

Mikroskopi-vejledning

Procedure for undersøgelse af fisk

Brug så vidt mulig **kun levende fisk**, gerne de der ser ud til at være mest påvirket (sorte i kanten eller fisk på risten).

Aflivning bør foregå umiddelbart før undersøgelsen.

Først tildeles fisken et slag i hovedet (bedøver fisken) hvorefter fisken aflives ved at:

1. Skære hovedet delvist over så nakkehvivlerne bliver skåret over
2. Stikke en sylspids genstand gennem kraniet ind i hjernen, røre rundt, fortsætte ind bag hovedet til hvirvelsøjlen samtidig med der røres rundt

Begge metoder kapper nerveforbindelserne til kroppen. Fordelen ved brug af metode 2 er et noget mindre blodbad.

Hud.

1. Med kniv skræbes slim og skæl fra kroppens sider, finner og hvor finner tilhæfter.
2. Skrabet placeres på objektglas.
3. Læg et dækglas over og tryk let så skrabet spredes.
 - a. Mange hud- og gælleparasitter kan ses ved en forstørrelse på 100 x, men de mindste flagellater kan først med sikkerhed skelnes ved 400 x.
 - b. Store hudparasitter (ca. >200µm) kan ses ved forstørrelsen 40 x, middelstore ved 100 x, mens de mindste flagellater (5-10µm) først med sikkerhed kan skelnes ved 400 x.

Gæller.

1. Klip én eller flere gællebuer ud. Hos meget små fisk kan hele gælleblokken trækkes ud med pincet.
2. Gællen placeres på objektglas
3. Der tilsættes et par dråber vand (bør være så rent vand som muligt)
4. Gælle-lamellerne spredes ved at presse dækglasset ned over.
 - a. Da det ofte er vanskeligt at have plads til både gællebue og dækglas, kan man undlade dækglas, eller undlade gællebuen ved at skære en række gællelameller af som så undersøges.
 - b. Store gælleparasitter (>100µm) kan ses ved forstørrelsen 40 x, middelstore ved 100 x, mens de mindste flagellater (5-10µm) først med sikkerhed kan skelnes ved 400 x.

- c. 5. Der skræbes slim fra gælleoverfladen (anvend den anden side af fisken). Slimen lægges på objektglasset, dækkes med dækglas og undersøges som hudskrabet.

Blod.

Her er det vigtigt at bruge rene redskaber så præparatet ikke forurenes med bakterier udefra.

1. *Små fisk*: Skær halen af efter gattet med skarp skalpel/ kniv og hold fiskens hoved opad mens fisken presses let så blodet kommer frem.
Store fisk: Da det kan være vanskeligt at skære/klippe en tyk hale over, kan fisken sprættes op så blod tages fra milt eller hjertehule.
2. Placer kun en lille dråbe blod på objektglasset. Der behøves kun meget lidt blod. Vand må *ikke* tilsættes blod, da blodcellerne vil sprænge.
3. Læg dækglas over. Undgå at fange bobler.
4. Bakterier skal ses ved mindst 400 x. Det kan være en fordel at bruge fasekontrast.

Tarm

1. Træk tarmen ud i fuld længde.
2. Klip tyndtarmen over lige efter mavesækken og pres tarmindehold ud på objektglasset med en skalpel.
3. Læg dækglas over.
4. Tarmsnyltare ses ved 40-100 x.

Andet der er værd at tage med i undersøgelsen

Tag syge fisk op og tjek hud, gæller, øjne og skær fisk op så indre organer kan undersøges.

Ved en undersøgelse af fisk finder man ofte flere sygdomsorganismer og sygdomsbilleder samtidig, f.eks.:

- Parasitter + Bakterier
- Svamp + Bakterier
- Mekaniske gælleskader + Forøget slim + Bakterier

Spørgsmålet er hvad der kom først? Hvad er den primære årsag til fiskens tilstand? Hvad skal man behandle mod først (prioriteres højest)?

Bakterier kommer sandsynligvis ofte ind i fisken via sår, skader efter svamp eller hudparasitter (f.eks. gyrodactylus), gælleskader efter behandling med blåsten eller kloramin (kan "svitse" gællerne ved for høje doser), over tarmen i forbindelse med problemer med hexamita. Dvs. hvis årsagen til bakteriernes passage ikke fjernes kommer der sandsynligvis i løbet af kort tid endnu et bakterieangreb.

Diagnosticering kan være vanskelig i tilfælde efter at en behandling er sat igang. F.eks. hvis formalin er tilsat om formiddagen så kan man godt glemme alt om at finde parasitter på hud og gæller om eftermiddagen.

Ved mistanke om sygdom relateret til vand- eller foderkvalitet kan en undersøgelse af vandet eller foder også være nødvendig.

Det er vigtigt at danne sig et billede af sygdomsudviklingen:

- Hvor stort er problemet?
- Hvor mange fisk dør?
- Dør fiskene over kort tid eller forholdsvis lang tid?
- Kan sygdommen sprede sig i anlægget?
- Har fiskene været udsat for ændringer i miljøet på det sidste?

Ved at tænke over fiskeart og alder, årstid, temperatur, salinitet, vandkvalitet m.m. kan årsagen til sygdommens opståen oftest afgrænses.

Hvilke sygdomsorganismer kan ses?

Mange fiskeopdrættere er i stand til, alene på fiskens adfærd, at se hvad fiskene fejler, f.eks. hvis ørreder springer meget i en dam skyldes det sandsynligvis fiskedråber, eller de svømmer sløvt rundt med udstående øjne og har blødninger kan det skyldes bakterie- eller virusangreb. I de fleste tilfælde vil det dog også være rart at se den eventuelle sygdomsorganisme med det blotte øje inden en behandling sættes igang. Til dette arbejde er mikroskopet et uundværligt redskab.

De færreste sygdomsorganismer er så store at de kan ses med det blotte øje, dog er fiskeigle og skimmelsvamp relativt let at få øje på, og fiskedråber og gyrodactylus kan ses hvis man kikker godt efter. Langt de fleste organismer er så små at der skal bruges mikroskop for at bestemme dem, eller kun kan bestemmes ved mere avancerede laboratoriemetoder.

Som hovedregel kan hud-, gælle- og tarmparasitter relativt let bestemmes vha. mikroskop ud fra deres form, størrelse og bevægelsesmønstre, mens det kræver noget mere træning i brugen af mikroskop for at se de noget mindre bakterier. Dog vil man ofte kunne bestemme bakterierne så langt, at det kan indkredses hvilket antibiotika der skal anvendes, men det kræver mere avancerede laborieteknikker, hvis bakterien skal bestemmes til slægt/art. Virus kan slet ikke ses med et almindeligt lysmikroskop, pga. den meget lille størrelse.

Hvad er vigtigt at observere?

Når man leder efter sygdomsorganismer er det vigtigt at vide hvordan et normalbillede af sit præparat ser ud i mikroskopet, så man kan koncentrere sig om at kikke efter det unormale.

Et normalt billede i et præparat fra et skrap fra **fiskens hud** viser skæl, hudceller og slim. I et **gællepræparat** ser man normalt gællebuer, primære- og sekundære lameller, slim og ofte blod. Skrab af **tarmindehold** viser normalt slim med grøn galdesaft, store mørke kantede foderpartikler og bakterier. I en normal **blodprøve** vil der være mange tallerkenformede røde blodlegemer og få asymmetriske hvide blodlegemer.

Da mange sygdomsorganismer er bevægelige og bevæger sig på en let genkendelig måde, er det meget vigtigt at kikke efter de ”punkter” som bevæger i sit præparatet. Man skal lære at skelne mellem de enkelte ”punkter” der bevæger sig og de strømninger som ofte opstår ved at dækglasset presser præparatet ned, især når der er blod og tarmindehold under mikroskop.

De fleste sygdomsorganismer har en karakteristisk form evt. med vedhæng som fimrehår, flageller, kroge o. lign., som er vigtig at lægge mærke til. Da de forskellige sygdomsorganismer har forskellig størrelse bliver man med tiden også god til at bruge denne information til at skelne organismerne.

Når man undersøger en fisk for sygdom vha. mikroskop vil man ofte opdage at fisken er angrebet af flere forskellige sygdomsorganismer på samme tid, f.eks. tarmsnylter og YDS. Da én sygdom ofte kan forårsage en anden sygdom, er det meget vigtigt at finde alle de forskellige organismer for at den rigtige behandling kan sættes igang. Derudover er det vigtigt at vurdere omfanget af problemet ud fra antallet og hvilken type sygdomsorganisme der er tale om. Alle sygdomme er ikke lige farlige for fisken.

Én- og flercellede dyr der er parasitter

Angriber typisk hud, gæller og tarm, men også kranie og galdeblære. Størrelsen af dyrene varierer meget, fra de éncellede dyr på få μm (f.eks. costia) til de flercellede dyr på flere cm (f.eks. igler).

Dette afsnit vil med fordel kunne suppleres med bogen:
Fiskeopdræt 1&2, Jon From, Ferskvandscentret.

Éncellede dyr (protozoer)

Her vil organismer indenfor flg. sygdomsfremkaldende grupper blive præsenteret:

- Flagellater
- Amøber

- Ciliater
- Sporedyr

Flagellater

Anses for at være de mest primitive encellede dyr.

Er forsynet med én eller flere pisketråde (flageller). Disse kan anvendes til bevægelse, men også ved fødeoptagelse.

- Costia

Forårsages af parasitten *Ichthyobodo necator* (*Costia necatrix*)

Almindelig hos ferskvandsfisk på hud, gæller og finner, hvor den lever af fiskens epitelceller.

Iagttagelse:

10-12µm lang og 4-6µm bred.

Forsynet med én kort fremadrettet og én lang bagudrettet flagel (ved 100 x forstørr. ses disse ikke).

Bevæger sig i langsomme spiralbevægelser. Hvis det er koldt er den ubevægelig og kan let forveksles med hud- og slimceller. Der kan gå op til et minut inden *Costia* kan ses i mikroskop da varmen gør den aktiv. Nogle livsstadier bevæger sig ikke men sidder fast på hudcellerne. Ligner da små kommaer.

- Tarmsnylter

Forårsages af *Spironucleus* (*Hexamita salmonis*, *Octomitus*).

Snylter i tarmen og sjældnere i galdeblæren og -gangene hos både fersk- og saltvandsfisk.

Parasitten findes især i den øverste del af tyndtarmen (lige efter mavesækken).

Iagttagelse:

På størrelse med *Costia*, dvs. 8-12µm lang og ca. 4µm bred.

I lysmikroskop ved 100 x forstørrelse genkendes snylteren ved, at den farer på må og få, da den bevæger sig hurtigt.

Amøber

Har ingen flageller eller cilier. Lever af bakterier, slim og afstødte celler.

- Gælleamøber

Parasitten blev i DK første gang erkendt i forbindelse med gælleproblemer lige efter årtusindskiftet. Siden da er amøber fundet på adskillige akvakulturanlæg, hvor de kan forårsage store problemer med gælletilslimning og -forandringer. Arten kendes endnu ikke.

Iagttagelse:

Er svære at erkende i lysmikroskop da parasitten ikke er særlig bevægelig og kan ligne tilfældige hudceller. Amøben indeholder ofte nogle små prikker (granula). Gællerne vil ofte være særdeles tilslimede og med forandringer (sammenvoksninger).

Ciliater

Ciliater er noget større end flagellater og er forsynet med fimrehår (cilier), der anvendes til bevægelse eller til fødefangst.

- *Trichodina*

Findes overalt i DK i både ørred- og åledambrug, samt i havbrug.

Omfatter adskillige arter, der snylter på hud og gæller hos fersk- og saltvandsfisk.

Iagttagelse:

Bestemmelse af snylteren til slægt og art er tidskrævende. Derfor plejer man i fiskeopdræt i DK at skelne mellem to typer. De som har en form som en :

- flad tallerken (lever på huden)

- dyb tallerken/klokkeformet (lever på gællerne, er mindre)

Trichodina er gullige, 30-100µm i diameter, har tre ciliekranse, og en ring af kroge med tandlignende fremspring.

Bevæger sig forholdsvist hurtigt omkring.

- *Chilodonella*

Findes på hud og gæller af ferskvandsfisk, hvor den lever af og beskadiger epitelceller.

Iagttagelse: Op til 70µm, oval, farveløs, bugsiden er flad med cilier ordnet i parallelle rækker.

Bevæger sig langsomt rundt.

- *Ambiphrya* (tidligere kendt som *Glossatella*) og *Epistylis*

Fæstner sig med en "fod" på gæller og hud, epistylis kun på ferskvandsfisk, men glossatella også på saltvandsfisk.

Iagttagelse: Op til 100µm lange, tragt- eller kræmmerhusformet med en flad "fod" som de hæfter sig fast til værten med.

Formen at foden er af betydning for bestemmelse af art/udviklingstrin.

I modsætning til *Glossatella* er *Epistylis* kolonidannende og sidder på en stilk, der er fasthæftet til fiskenes gæller eller hud. Kan også hæfte sig fast til fiskeæg.

Øverst er munden besat med en krans af cilier som bruges til at fange næringspartikler fra vandet.

- *Fiskedræber*

Også kaldet hvidpletsyge og forårsages af *Ichthyophthirius multifiliis*.

Angriber ørreder. I åledambrug ses udbrud i nyindkøbte glasål.

Forekommer kun i ferskvand.

Lever under epitelen i hud og sjældnere i gæller, hvor den udvikler og formerer sig. Sidder under epitelen hvor den roterer langsomt, hvorved næringsrige epitelkomponenter frigøres.

Iagttagelse: Er 0,2-1,0mm i diameter, brunlig/gullig og beklædt med cilier. Ofte ses en hesteskoformet struktur inde i cellen.

Eneste protozoo-parasit hos fisk, der kan ses med det blotte øje. Ses som små hvide pletter i huden eller gællerne.

Roterer langsomt.

Sporedyr

Mangler bevægelsesorganer.

De fleste er parasitter, der lever inde i værtens celler. Kan danne yderst modstandsdygtige sporer.

- Drejesyge

Forårsages af *Myxosoma cerebralis*.

Angriber yngel hos laksefisk, specielt regnbueørreder. Findes fortrinsvist i kraniet, bl.a. i buegangene som indeholder ligevægtsorganet.

- Myxidium

En gruppe som omfatter adskillige arter. Nogle snylter på fersk- og nogle på saltvandsfisk. *Myxidium girardi* angriber ålens hud og gæller og indre organer.

Iagttagelse: Små cyster på 1-1,5mm, der indeholder store mængder tenformede sporer, der er 9-15µm lange og 5-7µm bredde. De hvide pletter i huden ved *Myxidium* angreb kan skelnes fra de hvide pletter ved fiskedræber angreb ved, at pletterne i det første tilfælde er mere blanke og ikke så hvælvede.

Flercellede dyr (metazoer)

De almindeligste flercellede fiskeparasitter kommer fra flg. grupper:

ikter, bændelorme, rundorme, igler, krebsdyr. Kun en række ikter vil blive beskrevet her, da det ikke er nødvendigt at anvende mikroskop til at bestemme bændelorme, rundorme, igler eller krebsdyr (f.eks. lakselus).

Monogene ikter

- Gyrodactylus

Angriber laksefisk.

Kan forekomme i stort antal på hud og sjældnere gæller hos fersk- og saltvandsfisk. Lever af epitelceller og slim.

Iagttagelse: Er 0,3-1,2mm, har 16 marginale og 2 centrale kroge.

Føder levende unger. I mikroskopet kendes de på at de har fostre i sig og mangler øjenpletter.

- ***Dactylogyrus***

Kun hos ferskvandsfisk og næsten udelukkende på gæller. Mest almindelig på varmtvandsfisk.

Iagttagelse: Op til 2mm, har 14 marginale og 2 centrale kroge.

Lægger æg og har 4 øjenpletter.

- ***Pseudodactylogyrus***

P. anguillae (1-1,5mm lang) og *P. bini* (2 mm lang) angriber kun ål i både fersk- og saltvand. Sidder udelukkende på gællerne: *P. anguillae* tæt ved gællebuen og *P. bini* i marginale områder af gællerne. Her lever den af slim og epitelceller. Blod er også fundet i maveindholdet.

Iagttagelse: Har 14 marginale og 2 centrale kroge og øjenpletter.

Lægger æg.

Digene ikter

Kan let skelnes fra monogene ikter i mikroskop på grund af deres relativ simple ydre struktur, især ved manglen på et kompliceret fasthæftningsorgan, der er kun simple sugeskåle til stede. Ud over øjenikter findes andre ikter som har fisk som vært. Disse opholder sig bl.a. i mave-tarmkanal, underhud, gællernes primærlameller og nyrernes to urinkanaler.

- **Øjenikte**

Forårsages af *Diplostomum spathaceum*.

Parasit der borer sig ind i fisken og vandrer op til fiskens øje, hvor den i linsen formerer sig til en parasit på ca. 0,4mm. Ved infektion bliver fiskene blinde, således at de ikke kan indstille farven til omgivelserne.

Svampesygdomme

Svampe (fungi) er en stor gruppe af éncellede eller flercellede planter, der mangler klorofyl (grønkorn), der er nødvendig for fotosyntesen.

Størrelsen på svampe varierer meget, nogle er mikroskopiske, mens andre (især paddehatte) opnår en betydelig størrelse.

Svampenes celler danner næsten altid lange tråde (hyfer). Hele svampens hyfesystem kaldes mycelium. Selv de kompakte frugtlegemer (paddehatte) er opbygget af hyfer. Mange af de fiskepatogene svampe findes i klassen Oomycetes, som bl.a. omfatter *Saprolegnia* og *Aphanomyces astaci* (årsag til krebspest). En enkel inddeling er ikke-trådformede og trådformede. *Saprolegnia* tilhører de trådformede.

Dette afsnit vil med fordel kunne suppleres med bogen:
Fiskeopdræt 1&2, Jon From, Ferskvandscentret.

Skimmelsvamp

Forårsages af *Saprolegnia*.

Angriber døde æg og især gamle ørredhanner. Ål angribes i mindre omfang end ørreder.

Skimmel vokser kun på fiskens ydre, hovedsageligt på hud og gæller, og som regel i sår eller hvor slimen er beskadiget.

Findes i næsten alle ferskvandsmiljøer.

Bakterielle sygdomme

Bakterier kan inddeles i 3 hovedgrupper efter deres form:

- 1) Kuglebakterier (kokker), ofte 1µm i diameter.
- 2) Stavbakterier (baciller), ca. 0,5-10µm lange og op til 2µm brede.
- 3) Skruebakterier (spiriller), ca. 0,5-10µm lange og op til 2µm brede.

Kun stav- og kuglebakterier ses indenfor fiskesygdomme.

Nøjagtig bestemmelse af bakterier kræver speciallaboratorium, hvor man ved dyrkning på forskellige medier kan klassificere dem. Men ved at se på bakteriernes form og bevægelse i mikroskop kan man selv komme langt. De fleste bakterier der giver problemer i dansk akvakultur er stavformede bakterier. Hvis der ses kuglebakterier sammen med stavformede bakterier, vil kuglebakterierne oftest være sekundære bakterier, der ikke er den egentlige årsag til sygdomsudbruddet.

Dette afsnit vil med fordel kunne suppleres med bogen:
Fiskeopdræt 1&2, Jon From, Ferskvandscentret.

Bakterier i blodet

Yngelsyndrom (eller yngeldødelighedssyndrom, YDS)

Forårsages af *Flavobacterium psychrophilum*

Er i dag vidt udbredt i yngelopdræt af ørreder, og forårsager ofte stor dødelighed. Bakterien forårsager også vintersår hos større regnbueørreder, specialt i koldt vand.

Iagttagelse: Lang trådagtig ubevægelig stav, der passivt flyder med blodstrømmen under mikroskopet.

Rødmundsyge (ERM = enteric red mouth disease).

Forårsages af *Yersinia ruckeri*.

Hos ål, ørred (*Salmo trutta*), regnbueørred og andre laksefiskearter.

Sygdommen er udbredt i fersk- og saltvand.

Iagttagelse: En bevægelig stavbakterie der er kortere og tykkere end YDS-bakterien. Oftest er det kun enkelte bakterier der bevæger sig (spjætter rundt), men af og til er der ingen bevægelse at se, hvilket kan vanskeliggøre bestemmelsen vha. mikroskop. Bakterierne vil ofte kunne erkendes som 2 sammenhængende "cocktail-pølser".

Vibriose (saltvandssyge)

Forårsages af *Vibrio anguillarum*.

Er påvist i både havbrug (i DK især regnbueørred og pighvar) og åleopdræt. Den forekommer i salt- og brakvand, og kan ikke leve i ferskvand. I den kolde årstid hos laks i Norge forekommer koldtvandsvibriose, der er fremkaldt af *Vibrio salmonicida*.

Iagttagelse: En meget bevægelig stavformet bakterie.

Furunkulose (bylde-syge)

Forårsages af *Aeromonas salmonicida* (salmonicida = den der æder laksen).

Angriber først og fremmest laksefisk i opdræt og vildfisk.

Iagttagelse: Ubevægelig kort stav

Bakterier på gæller og hud

Bakteriel gællesyge

Forårsages blandt andet af forskellige arter af *Flavobacterium*.

Mest udbredt hos yngel der fodres kraftig og går tæt. Udløsende faktor kan være foderrester som sætter sig i fiskenes gæller.

Nogle gange ses den bakterielle gællesyge i mikroskopet som trådlignende fimrehår der stikker ud fra gælle overfladen. Disse kan betegnes som Myxobacter. Disse forårsager den tilstand som ofte kalde "gælle-svamp".

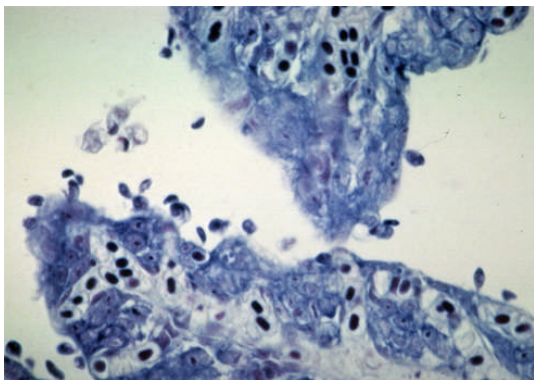
Iagttagelse: Tyk lag slim på gæller med ubevægelige stavbakterier, men ofte ses også store mængder kugleformede bakterier.

Myxobakterier erkendes som trådlignende fimrehår der sikker ud fra gælleoverfladen.

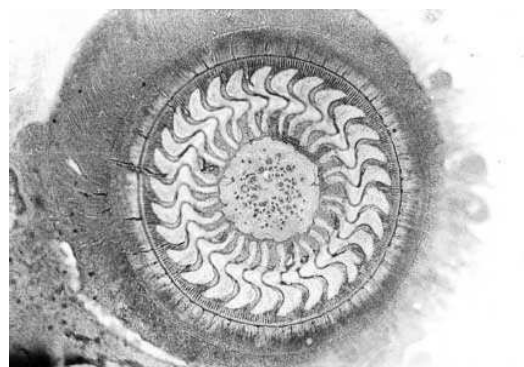
Typiske parasitter som kan ses med mikroskop

Skitserne viser ikke de naturlige størrelsesforhold, derfor er de omtrentlige størrelser også angivet på skrift (*Fiskeopdræt 1&2 af Jon From*)

Hud og Gæller



Costia



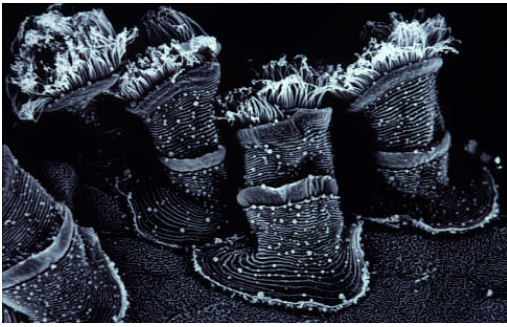
Trichodina



Chilodonella



Fiskedræber



Ambiphrya (Glossatella)

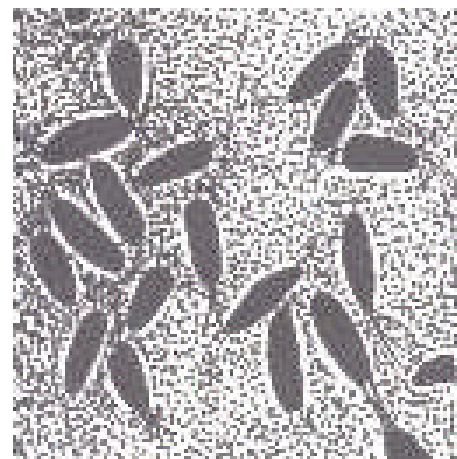


Epistylis

Tarm



Gyrodactylus



Spirotrichia (Hexamita)