκοπούς της εκπαίδευσης των φοιτητών θα χρησιμοποιηθούν σε αυτό το εργαστήριο στελέχη βακτηρίων που γνωρίζουμε από πριν τι είναι. Το ένα είδος ανήκει στο γένος *Vibrio* και το άλλο στο γένος *Photobacterium* ενώ και τα δύο είδη είναι παθογόνοι μικροοργανισμοί για τα ψάρια.

Διαδικασία: Σε μία αντικειμενοφόρο τοποθετούμε μία σταγόνα αποστειρωμένου δ-τος 2% NaCl. Πυρνώνουμε τον μικροβιολογικό κρίκο και μόλις κρυώσει λίγο ανοίγουμε το πετρί με τη καλλιέργεια, βουτάμε το κρίκο σε ένα σημείο του θρεπτικού υλικού που δεν έχει βακτήρια για να πέσει η θερμοκρασία του και κατόπιν παίρνουμε ένα μικρό δείγμα από μία βακτηριακή αποικία.

Κλείνουμε το πετρί και τοποθετούμε το δείγμα στην αντικειμενοφόρο στη σταγόνα που έχουμε βάλει και ομογενοποιούμε. Με μία καλυπτρίδα εξαπλώνουμε το μίγμα σε όλη την επιφάνεια της αντικειμενοφόρου. Αφήνουμε να στεγνώσει το υλικό στον αέρα και κατόπιν το μονιμοποιούμε σε φλόγιστρο (πέρασμα της κάτω επιφάνειας της αντικειμενοφόρου 2-3 φορές πάνω από τη φλόγα).

Κατόπιν κάνουμε χρώση κατά Gram για να διαπιστώσουμε εάν πρόκειται για Gram (-) ή Gram (+) βακτήριο.

Χρώση Gram

α) Τοποθετείστε το διάλυμα ammonium oxalate-crystal violet στο μονιμοποιημένο δείγμα για 1min.

β) Ξεπλύνετε με νερό.

γ) Τοποθετείστε το διάλυμα iodine για 1min.

δ) Αδειάστε το τελευταίο διάλυμα από την αντικειμενοφόρο.

ε) Αποχρωματίστε το δείγμα με διάλυμα αιθανόλης/ακετόνης (95% / 5%) μέχρι να μην βγαίνει πια βιολέ/μπλε χρώμα.

στ) Ξεπλύνετε καλά με νερό.

ζ) Τοποθετείστε το διάλυμα safranin για 2min.

η) Ξεπλύνετε με νερό, στεγνώστε την αντικειμενοφόρο και παρατηρήστε το δείγμα στο μικροσκόπιο.

Τα Gram αρνητικά βακτήρια φαίνονται κόκκινα/ροζ και τα Gram θετικά βακτήρια μπλε/μωβ.

Επειδή τα δύο είδη βακτηρίων που ταυτοποιούμε είναι Gram (-), για να καταλήξουμε στο ποιο είναι *Vibrio* και πιο *Photobacterium* χρειάζονται επιπλέον οι παρακάτω δοκιμές:

A) Παραγωγή οξειδάσης

Για τη διενέργεια αυτής της δοκιμής υπάρχουν στο εμπόριο ειδικές εμποτισμένες χάρτινες ταινίες.

Διαδικασία: Διαλέγουμε μία αποικία από το πετρί χρησιμοποιώντας το σύρμα πλατίνας αφού προηγουμένως το έχουμε φλογίσει και αφήσει να κρυώσει. Απλώνουμε το υλικό από το μικροοργανισμό πάνω στο σημείο της χάρτινης ταινίας όπου γίνεται η αντίδραση. Η ανάπτυξη, μετά από λίγο, μπλε χρώματος στο σημείο που απλώθηκε ο μικροοργανισμός υποδηλώνει τη παραγωγή οξειδάσης.

B) Κινητικότητα

Για τη διενέργεια αυτής της δοκιμής χρησιμοποιείται η μέθοδος της «εκκρεμούς» σταγόνας.

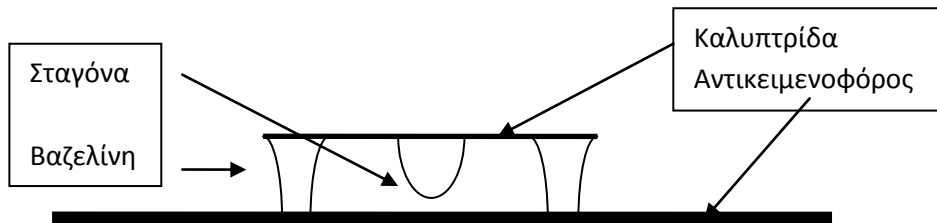
Διαδικασία: Για να είμαστε σίγουροι για τη κινητικότητα μη κινητών οργανισμών πρέπει να χρησιμοποιήσουμε βακτηριακά κύτταρα που έχουν μεγαλώσει σε υγρό υλικό καλλιέργειας. Σε αυτό το εργαστήριο θα ενοφθαλμίσουμε υγρό υλικό καλλιέργειας (στη περίπτωση μας διάλυμα εγκεφάλου-καρδιάς –BHIB- με 2%NaCl) και η κινητικότητα θα ελεγχθεί στο επόμενο εργαστήριο.

Φλογίζουμε το βακτηριολογικό κρίκο, αφήνουμε να κρυώσει, βουτάμε σε κάποιο σημείο του πετρί που δεν έχει βακτηριακή ανάπτυξη και κατόπιν παίρνουμε δείγμα από μία αποικία.

Κλείνουμε το πετρί και ενοφθαλμίζουμε το δείγμα στο υγρό υλικό καλλιέργειας. Επιάζουμε στους 18-22°C και μετά από 24-48h ελέγχουμε την ανάπτυξη (έκδηλη από τη θόλωση του υλικού καλλιέργειας).

Η κινητικότητα ελέγχεται ως εξής:

Σε μία καλυπτρίδα τοποθετείται στο κέντρο της μία σταγόνα από το καλλιέργεια στο υγρό μέσο καλλιέργειας (που λαμβάνεται με αποστειρωμένη πιπέτα ή βελόνα). Στις 4 γωνίες της καλυπτρίδας τοποθετείται από σωληνάριο βαζελίνη. Πάνω στις 4 «κολόνες» βαζελίνης τοποθετείται μία αντικειμενοφόρος προσέχοντας να μην αγγίζει τη σταγόνα. Με μία ήπια κίνηση, η αντικειμενοφόρος με τη προσκολλημένη καλυπτρίδα αναποδογυρίζονται καταλήγοντας στην ακόλουθη διάταξη:



Τοποθετούμε κατόπιν την αντικειμενοφόρο στο μικροσκόπιο και εστιάζουμε πρώτα με χαμηλή μεγέθυνση στη κορυφή της σταγόνας. Κατόπιν μεγαλώνουμε τη μεγέθυνση στα 40X και παρατηρούμε τη κινητικότητα.

Προσοχή: δεν πρέπει να συγχέουμε το «τρέμουλο» που παρατηρούμε των βακτηριακών κυττάρων που οφείλεται στην κατά Brown κίνηση των ατόμων που χτυπούν τα βακτηριακά κύτταρα από όλες τις πλευρές, με τη πραγματική κίνηση που διαπιστώνεται σε σχέση με άλλα βακτηριακά κύτταρα.

Γ) Αερόβια και αναερόβια χρήση γλυκόζης

Τα βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη γλυκόζη με αερόβιο, αναερόβιο ή και με τις δύο οδούς μεταβολισμού. Αυτή τους η ιδιότητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη ταυτοποίησή τους.

Διαδικασία: Τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι: αποστειρωμένοι γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες που περιέχουν το υλικό O/F και 2% NaCl, στείρο μεταλλικό έλαιο και μία καλλιέργεια σε πετρί.

Πυρώνουμε το σύρμα πλατίνας και το αφήνουμε να κρυώσει. Παίρνουμε δείγμα από τη καλλιέργεια στο πετρί και ενοφθαλμίζουμε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες στο κέντρο του υλικού και σε βάθος 2-3cm. Στην επιφάνεια του ενός από τους δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούμε μεταλλικό έλαιο ύψους περίπου 1cm. Επιάζουμε κατόπιν στους 18-22°C και ελέγχουμε για αλλαγή στο χρώμα του υλικού καλλιέργειας (το O/F υλικό περιέχει δείκτη του pH με συνέπεια όταν μεταβολισθεί η γλυκόζη και παραχθεί οξύ το χρώμα του υλικού από πράσινο να γίνεται κίτρινο).

Αποτελέσματα: Κίτρινο χρώμα και στους δύο σωλήνες = αναερόβια ζύμωση +
Κίτρινο χρώμα μόνο στο σωλήνα χωρίς το έλαιο = αερόβια ζύμωση +
Μπλε ή πράσινο χρώμα και στους δύο σωλήνες = καμία ζύμωση

Δ) Ευαισθησία στο αντιβιοτικό O/129

Τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Vibrio* είναι ευαίσθητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό και αυτό το χαρακτηριστικό τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις διαδικασίες ταυτοποίησης. Επειδή η διαδικασία αυτής της δοκιμής είναι η ίδια με αυτή του αντιβιογράμματος, αναφέρονται μαζί.

Τα υλικά που απαιτούνται είναι: πετρί με υλικό καλλιέργειας (συνήθως χρησιμοποιείται το υλικό Mueller-Hinton), γυάλινη ράβδος διαμορφωμένη σε σχήμα

μία καλλιέργεια σε υγρή μορφή και χάρτινα δισκία εμποτισμένα με αντιβιοτικό.

Διαδικασία: Με μία αποστειρωμένη πιπέτα ή σύριγγα τοποθετούνται 2-3 σταγόνες από την υγρή καλλιέργεια στο κέντρο του πετρί. Η γυάλινη ράβδος εμβαπτίζεται σε αιθανόλη και αναφλέγεται. Μόλις σβήσει η φλόγα και αφεθεί η ράβδος να κρυώσει για λίγο, την ακουμπάμε πάνω στην επιφάνεια του πετρί με το υλικό καλλιέργειας σε καθαρό σημείο για να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου.

Κατόπιν ακουμπάμε τη ράβδο πάνω στη σταγόνα από τη καλλιέργεια και με μία ήπια κυκλική κίνηση απλώνουμε τη καλλιέργεια πάνω σε όλη την επιφάνεια του πετρί.

Κλείνουμε το καπάκι του πετρί και αφήνουμε να στεγνώσει η υγρή καλλιέργεια.

Κατόπιν με μία αποστειρωμένη λαβίδα τοποθετούμε τα δισκία με το αντιβιοτικά σε διάφορα σημεία της επιφάνειας του πετρί σε ίσες αποστάσεις μεταξύ τους.

Τα πετρί τοποθετούνται για επώαση στους 18-22°C για 24-48h και ελέγχονται έκτοτε για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

Η ευαισθησία του μικροοργανισμού σε κάποιο αντιβιοτικό υποδεικνύεται από ζώνες γύρω από τα δισκία αντιβιοτικού όπου δεν έχουν αναπτυχθεί τα βακτήρια (καθαρές ζώνες).

Πίνακες ταυτοποίησης βακτηρίων

A) Διαφορική ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους μεταξύ βακτηρίων των γενών *Vibrio* και *Photobacterium*.

Δοκιμή / Βακτήριο	Χρώση Gram	Οξειδάση	Κινητικότητα	O/F γλυκόζης	O/129
Vibrio	+	+	+	F	S
Photobacterium	+	+	-	F	S

F: αναερόβια χρήση γλυκόζης, O: αερόβια χρήση γλυκόζης, S: ευαίσθητο, R: ανθεκτικό

Για να μπορέσουμε όμως να επιτύχουμε διαφορική ταυτοποίηση μεταξύ διαφορετικών ειδών *Vibrio* χρειάζονται επιπλέον δοκιμές. Οι δοκιμές αυτές περιλαμβάνουν:

- Τη παραγωγή γαλακτοσιδάσης
- Τη παραγωγή υδρολάσης της αργινίνης
- Τη παραγωγή της αποκαρβοξυλάσης της λυσίνης
- Τη παραγωγή της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης
- Την αποδόμηση κιτρικών
- Τη παραγωγή υδροθείου
- Τη παραγωγή ουρεάσης
- Τη παραγωγή της αμινάσης της τρυπτοφάνης
- Τη παραγωγή ινδόλης
- Τη δοκιμή Vogues-Proskauer
- Τη παραγωγή ζελατινάσης
- Το μεταβολισμό διάφορων σακχάρων, όπως:
 - Γλυκόζης
 - Μαννόζης
 - Ινοσιτόλης
 - Σορβιτόλης
 - Ραμνόζης
 - Σακχαρόζης
 - Μελιβιόζης
 - Αμύλου
 - Αραβινόζης

Όπως φαίνεται, οι δοκιμές αυτές περιλαμβάνουν τον έλεγχο για τη παραγωγή από το μικροοργανισμό διαφόρων ενζύμων που διασπών αμινοξέα, οργανικά μόρια, τη παραγωγή ενώσεων και την ικανότητα μεταβολισμού διαφόρων σακχάρων.

Τα αντιδραστήρια για όλες αυτές τις δοκιμές, στο παρελθόν, παρασκευάζονταν στο εργαστήριο. Σήμερα υπάρχουν στο εμπόριο τυποποιημένες δοκιμές όπως το API20E, το API ZYM της εταιρίας Biomerieux ή αντίστοιχες δοκιμές από τη Microgen.

Ουσιαστικά, αυτές οι τυποποιημένες δοκιμές είναι πλαστικοποιημένες ταινίες που φέρουν μικρά σωληνάκια όπου στο καθένα υπάρχουν αφυδατωμένα τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για να γίνουν οι παραπάνω δοκιμές. Τα αφυδατωμένα αντιδραστήρια ενυδατώνονται όταν ενοφθαλμίζονται με ποσότητα βακτηριακών κυττάρων που βρίσκονται σε διάλυση σε φυσιολογικό ορό ή σε διάλυμα 2% NaCl (εάν πρόκειται για βακτήρια των γλυκών ή θαλάσσιων υδάτων, αντίστοιχα). Μετά από επώαση στη κατάλληλη θερμοκρασία για 24-48h τα αποτελέσματα ελέγχονται και καταγράφονται για να γίνει η διαφορική ταυτοποίηση.



B) Διαφορική ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους μεταξύ βακτηρίων των γενών *Vibrio* και με το *Photobacterium*.

Pathogen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>V. alginolyticus</i>	-	-	+	-	v	-	-	-	+	-	V	+	+	-	-	-	+	-	-	+
<i>V. harveyii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>V. ordalii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
<i>V. splendidus</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>V. vulnificus</i>	+	-	v	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>Photobacterium damsel subsp. piscicida</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+

1= b-galactosidase, 2= arginine dehydrolase, 3= lysine decarboxylase, 4= ornithine decarboxylase, 5= citrate utilization, 6= H₂S production, 7= urease production, 8= tryptophan deaminase, 9= indole production, 10= Vogues Proskauer reaction, 11= gelatine hydrolysis, 12= acid from glucose, 13= acid from mannitol, 14= acid from inositol, 15= acid from sorbitol, 16= acid from rhamnose, 17= acid from sucrose, 18= acid from melibiose, 19= acid from arabinose, 20= oxidase production.

+, - and v correspond to >80, >20 and 21-79% of positive results, respectively.

() indicates weakly positive results.

Τέλος εργαστηρίου.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ Νο 7 ΕΠΙΣΚΕΨΗ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΒΟΣΤΑΝΕΙΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ

Θεωρητικό υπόβαθρο ιστολογίας

Η ειδική διερεύνηση των βλαβών που προκαλούνται στους ιστούς από διάφορους μολυσματικούς παράγοντες (ιοί, βακτήρια και παράσιτα) απαιτεί τη μονιμοποίηση των ιστών σε ένα πρώτο στάδιο, την αφυδάτωσή τους, τον εμποτισμό τους με μονιμοποιητικό μέσο, τη παραγωγή λεπτών τομών, τη χρώση τους και τον έλεγχο τους στο μικροσκόπιο.

Πρόκειται για μία χρονοβόρα διαδικασία αλλά μερικές φορές αποτελεί το μόνο μέσο που έχει στη διάθεσή του ο ιχθυοπαθολόγος για να κάνει μια πιο εξειδικευμένη διερεύνηση μιας παθολογίας (ιδιαίτερα όταν δεν είναι εύκολο να απομονωθεί και καλλιεργηθεί ο μολυσματικός παράγοντας, π.χ. κάποιος ιός).

Η προετοιμασία δειγμάτων ιστών για τη δημιουργία ιστολογικών παρασκευασμάτων διέπεται από μερικές γενικές αρχές που κατά κύριο λόγο έχουν να κάνουν με τη ποιότητα των δειγμάτων ιστών που λαμβάνονται.

Έτσι, το δείγμα των ιστών θα πρέπει να προέρχεται από ψάρια τα οποία είτε θυσιάστηκαν για να ληφθούν αυτά τα δείγματα, είτε έχουν πρόσφατα πεθάνει (λιγότερο από μία ώρα) και έχουν διατηρηθεί υπό ψύξη. Αυτό είναι αναγκαίο γιατί μετά το θάνατο ξεκινούν σχεδόν αμέσως αυτολυτικά φαινόμενα στους ιστούς που θα μπορούσαν να προκαλέσουν σύγχυση κατά τον μικροσκοπικό έλεγχο γιατί ο παθολόγος δεν θα μπορεί να ξεχωρίσει ποιες από τις αλλοιώσεις που παρατηρούνται στους ιστούς οφείλονται στην ασθένεια του ζώου ή σε κάποιο αυτολυτικό φαινόμενο. Τα δείγματα ή τα ψάρια δεν μπορούν να διατηρηθούν στη κατάψυξη γιατί η δημιουργία κρυστάλλων νερού μέσα στα κύτταρα θα είχε ως συνέπεια λόγω διόγκωσης των κυττάρων τη ρήξη τους και τη πρόκληση και πάλι σύγχυσης κατά το μικροσκοπικό έλεγχο.

Τηρουμένων των παραπάνω, μικρά κομμάτια από τους ιστούς που πρόκειται να γίνουν ιστολογικά παρασκευάσματα μεγέθους 0,5-1cm³ τέμνονται και τοποθετούνται σε μονιμοποιητικό υγρό (φορμόλη ή εξισορροπημένη φορμόλη χρησιμοποιείται εδώ και αιώνες) για λίγες ημέρες-εβδομάδα σε θερμοκρασία δωματίου μακριά από την απευθείας επίδραση του ηλιακού φωτός.

Τα δείγματα κατόπιν σταδιακά αφυδατώνονται μετά από εμβάπτιση σε διαλύματα αιθανόλης με αύξουσα συγκέντρωση.

Κατόπιν, τα δείγματα εμβαπτίζονται σε υγροποιημένη παραφίνη σε υψηλή θερμοκρασία, εμποτίζονται και η παραφίνη αφήνεται να κρυσώσει και να στερεοποιηθεί.

Σε συσκευές μικροτόμου κόβονται λεπτές τομές πάχους περίπου 0,5μm οι οποίες τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους. Η αντικειμενοφόρος θερμαίνεται και πάλι για να υγροποιηθεί η παραφίνη και κατόπιν ακολουθεί ενυδάτωση των τομών μετά από εμβάπτιση σε διαλύματα αιθανόλης με φθίνουσα συγκέντρωση.

Τελικά οι ιστολογικές τομές χρώζονται και κατόπιν παρατηρούνται στο μικροσκόπιο.

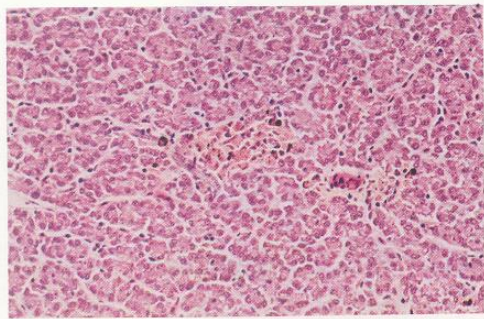
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ Νο 8 ΕΛΕΓΧΟΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ ΨΑΡΙΩΝ

Σκοπός αυτού του εργαστηρίου είναι η εξοικείωση των φοιτητών με ιστολογικά παρασκευάσματα από όργανα ψαριών, η απόκτηση εμπειρίας στην αναγνώρισή τους και η εξοικείωση με την εικόνα που εμφανίζουν τα παθολογικά ιστολογικά δείγματα και οι παθολογικές αλλοιώσεις στους ιστούς.

Για την επίτευξη των παραπάνω οι φοιτητές θα εκπαιδευτούν αρχικά με φωτογραφίες ιστολογικών δειγμάτων σε ηλεκτρονική μορφή και κατόπιν με αυθεντικές χρωσμένες ιστολογικές τομές στο μικροσκόπιο.

Παρακάτω δίδονται κάποια παραδείγματα ιστολογικών παρασκευασμάτων από όργανα ψαριών.

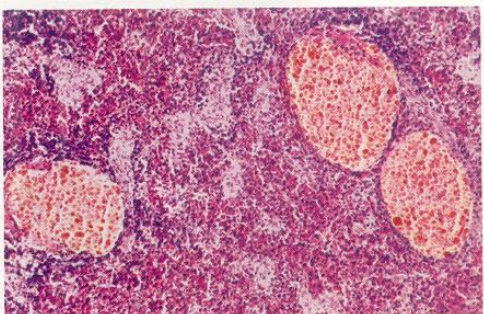
Το ήπαρ



(c) Liver of rainbow trout showing cords of hepatic cells and a central focus of ceroid-containing macrophages.
H+E × 114

Προσέξτε τη διαρρύθμιση των ηπατοκυττάρων σε στήλες. Σε πολλά ιστολογικά παρασκευάσματα θα παρατηρείται ηπατοκύτταρα διογκωμένα με το κυτταρόπλασμα του κυττάρου και το πυρήνα να είναι στη περιφέρεια του κυττάρου και το υπόλοιπο να είναι κενό. Ο κενός αυτός χώρος δεν είναι τίποτε άλλο από λίπος που ήταν αποθηκευμένο και λόγω της διαδικασίας προετοιμασίας των δειγμάτων απομακρύνθηκε. Μέτριος αριθμός τέτοιων κυττάρων στο δείγμα δεικνύει λιπώδη διήθηση ενώ μεγάλος αριθμός λιπώδη εκφύλιση του ήπατος.

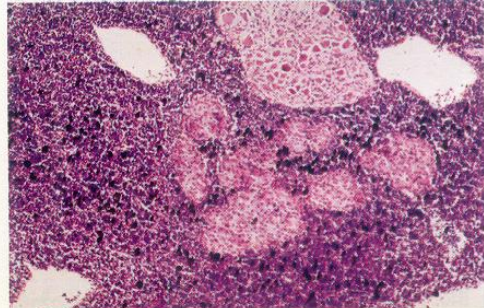
Ο σπλήν



(d) Melanomacrophage centres in white pulp of turbot spleen. The golden centres have a collar of lymphoid cells and there are several pale-staining ellipsoids in section.
H+E × 190

Ο σπλήν είναι ένα όργανο που εμπλέκεται σε ανοσολογικές αντιδράσεις. Έχει πολλά στοιχεία του αιμοποιητικού, όπως ερυθρά και λευκά αιμοσφαίρια και λεμφοκύτταρα και εμφανίζεται σαν ένα έντονο κόκκινο χρωσμένο όργανο όπου σχετικά λίγη οργάνωση εμφανίζεται εκτός από τη περιφέρεια του οργάνου που είναι πιο έντονα χρωσμένη από ότι το κέντρο του.

Ο νεφρός

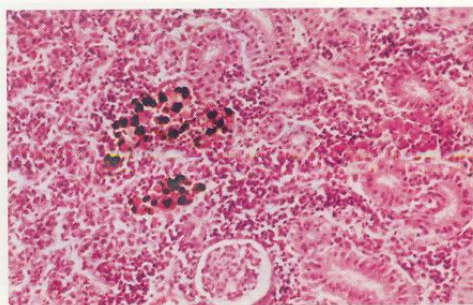


(f) Section of anterior kidney of rainbow trout showing strands of pale-staining adrenal cortex cells and the single nodule of neurosecretory neurones forming the adrenal medulla. The stroma of haemopoietic tissue is also well endowed with individual dark brown melanomacrophage cells. H+E × 114

Ο νεφρός στα ψάρια έχει πολλαπλές λειτουργίες οι οποίες φαίνονται σαφώς και στα ιστολογικά δείγματα. Οι λειτουργίες του νεφρού είναι αιμοποιητικές, ανοσολογικές και ουροποιητικές. Έτσι, ο πρόσθιος νεφρός των ψαριών είναι αποκλειστικά αιμοποιητικός και περιέχει ερυθρά, λευκά αιμοσφαίρια και λεμφοκύτταρα και κάποιος παθολόγος στα πρώιμα στάδια απόκτησης εμπειρίας μπορεί να τον μπερδέψει με τον σπλήνα. Εάν όμως παρατηρήσουμε το όργανο σε μικρή μεγέθυνση θα δούμε ότι δεν εμφανίζει την οργάνωση σε ερυθρό και λευκό πολφό που εμφανίζει ο σπλήνας.

Ο μέσος νεφρός ξεχωρίζει πολύ καλά γιατί η λειτουργία του είναι μικτή, δηλαδή και αιμοποιητικός και ουροποιητικός με συνέπεια ανάμεσα στον αιμοποιητικό ιστό να βρίσκονται και ουροφόρα σωληνάρια.

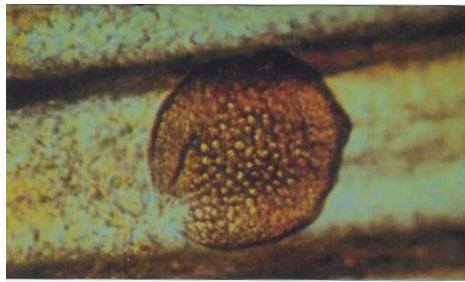
Ο οπίσθιος νεφρός είναι καθαρά ουροποιητικός με τα ουροφόρα σωληνάρια να μονοπωλούν το όργανο.



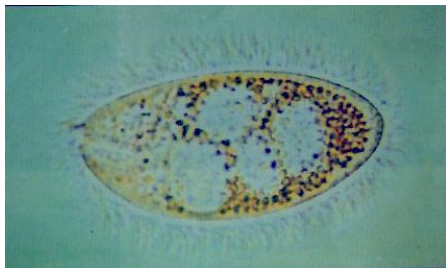
(b) Kidney of plaice showing golden and dark brown melanomacrophage centres, a glomerulus and renal tubules in a stroma of haemopoietic tissue. H+E × 114

ΕΙΚΟΝΕΣ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ

Εικ. 25. *Oodinium* spp.



Εικ. 27. *Cryptobia* sp σε
βράγχια (νωπό ξέσμα).



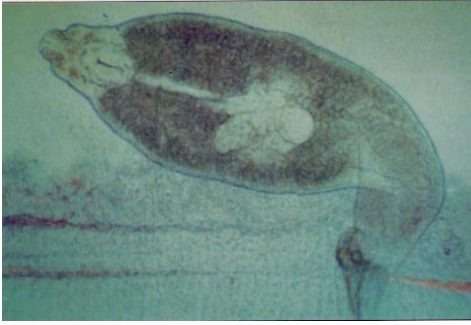
Εικ. 28. *Cryptocaryon*
sp. σε βράγχια



Εικ. 29. *Microcotyle* sp. από
βράγχια.



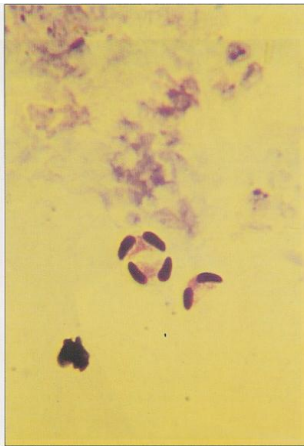
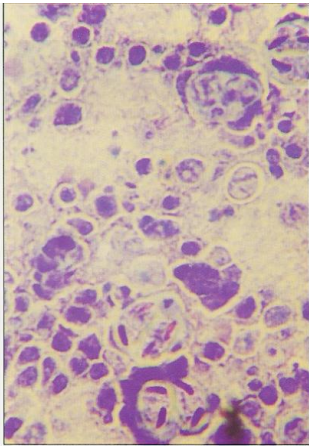
Εικ. 30. *Diplectanum* sp. από
βράγχια.



Εικ. 31. *Lamellodiscus* sp. από βράγχια
– Νωπό παρασκεύασμα.



Εικ. 33. *Anilocra physodes*.



Εικ. 39. Διάφορα στάδια του
Myxidium leei.



Εικ. 41.
Henneguya
sp. Νωπό
παρασκεύασμα, Phase
contrast.