Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Edice Metodik

ISBN 978-80-7514-099-9

Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Diagnostika jarních úhynů kaprů

V. Piačková, E. Zusková, H. Kocour Kroupová,
J. Máchová, T. Veselý, K. Matějíčková, Ľ. Pojezdal,
I. Papežíková, E. Syrová, M. Palíková

Edice Metodik 181

Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Diagnostika jarních úhynů kaprů

V. Piačková, E. Zusková, H. Kocour Kroupová, J. Máchová, T. Veselý, K. Matějíčková, Ľ. Pojezdal, I. Papežíková, E. Syrová, M. Palíková

Vodňany

EVROPSKÁ UNIE
Evropský námořní a rybářský fond
Operační program Rybářství

Vydání a tisk publikace byly uskutečněny v rámci Operačního programu Rybářství 2014–2020:
„Publikace III“ č. CZ.10.5.109/5.2/4.0/18_012/0000593

Obsahová část metodiky je výsledkem řešení výzkumných projektů:
MZe QK1710114 (50 %)

MŠMT PROFISH (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000869) (30 %)

MŠMT CENAKVA (LM2018099) (20 %)

Edice Metodik

č.181

ISBN 978-80-7514-099-9

OBSAH

1. CÍL METODIKY 7

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY 7

2.1. Úvod 7

2.2. Možné příčiny úhynu ryb 8

2.3. Diagnostické postupy pro zjištění příčin jarních úhynů kaprů v rybničních chovech 13

2.3.1. Anamnéza 13
2.3.2. Klinické vyšetření 13
2.3.3. Patologicko-anatomické vyšetření (pitva) 16
2.3.4. Histologické vyšetření 22
2.3.5. Virologické vyšetření 23
2.3.6. Bakteriologické vyšetření 27
2.3.7. Parazitologické vyšetření 31
2.3.8. Hematologické vyšetření 32
2.3.9. Biochemické vyšetření krevní plazmy 37
2.3.10. Hydrochemická analýza 42

2.4. Závěr 52

3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“ 52

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY 52

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY 52

6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY 53

7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE 58

1. CÍL METODIKY

Poskytnout veterinárním lékařům a chovatelům ryb přehled o pravděpodobných příčinách úhynů kaprů v jarních měsících a o možnostech jejich diagnostiky.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1. Úvod

Jarní období je pro ryby z hlediska zdravotního stavu velmi náročné. Mají za sebou několik měsíců komorování, kdy nepřijímaly potravu a jejich organizmus byl energeticky saturován pouze z tukových zásob, rozvoj přirozené potravy teprve začíná, a i příjem předkládané potravy je vzhledem k nízké teplotě vody zatím omezený. Velmi záleží na tom, v jakém výživném a zdravotním stavu byly ryby na podzim, v jakých podmínkách (rybnících) zimovaly a jaký byl teplotní průběh zimních měsíců. Zkušení chovatelé už mají vytipované rybníky, které jsou pro komorování nejvhodnější, a během celé vegetační sezóny se snaží pečovat o ryby tak, aby byly na jejím konci v co nejlepší kondici. Mnohdy však i přes veškerou snahu není už samotný start zimování pro ryby optimální. Mohou být oslabené v důsledku parazitární, bakteriální nebo virové infekce, kterou prodělaly na sklonku léta a na podzim. V posledních letech hraje v některých oblastech významnou roli i nedostatek vody v rybnících, s tím související kyslíkové deficity a celkové oslabení ryb. Ryba, jako poikilotermní organizmus, kopíruje svou tělesnou teplotou teplotu okolního prostředí (vody) a s tím souvisí i měnící se intenzita metabolizmu a aktivita imunitního systému. Při poklesu teploty pod 8–5 °C se kaprovité ryby ukládají do zimních loží, kde svým způsobem hibernují, a snižují tak své energetické nároky na minimum. Pokud během zimního období dochází k oteplení vody, poklesu koncentrace rozpuštěného kyslíku, zvýšení koncentrace oxidu uhličitého nebo amoniaku, pomnožení ektoparazitů, k útokům predátorů atd., ryby opouštějí svá zimní lože, což pro ně představuje nadbytečný energetický výdej. Jestliže tyto situace během zimy přetrvávají déle nebo se několikrát opakují, může se stát, že jarní období zastihne ryby ve výrazně zhoršeném kondičním stavu. Funkce imunitního systému je v důsledku stále ještě nízkých teplot vody a špatné kondice ryb zhoršená, takže jakýkoliv patogenní činitel se může uplatnit v plné šíři.

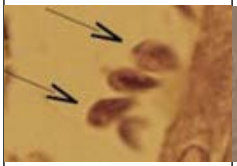
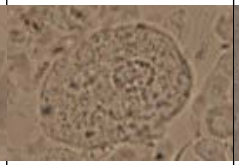
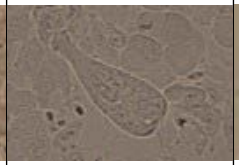
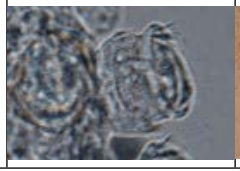
Zdravotní stav ryb by měl být sledován v průběhu celého roku. I v zimě, kdy rybníky bývají pokryté vrstvou ledu a sněhu, je nezbytná pravidelná kontrola, měření koncentrace kyslíku, zajištění odvětrávání oxidu uhličitého a dalších

plynů a také sledování chování ryb. Zvýšená aktivita ryb během zimy, pohyb u hladiny nebo shromažďování u přítoku jsou signálem, že něco není v pořádku.

2.2. Možné příčiny úhynu ryb

Často diagnostikovaným problémem v chovech ryb je **parazitární onemocnění**. Intenzita napadení a míra poškození závisí zejména na věku a kondici napadených ryb a teplotě vody. Značná část parazitárních onemocnění propuká v období intenzivnějšího oteplování vody – tedy v květnu až červnu, ale vzhledem ke klimatickým výkyvům posledních let není ojedinělý ani jejich výskyt v období časného jara. K rozvoji parazitárních, zejména protozoálních, infekcí v jarním období přispívá řada faktorů, jako jsou snížená činnost imunitního systému ryb po zimě, špatné zoohygienické podmínky a kvalita vody, vysoká hustota ryb v chovné nádrži apod. V uzavřeném prostředí mohou parazité významně snížit prosperitu a následně zvýšit nemocnost a úmrtnost chovaných ryb. Parazité mohou vykazovat různou druhovou nebo orgánovou specifitu, avšak obecně platí, že největší škody způsobují druhově nespecifičtí ektoparazité (viz Tab. 1). Jednou z dalších možných příčin oslabení, nebo dokonce úhynu kaprů mohou být krevní bičíkovci (*Trypanosoma* spp. a *Trypanoplasma* spp.).

Tab. 1. *Nejfrekventovanější parazité kůže a žaber zjišťovaní při jarních parazitárních vyšetřeních.*

Název parazita	*Ichthyobodo necatrix*	*Trichodina* sp.	*Chilodonella* sp.	*Apiosoma* sp.	*Epistylis* sp.
Velikost (µm)	12–20	17–60	60–80	60–80	60–80
Foto					
Název parazita	*Ambiphrya* sp.	*Ichthyophthirius multifiliis*	*Gyrodactylus* sp.	*Dactylogyrus* sp.	*Argulus* sp.
Velikost (µm)	60–90	50–1 000	500–1 500	500–1 500	až 15 000
Foto					

Autoři fotografií: E. Zusková (*Trichodina* sp., *I. multifiliis*), V. Piačková (*Apiosoma* sp., *Gyrodactylus* sp., *Dactylogyrus* sp.), Ch. Steinbach (*Chilodonella* sp., *Epistilis* sp., *Ampiphrya* sp.), M. Kalbe (*Argulus* sp.), © PARU BC AV (*I. necatrix*).

Z **virových onemocnění** se v jarním období u kaprů uplatňuje především jarní virémie kaprů a v poslední době také choroba vyvolaná kapřím edema virem (z ang. *Carp Edema Virus*, CEV). V pokročilém jaru pak přichází jako možná příčina úhynu kaprů v úvahu i koi herpesviróza (KHV).

Edémová nemoc kaprů (z ang. *Carp Edema Virus Disease*; CEVD; spavá nemoc koi kaprů; z ang. *Koi Sleepy Disease*; KSD)

Virové onemocnění kapra a jeho barevných variet (koi). Původcem je virus zařazený do čeledi Poxviridae. Onemocnění, které se původně projevovalo letargií, ztrátou reflexů a ležením ryb na dně se ztrátou rovnováhy, je v současnosti charakterizováno značnými úhyny. U postižených ryb lze pozorovat odlučování kožního hlenu, zapadlé oko (enoftalmie), na povrchu těla lze občas pozorovat léze. Hlavním projevem však je edém žaberního epitelu, degradace žaberních lístků až rozsáhlé nekrózy žaber. To je i důvodem, proč nemocné ryby bývají i u hladiny a snaží se nouzově dýchat. Onemocnění u kaprů se vyskytuje většinou při teplotách vody pod 17 °C, u koi kaprů až do teplot 25 °C. V posledních letech se tento patogen objevuje v českých chovech čím dál tím častěji.

Jarní virémie kaprů (infekční vodnatelnost kaprů, z ang. *Spring Viraemia of Carp*; SVC)

Jarní virémie kaprů je generalizované krvácivé onemocnění především kapra obecného, které může způsobovat úmrtnost až 70 %. Původcem je virus jarní virémie kaprů (z ang. *Spring Viraemia of Carp Virus*; SVCV) patřící do čeledi Rhabdoviridae, rodu *Sprivivirus* a druhu *Carp sprivivirus*. Nemocní jedinci jsou apatičtí, shromažďují se u břehů nebo u přítoku vody a vykazují ztrátu reflexů. Viditelné je u nich ztmavnutí povrchu těla, anémie žaber, exoftalmus a zvětšení dutiny tělní. Na povrchu těla bývají krváceniny, které jsou často u báze ploutví, na břišní části těla či v oku. Krváceniny lze pozorovat i na žábrách, plynovém měchýři, ve svalovině a na vnitřních orgánech. Teplota vody má výrazný vliv na průběh onemocnění, typické projevy infekce je možné pozorovat v teplotním rozmezí 10–17 °C. Infekce s mírnějšími příznaky je však popsána už při teplotě 5 °C i při teplotách nad 20 °C.

V souvislosti s jarními úhyny kaprů je třeba vzít v úvahu i nákazy **bakteriálního původu**. Bakterie vyvolávající choroby ryb představují, zvláště v mírném pásu, závažnou skupinu rybích patogenů. Často mohou fungovat jako sekundární patogeny, zejména při uplatnění jiných negativních faktorů (virové onemocnění, parazité, stres ryb, věk ryb aj.) a podílet se na hromadných úhynech ryb v chovech s nepříjemnými ekonomickými důsledky pro chovatele. Bakterie se mohou uplatňovat jako patogeny různých rybích druhů, některé se však specializují pouze na lososovité ryby, jiné zase infikují pouze kaprovité druhy ryb.

Z bakteriálních chorob postihujících kapry v jarním období se chovatelé mohou v našich podmínkách nejčastěji setkat s erytrodermatitidou, flavobakteriózou a kolumnarózou.

Erytrodermatitida kaprů (*Erythrodermatitis cyprinorum*, CE – z ang. *Carp Erythrodermatitis*, *Summer Ulcer Disease*, erytrodermatitida ryb)

Onemocnění kaprů, případně jiných druhů ryb, charakterizované zánětlivými změnami na kůži v rozsahu od povrchových lézí až po hluboké vředy zasahující do svaloviny („vředovitá choroba"). Původcem jsou mezofilní (bakterie s optimálním růstem mezi 20–40 °C – Ambrožová, 2004) pohyblivé druhy bakterií rodu *Aeromonas* (Janda a Abbott, 2010). Průběh onemocnění závisí na teplotě vody a dalších faktorech, včetně imunitního stavu ryb. Obecně je míra úmrtnosti poměrně nízká (kolem 25 %), ovšem v závislosti na kvalitě vodního prostředí a hustotě populace ryb (Hoole a kol., 2001).

Některé druhy pohyblivých aeromonád mohou kromě kožních změn vyvolávat také septikemické infekce (z ang. *Motile Aeromonad Infections* – MAI) (Austin a Austin, 2012).

Flavobakterióza (*Flavobacteriosis*)

U kaprovitých ryb se v roli patogenu mohou uplatnit také flavobakterie. Výsledky nedávné studie ukázaly, že existují koinfekce CEV-pozitivních kaprů a flavobakterií. Na žábrách CEV infikovaných ryb byla opakovaně identifikována *Flavobacterium branchiophilum*. Tato flavobakterie byla popsána jako druh způsobující bakteriální onemocnění žaber (z ang. *Bacterial Gill Disease*, BGD), postihující různé druhy ryb při nižších teplotách vody. Pro infikované ryby je příznačné zvýšené zahlenění žaber, nekrózy žaberní tkáně, při chronickém průběhu anémie žaber (Adamek a kol., 2018).

Kolumnaróza (z ang. *Columnaris Disease*)

Onemocnění ryb způsobené bakterií *Flavobacterium columnare,* typické žlutými až šedavými skvrnami na kůži ryb. Vnímavá je většina druhů ryb, včetně kaprovitých. Onemocnění se nejčastěji vyskytuje při teplotě vody 20–25 °C a vyšší, ale není neobvyklé jej diagnostikovat i v teplotním rozmezí 12–20 °C. Onemocnění mívá akutní až chronický průběh. Mortalita ryb při přidružení dalších negativních faktorů může dosáhnout až 70 % (Navrátil a kol., 2000).

Poškození povrchu kůže a žaber bývá často doprovázeno také povrchovým **zaplísněním** způsobeným oomycety z rodů *Saprolegnia, Achlya* a *Aphanomyces* (Obr. 1).

Obr. 1. *Povrchové zaplísnění nekrotických žaber (Foto: V. Piačková).*

Kromě infekčních patogenních činitelů může být příčinou úhynů ryb, a to nejen v jarních měsících, také **změna chemizmu vody**.

V jarních měsících dochází spolu s postupným nárůstem teploty vody ke změnám biologické aktivity v rybničním ekosystému a s tím souvisejícím změnám fyzikálně chemických vlastností vody. Zejména v rybnících, kde se vytvořila v průběhu zimního období vertikální stratifikace vody (zimní stratifikace) a v průběhu jara se vyrovnala teplota vody v celém sloupci, dochází k promíchání celého obsahu nádrže (jarní cirkulace). Do celého vodního sloupce se tak dostávají látky, které byly adsorbovány na dnových sedimentech, nebo se postupně v průběhu zimy uvolňovaly do spodních vrstev vody (hypolimnia) v důsledku anoxických podmínek a nízkých hodnot pH vody. K dalším výrazným změnám fyzikálně chemických parametrů kvality vody dochází díky změnám hydrobiologickým, ke kterým patří např. rozvoj fytoplanktonu a zooplanktonu, růst vodní makrovegetace, vysazení ryb apod. Na kvalitě vody eutrofních a organicky zatížených nádrží se také negativně projevuje hnojení, které je mnohdy na jaře aplikováno bez znalosti kvality vody před aplikací. Z toho důvodu je třeba věnovat kvalitě vody v rybnících náležitou pozornost, a zejména před vysazením ryb (zvláště raných stadií) kontrolovat především teplotu vody, kyslíkové poměry, hodnoty pH, koncentraci amoniaku a nezapomenout na složení zooplanktonu. Zooplankton samozřejmě představuje pro raná

vývojová stadia ryb nepostradatelný zdroj živin, ale na druhé straně výskyt dravých buchanek může významně poškodit právě vysazený váčkový plůdek. Po vysazení ryb je třeba i nadále sledovat kvalitu vody, a to jak z hlediska jejích fyzikálně chemických vlastností, tak z hlediska vývoje hydrobiologických poměrů, a v závislosti na výsledcích šetření upravovat další postupy. Samozřejmě, pokud nastanou změny chování rybí obsádky, nebo dokonce dojde k úhynu ryb, je třeba provést místní šetření, jehož nedílnou součástí je posouzení fyzikálně chemických i hydrobiologických parametrů kvality vody. V případě podezření na kontaminaci vody toxickými látkami je třeba provést i biologickou zkoušku toxicity vody. Na základě získaných výsledků se poté rozhoduje, zda příčinou poškození/úhynu rybí obsádky byla změna kvality vody nebo onemocnění ryb. Ve většině případů se jedná o kombinaci více faktorů a najít „viníka“ bývá práce téměř detektivní.

V posledních letech se objevuje nové nebezpečí kontaminace vody, a sice digestát (odpad z bioplynových stanic), který bývá aplikován na pole jako bohatý zdroj fosforu. Avšak v období růstu polních kultur, kdy není možno vyvážet tento odpad na pole, bývá vyvážen na louky v okolí povrchových vod a stává se tak novým významným eutrofizujícím prvkem, který se negativně projevuje v kvalitě rybniční vody a povrchových vod obecně.

2.3. Diagnostické postupy pro zjištění příčin jarních úhynů kaprů v rybničních chovech

2.3.1. Anamnéza

Velmi důležitou částí diagnostického procesu je zjišťování anamnézy. Jedná se o komplex informací zahrnujících popis klinických příznaků a abnormalit chování pozorovaných chovatelem, údajů o předcházející nebo probíhající medikaci, o teplotě, eventuálně dalších parametrech kvality vody, o hustotě a druhovém složení obsádky, o podmínkách chovu, způsobu krmení, eventuálně o srážkové činnosti v předcházejících dnech atd. Dobré je také znát původ obsádky a zdravotní historii rybníka. Všechny tyto informace jsou důležité pro správné nasměrování diagnostického postupu.

2.3.2. Klinické vyšetření

Klinické vyšetření v chovech ryb spočívá zejména v pravidelném pečlivém sledování chování obsádek. Zdravá obsádka je pro méně vnímavého pozorovatele prakticky neviditelná, ale zkušený chovatel je schopen i přes vegetační zákal vody pohyb ryb zaznamenat.

Jedním ze základních klinických ukazatelů zdravotního stavu ryb je **příjem potravy**. Z tohoto hlediska je výhodné, když na rybnících krmí stále ti samí lidé, kteří jsou pak schopni všimnout si změny. Snížená ochota přijímat předkládanou potravu však nemusí být vždy signálem onemocnění. Může souviset i s dostatkem přirozené potravy nebo klimatickými změnami (pokles teploty), případně se špatnou kvalitou či nízkou atraktivitou předkládaného krmiva. Proto je nutné vždy před zahájením krmení zkontrolovat stav přirozené potravy a z něho vycházet při stanovení krmných dávek i kvality předkládaného krmiva.

Zhoršený zdravotní stav ryb bývá doprovázen také snížením intenzity nebo úplnou ztrátou reflexů. Při pozorování ryb v přirozeném prostředí můžeme hodnotit **reflex únikový**, díky kterému zdravé ryby při zaznamenání pohybu, otřesů nebo zvukového podnětu okamžitě unikají z dosahu. Příznakem onemocnění je shromažďování ryb u břehů, u přítoku nebo u hladiny (Obr. 2), kde zůstávají i po příchodu člověka, nejeví snahu uniknout a dají se snadno vylovit (Obr. 3). Takovéto ryby mívají vymizelý i **reflex obranný**, jsou malátné a při vylovení nekladou žádný odpor. Po vylovení je možno hodnotit i **reflex oční**, který spočívá ve schopnosti ryb směřovat pupilu stále vodorovně i při natáčení těla na bok, a **reflex ocasní**, jehož projevem je viditelná snaha ryby při jejím uchopení za hlavu v poloze na boku a při současném zvednutí nad podložku vyrovnávat ocasní část těla do vodorovné polohy, přičemž ocasní ploutev je vějířovitě roztažená. U nemocné ryby visí záď a ocasní ploutev schlíple dolů (Svobodová a kol., 2007).

Obr. 2. *Shromažďování ryb pod hladinou, apatie, ztráta reflexů (Foto: M. Palíková).*

Obr. 3. *Ztráta únikového reflexu, snadné vylovení ryby (Foto: M. Palíková).*

U kaprů můžeme pozorovat kromě shromažďování ve vodě s vyšší koncentrací rozpuštěného kyslíku u střiku také **nouzové dýchání** u hladiny, tzv. „troubení“. Říká se tak plavání kaprů šikmo s hlavou u hladiny a doširoka rozevřenými ústy. Vzduch nabírají do ústní dutiny, kde díky bohatému prokrvení sliznice měkkého patra dochází ke vstřebávání kyslíku do krve. Je to reakce na nedostatečné okysličení tkání, což může mít několik příčin: 1) nedostatek kyslíku ve vodě, 2) snížená schopnost ryb přijímat kyslík z vody i při jejím dostatečném nasycení v důsledku poškození žaber (onemocněním nebo mechanicky – např. pokrytím krustou vysráženého železa nebo manganu) a 3) nedostatek červených krvinek pro transport kyslíku ke tkáním. Všechny tyto tři úrovně možných příčin je nutno prověřit dalšími diagnostickými metodami.

Některé choroby a chorobné stavy ryb bývají doprovázeny i **nervovými příznaky**. Klinické projevy mohou být různé – od nekoordinovaného plavání, narážení do překážek a výskoků nad hladinu, přes křečovité záškuby a plavání do kruhu, až po upadání do „bezvědomí“ a polehávání u dna.

Většina klinických příznaků se u ryb řadí do kategorie „nespecifické“. Znamená to, že pouze na základě nich nelze spolehlivě určit diagnózu. Jsou jen signálem, že s obsádkou není něco v pořádku, a je nutno provést další vyšetření, aby byla zjištěna příčina onemocnění.

2.3.3. Patologicko-anatomické vyšetření (pitva)

Při pitvě pokládáme rybu na pravý bok břišní stranou k sobě. Nejprve je potřeba provést důkladné zevní ohledání, při němž je potřeba si všímat výživného stavu ryb, stavu tělních otvorů, stavu ploutví, oka, množství hlenu na povrchu ryb, přítomnosti makroskopicky patrných parazitů a přítomnosti hemoragií nebo různých kožních lézí.

Po zevním ohledání odstřihneme podstatnou část skřelového víčka a posoudíme stav žaber. Všímáme si především barvy, zahlenění, možného zduření žaberního aparátu nebo přítomnosti nekrotických změn.

Po zevním ohledání, ohledání žaber a odebrání potřebných vzorků pro další vyšetření (kultivace, stěry z kůže a ze žaber, odběr žaberní tkáně na histologické, případně virologické vyšetření), provedeme otevření dutiny tělní. Abychom mohli odebírat vzorky z vnitřních orgánů i pro mikrobiologickou kultivaci nebo virologické vyšetření, je potřeba dutinu tělní otevřít sterilně, tj. před incizí povrch otřít etanolem a sterilními nástroji rozstřihnout dutinu tělní před řitním otvorem směrem k hlavě. Pokud předpokládáme přítomnost tekutiny v dutině tělní, nerozstříháváme ji přímo v mediální linii, ale kousek nad ní, aby tekutina nevytekla. Poté nejprve sterilními nástroji provedeme odběr vhodného materiálu ke kultivaci. Až po těchto odběrech můžeme dutinu

tělní zcela odkrýt druhým střihem vedoucím z kaudálního okraje řezu směrem dorzokraniálně k páteři, kde se stočíme směrem kraniálním a pokračujeme až k hlavě, poté můžeme oba řezy spojit a odstřihnout stěnu tělní pro lepší přehlednost (Obr. 4).

Obr. 4. *Otevřená dutina tělní kapra obecného. Pro zjištění eventuálních změn na srdci by bylo nutno spodní řez protáhnout směrem k hlavě (Foto: V. Piačková).*

Po otevření dutiny tělní můžeme zaznamenat přítomnost čiré, zakalené nebo hemoragické tekutiny. Tento nález bývá obvyklý při probíhající jarní virémii (SVC). Při infekčních onemocněních bývá obvykle zvětšená slezina. Změny mohou být nalezeny i na ostatních orgánech, které mohou být zvětšené, anemické nebo naopak hyperemické nebo s přítomností hemoragií. Tento nespecifický nález může doprovázet mnohá infekční onemocnění zejména virového a bakteriálního původu. Rovněž můžeme posoudit naplnění trávicího traktu, při infekčních onemocněních bývá trávicí trakt prázdný, protože tato onemocnění jsou většinou doprovázena inapetencí, na rozdíl od úhynů ryb vlivem zhoršené kvality vody.

Možné nálezy při patologicko-anatomickém vyšetření

Výživný stav

Při zhoršení výživného stavu je patrná vyhublost ryb, přítomnost příčného žlábku za rypcem a zapadlé oko (Obr. 5). Z těchto důvodů je rovněž snížena hodnota Fultonova koeficientu vyživenosti oproti rybám zdravým. Ke zhoršení výživného stavu může dojít z různých příčin, např. dlouhodobým hladověním ryb, invazí střevních parazitů, přítomností krevních bičíkovců nebo

onemocněním způsobeným CEV. V případě CEV nemusí být zhoršení výživného stavu pozorované ve všech případech, častěji se vyskytuje u barevných variant juvenilních kaprů koi, naopak nebarevné formy kapra obecného, zejména v tržní velikosti, hynou bez zhoršení výživného stavu (Obr. 6).

Obr. 5. *Špatný výživný stav, příčný žlábek za rypcem, endoftalmus, vypadání šupin v kaudální části těla (Foto: M. Palíková).*

Obr. 6. *Přítomnost hemoragií v kůži, ryba v dobrém výživném stavu (Foto: M. Palíková).*

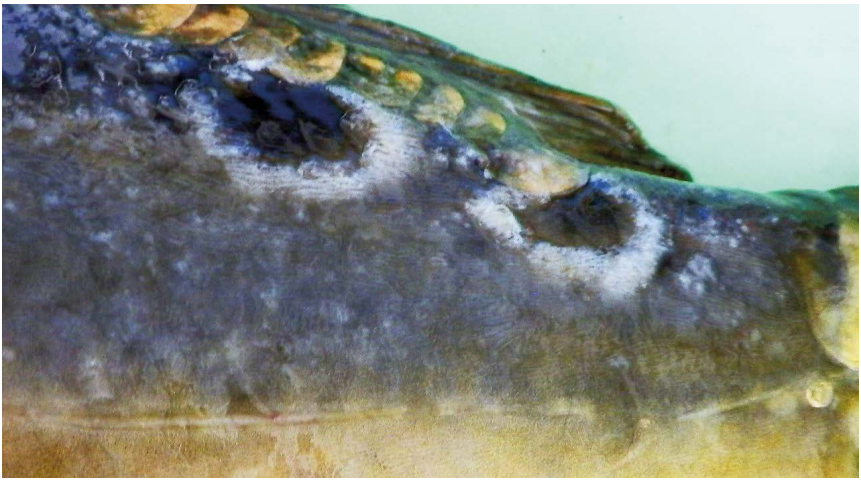
Zevní ohledání

Při zevním ohledání zjišťujeme stav zahlenění kůže (zvýšené zahlenění nebo naopak ztrátu ochranného hlenu), dále můžeme nacházet zvětšenou dutinu tělní, zježení šupin (Obr. 7), exoftalmus nebo enoftalmus, přítomnost hemoragií (Obr. 8), případně lézí různého charakteru, nekrózy okrajů ploutví nebo makroskopicky viditelné parazity (kapřivci, *Argulus* sp. nebo pijavky, chobotnatka rybí, *Piscicola geometra*). Zvětšená dutina tělní, zježení šupin

a exoftalmus se často vyskytují u jarní virémie, avšak mohou doprovázet i onemocnění způsobená motilními aeromonádami, tzv. MAI (z ang. *Motile Aeromonas Infection*). Obě tyto nemoci může doprovázet přítomnost hemoragií. Masivní parazitární invaze se nejčastěji manifestují zašednutím povrchu (chilodonelóza, ichtyobodóza, trichodinóza) nebo i přítomností hemoragií (monogeneóza – Obr. 8). U koiherpesvirózy (KHV) můžeme pozorovat mapovité okrsky na kůži způsobené poruchou tvorby hlenu (Obr. 9) a enoftalmus.

Obr. 7. *Zvětšená dutina tělní, zježení šupin, tekutina v šupinových pouzdrech (Foto: M. Palíková).*

Obr. 8. *Přítomnost hemoragií v kůži při masivním výskytu monogeneí (Foto: M. Palíková).*



Obr. 9. *Nepravidelná tvorba kožního hlenu při KHV (Foto: V. Piačková).*

Žaberní aparát

Nález na žábrách může být velice pestrý, od zvýšeného zahlenění, přítomnosti světlejších okrsků žaberní tkáně nebo zduření žaber až po přítomnost rozsáhlých nekrotických změn (Obr. 10) doprovázených často povrchovým zaplísněním. I když je tento nález typický pro řadu onemocnění, není pro žádné z nich patognomický, jelikož stejné změny vyvolává řada infekčních i neinfekčních agens. Mohou mít virový původ (CEVD, KHV), parazitární původ (masivní invaze parazitů) nebo jsou způsobeny vlivem vnějších podmínek spojených s vysokým pH vody a s toxickým působením amoniaku. Na žábrách mohou být nalezeni také pouhým okem viditelní parazité (chlopek obecný, *Ergasilus sieboldi*).

Obr. 10. *Patologické změny na žábrách: zvýšené zahlenění, zduření žaberních lístků (4), počínající okrsková nekrobióza zejména na periferii žaber (6), nekrotické změny na žábrách (3) (Foto: M. Palíková).*

Dutina tělní

Po otevření dutiny tělní můžeme zaznamenat přítomnost čiré, zakalené nebo hemoragické tekutiny. Tento nález bývá obvyklý při probíhající jarní virémii (SVC). Změny mohou být nalezeny i na jednotlivých orgánech, které mohou být zvětšené, anemické nebo s přítomností hemoragií. Hepatopankreas může být zbarven do zelena žlučovými barvivy. Tento nespecifický nález může doprovázet mnohá infekční onemocnění zejména virového a bakteriálního původu.

2.3.4. Histologické vyšetření

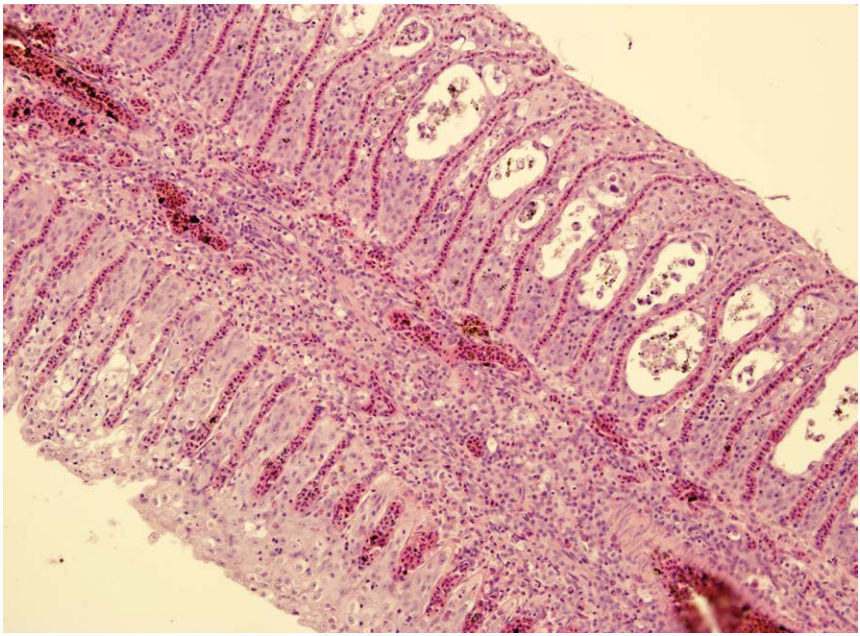
Vzorky pro histologické vyšetření je potřeba odebrat do fixačních roztoků co nejrychleji po utracení nebo z čerstvě uhynulých ryb vzhledem k rychlému nástupu rozkladných autolytických procesů, které znesnadňují objektivní posouzení histologických změn. Fixační roztoky způsobí rychlou a šetrnou denaturaci bílkovin a brání autolýze tkání. Zvlášť rychle je potřeba postupovat u tkáně žaber a střeva. Optimální velikost vzorku je do 1 cm^3. Fixačního roztoku by mělo být minimálně 20x více, než je objem odebraného vzorku.

Jako fixační roztok se nejčastěji používá roztok formolu (= 40% formaldehyd), obvykle zředěný na 10% koncentraci. Ředění provádíme pramenitou (vodovodní) vodou. Fixace tkáně trvá zpravidla (podle velikosti vzorku) 24 hodin.

Pro žaberní tkáň je doporučován šetrnější fixační roztok podle Davidsona (směs glycerolu, formaldehydu, 96% etanolu a vody v poměru 2 : 1 : 3 : 3).

Po fixaci jsou vzorky následně zpracovávány (odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou, projasněny xylenem, prosyceny parafínem a následně zality do parafínových bločků) a krájeny na mikrotomu na řezy o tloušťce 4–10 μm. Tyto řezy jsou montovány na podložní skla a barveny. Nejčastěji je používáno přehledné barvení hematoxylin-eosinem (HE), které demonstruje všechny složky tkání. Pro zvýraznění určitých buněčných nebo tkáňových složek jsou využívány speciální barvicí metody.

Histologický nález na žábrách odpovídá druhu poškození. Při CEVD je patrná hyperplazie žaberního epitelu, edém epiteliálních buněk, dochází k fúzi žaberních lístků a jsou nacházeny kulovité cystoidní formace s celulárními fragmenty a s buněčným detritem (Obr. 11). Podobné změny jsou však nalézány i při KHV. Při těchto onemocněních se mohou vyskytovat i histologicky patrné změny ve vnitřních orgánech, tyto ale nejsou pro daná onemocnění patognomické. Podobný histologický nález na žábrách můžeme nacházet i u jiných chorob nebo chorobných stavů. Histologicky neodlišitelný je nález např. u toxické nekrózy způsobené amoniakem. Podobný nález doprovází i branchiomykózu, u které je však patognomickým nálezem přítomnost vláknitého mycelia a spor v žaberních cévách. Nekrotické změny se mohou vyskytovat např. i u sanguinikolózy, kdy dochází k mechanickému ucpání žaberních cév vajíčky motolice nebo při masivním přemnožení žaberních parazitů, např. monogeneí. V případě prvotní parazitární příčiny vzniku nekrotických změn nalézáme v histologických preparátech viditelné původce.



Obr. 11. *Hyperplazie žaberního epitelu, fúze žaberních lístků, přítomnost kulovitých cystoidních formací s celulárními fragmenty a s buněčným detritem. Barveno hematoxylin-eosinem (Foto: F. Tichý).*

2.3.5. Virologické vyšetření

Pokud na základě anamnézy, klinického a patologicko-anatomického vyšetření (viz kapitoly 2.3.1., 2.3.2. a 2.3.3.) vznikne podezření na onemocnění způsobené virovým původcem, je nutno provést cílené vyšetření na přítomnost viru přicházejícího dle příznaků a podmínek v úvahu. V současnosti se v akvakultuře v jarním období vyskytuje z virových nemocí edémová nemoc kaprů a jarní virémie kaprů. Taktéž není možné vyloučit atypický výskyt koi herpesvirózy.

Odběr vzorků

Pro virologické vyšetření je třeba vybírat nejlépe ryby ještě živé s typickými příznaky onemocnění, hynoucí či čerstvě uhynulé. Pokud to podmínky dovolují, je vhodné dodat k vyšetření alespoň 10 kusů ryb vykazujících klinické příznaky.

Umožňují-li to podmínky, lze před zasláním do laboratoře z ryb sterilně odebrat části orgánů určených pro vyšetření. Orgány vhodné pro vyšetřování

některých virových onemocnění jsou: SVC – ledviny, slezina, žábry, mozek, (játra, srdce); CEV – žábry; KHV – žábry, slezina, ledviny. V případě, kdy nelze odebrat orgány výše uvedeným způsobem, lze do laboratoře doručit živé ryby pod kyslíkovou atmosférou, eventuálně čerstvě utracené či čerstvě uhynulé ryby za splnění teplotních požadavků pro přepravu, jak je uvedeno v metodice FROV JU „Odběr vzorků pro bakteriologické a virologické vyšetření ryb" (Piačková a kol., 2013).

Kultivace na buněčných liniích

Pro diagnostiku virových onemocnění ryb je základním požadavkem stanovení původce. Diagnostické postupy pro stanovení virů jsou založeny na metodách přímého průkazu viru bez pomnožení původce či s nutností jeho pomnožení. Nejuniverzálnějším a v současnosti stále používaným postupem je izolace viru na vhodné buněčné linii a jeho následný průkaz. Pro izolaci jsou nejčastěji používány linie FHM, RTG-2, CHSE, BF-2 a EPC, přičemž přednost je dávána současnému použití alespoň dvou buněčných linií citlivých k replikaci viru. Kultivace probíhá většinou při 15 °C po dobu 7–10 dní. Jestliže se během tohoto časového úseku neprojeví cytopatický efekt (CPE), provádí se subkultivace za stejných podmínek. Pomnožený virus je následně detekován imunologickými metodami, a to neutralizací, imunofluorescencí (imunoperoxidázovým testem), immunoblotem, ELISA metodou či molekulárními technikami, jako jsou PCR, qPCR či sekvenování. Je nutno zmínit, že tato základní metoda selhává v případě, když virus není v použitých buněčných liniích replikovatelný. Z uvedených virových onemocnění kaprů lze tuto metodu použít pro stanovení viru SVC. KHV se replikuje velice obtížně na buněčných liniích CCB či KF-1, a CEV se dosud pomnožit na buněčných liniích nepodařilo.

ELISA

Tato metoda je používána k průkazu viru jarní virémie kaprů a je komerčně dostupná pod názvem SVCV Ag ELISA (z ang. *Test Line Clinical Diagnostics*). Základem je mikrotitrační deska s jamkami potaženými specifickými protilátkami proti viru SVC. V dalším kroku jsou jamky naplněny králičí protilátkou proti viru SVC, testovanými vzorky a kontrolními antigeny. Následuje inkubace, během níž dochází k vazbě SVCV antigenů se specifickými protilátkami a zároveň k reakci s králičí protilátkou. Vazba králičích protilátek je prokazována během další inkubace s roztokem konjugátu, vizualizována reakcí se substrátem a měřena fotometrem při vlnové délce 450 nm. ELISA souprava je vhodná k průkazu SVCV v orgánových homogenátech i v kultivačních médiích infikovaných buněčných kultur a její citlivost je $10^{2,8}$–$10^{3,5}$ $TCID_{50}/ml^{-1}$.

PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda založená na amplifikaci a následné detekci cílového úseku nukleové kyseliny, která našla široké využití při prokazování přítomnosti virů (nejen) v rybím organizmu. Jelikož optimalizovaná reakce je schopna přímé detekce viru i při jeho nízkých koncentracích, je její pomocí možno prokázat také viry, které se zatím na buněčných liniích pomnožit nepodařilo. Z virů postihujících kaprovité ryby v jarním období se tak jedná zejména o CEV a KHV, použití metody real-time PCR jako hlavního nástroje průkazu viru KHV je již dokonce zakotveno v evropské legislativě (prováděcí rozhodnutí Komise (EU) 2015/1554).

Využití primerů (známých úseků nukleových kyselin) cílených na druhově specifický úsek RNA nebo DNA konkrétního patogenu navíc u PCR vylučuje možnost křížové detekce necílových virů, bez ohledu na jejich genetickou nebo antigenní příbuznost. Tato je hrozbou například v případě sérologických metod detekce viru SVC, které vykazují křížovou reaktivitu s virem rabdovirózy štičího plůdku, PFRV.

Konvenční PCR (endpoint PCR, PCR)

Konvenční PCR založená na vizualizaci přítomnosti cílového produktu po ukončení samotné řetězové reakce dosahuje vysoké citlivosti zejména ve dvoukolové variantě této reakce označované také jako nested PCR. Výsledný materiál z konvenční PCR (tzv. amplikon) je díky své délce také obvykle vhodným materiálnem pro sekvenační analýzu (viz dále).

Nevýhodou konvenční PCR je zvýšené riziko kontaminace vzorků v důsledku opakovaného otevírání zkumavek mezi jednotlivými reakcemi a také náročnost na čas a materiál.

Odkazy na nejčastěji používané PCR metody pro jednotlivé viry jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2. *Primery používané pro endpoint a nested PCR.*

Virus	Endpoint PCR	Nested PCR	Literatura
SVCV	**SVCV F1:** 5′-TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR*-R*TC-3′	**SVCV F1:** 5′-TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR*-R*TC-3	Stone a kol. (2003)
	SVCV R2: 5′-AGA-TGG-TAT-GGA-CCC-CAA-TAC-ATH*-ACN*-CAY*-3	**SVCV R4:** 5′-CTG-GGG-TTT-CCN*-CCT-CAA-AGY*-TGY*-3′	
CEV	**CEV ForB:** 5′-ATG-GAG-TAT-CCA-AAG-TAC-TTA-G-3′	CEV ForB-int: 5′-GTT-ATC-AAT-GAA-ATT-TGT-GTA-TTG-3′	Matras a kol. (2017)
	CEV RevJ: 5′-CTC-TTC-ACT-ATT-GTG-ACT-TTG-3′	CEV RevJ-int: 5′-TAG-CAA-AGT-ACT-ACC-TCA-TCC-3′	
KHV	**TK-F:** 5′-GGG-TTA-CCT-GTA-CGA-G-3′	**InterTK-F:** 5′-CGT-CTG-GAG-GAA-TAC-GAC-G-3′	Bercovier a kol. (2005)
	TK-R: 5′-CAC-CCA-GTA-GAT-TAT-GC-3′	**InterTK-R:** 5′-ACC-GTA-CAG-CTC-GTA-CTG-G-3′	

Real-time PCR (kvantitativní PCR, qPCR)

Tato varianta PCR využívá detekci přítomnosti amplikonu po každém kole řetězové reakce, která v její **kvantitativní úpravě** umožňuje stanovení množství kopií virové nukleové kyseliny ve vyšetřované tkáni. Kromě primerů tato reakce také využívá sondu, která rovněž cílí na specifickou sekvenci cílového úseku DNA (RNA), a tím zvyšuje **specificitu** této metody i v porovnání s konvenční PCR (Tab. 3).

Amplikon z real-time PCR není pro svou malou délku obvykle vhodný k sekvenační analýze.

Tab. 3. *Primery a sondy používané pro real-time PCR.*

Virus	Primery a sondy	Literatura
CEV	**CEV qFor1:** 5′-AGT-TTT-GTA-KAT-TGT-AGC-ATT-TCC-3′	Matras a kol. (2017)
	CEV qRev1: 5′-GAT-TCC-TCA-AGG-AGT-TDC-AGT-AAA-3′	
	CEV qProbe: 5′-AGA-GTT-TGT-TTC-TTG-CCA-TAC-AAA-CT-3′	
KHV	**KHV-86f:** 5′-GAC-GCC-GGA-GAC-CTT-GTG-3′	Gilad a kol. (2004)
	KHV-163r: 5′-CGG-GTT-CTT-ATT-TTT-GTC-CTT-GTT-3′	
	KHV-109p: 5′-CTT-CCT-CTG-CTC-GGC-GAG-CAC-G-3′	

Sekvenování

Stanovení skladby určitého úseku nukleové kyseliny viru se rutinně využívá pro **fylogenetickou analýzu** jednotlivých izolátů virů. Sekvenační data poukazující na případnou genetickou příbuznost mezi jednotlivými ohnisky onemocnění mohou být následně využita pro objasnění možných cest šíření virů v prostředí akvakultury. Studiem těchto souvislostí se zaobírá **molekulární epizootologie**. Kromě tradičného sekvenování několika stovek až tisíců párů

bází se v poslední době rozšiřuje i tzv. sekvenování nové generace (z ang. n*ext-gen sequencing*, *whole genome sequencing*), které umožňuje prostřednictvím stanovení kompletního genomu cílového patogenu ještě podrobnější fylogenetické analýzy a také výzkum v oblasti genetických markerů virulence daných virů.

2.3.6. Bakteriologické vyšetření

Pokud na základě anamnézy a klinického a patologicko-anatomického vyšetření (viz kapitoly 2.3.1., 2.3.2. a 2.3.3.) vyvstane podezření na bakteriální onemocnění, je potřeba provést mikrobiologické vyšetření.

Odběr vzorků

Odběr vzorků je velmi důležitou součástí celého procesu. Správné stanovení patogenu a jeho citlivosti vůči antimikrobiálním látkám závisí na správném odběru materiálu pro vyšetření a odpovídajícím zacházení s materiálem během transportu do laboratoře.

Odběr vzorku se provádí vždy sterilně, abychom zamezili nežádoucí kontaminaci. Vzorek lze odebrat z kožních změn, ze žaber a z vnitřních orgánů. Pro odběr vzorku lze použít sterilní tampony, které se po odběru vkládají do pevného média – např. Amiesova transportního média. Použití tohoto média je velmi vhodné, protože nedochází k vyschnutí vzorku během jeho transportu. Odebraný vzorek je třeba doplnit žádankou o vyšetření a transportovat ho neprodleně do specializované laboratoře. Teplotní optimum při transportu vzorku by se mělo pohybovat v rozmezí 4–10 °C.

Odběru vzorků se dopodrobna, i s praktickými fotografiemi, věnuje metodika FROV JU (Piačková a kol., 2013).

Mikroskopie nativních preparátů

Rodové zařazení bakterie lze orientačně určit na základě morfologických znaků. Morfologické znaky bakterií lze posoudit mikroskopicky pozorováním bakterií ve světelném mikroskopu. Je možno prohlédnout si tvar, velikost, uspořádání a barvitelnost bakterií v preparátu. Dále lze mikroskopií posoudit přítomnost některých buněčných struktur či pohyblivost buněk. Preparát připravíme pomocí čistého skalpelu seškrabem ze žaber, případně z kůže. Získaný materiál naneseme rovnoměrně na podložní sklíčko, zakápneme vodou, aby nevysychal, a přiklopíme sklíčkem krycím. Takto je preparát připravený pro pozorování pod mikroskopem. Co můžeme pod mikroskopem vidět?

Aeromonády – Gram-negativní bakterie, lze pod mikroskopem vidět jako rovné tyčinky se zaoblenými konci, které se vyskytují buď jednotlivě, nebo tvoří krátké řetízky. Pohyblivost jim zajišťuje jeden polární bičík.

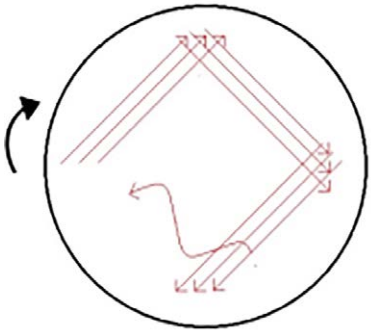
Flavobacterium branchiophilum – Gram-negativní bakterie, v seškrabu ze žaber je lze pod mikroskopem pozorovat jako nepohyblivé tyčinky (velikost 5–8 x 0,5 μm).

F. columnare – Gram-negativní bakterie, mikroskopicky je lze pozorovat jednotlivě (velikost 3–10 x 0,3–0,5 μm) pomalu klouzavě se pohybující nebo shlukující se do typických sloupků.

Kultivace

Při kultivačním vyšetření se dají kombinovat základní a speciální živná média pro růst bakterií. Pro základní kultivaci je často využívaným médiem Columbia krevní agar s 5% ovčí krve.

Kultivace se provádí z kožních změn, žaber a vnitřních orgánů. Křížovým roztěrem, kterým se původní kultura postupně zřeďuje za účelem získání jednotlivých kolonií, se inokulum naočkuje na misku s agarem (Obr. 12). Je nutné pracovat po celou dobu sterilně. Po zaschnutí inokula se miska kultivuje dnem vzhůru, v případě aeromonád po dobu 24–48 hodin, v případě flavobakterií za 2 dny inkubace dosahují kolonie velikosti 3–4 mm v průměru.

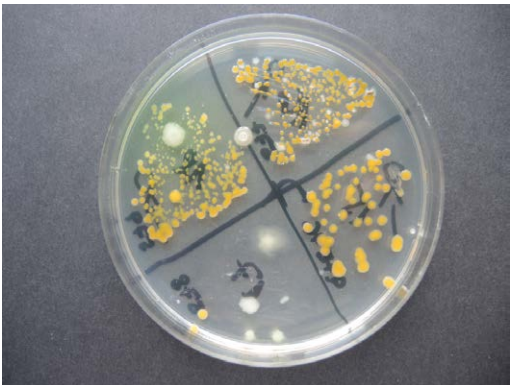


Obr. 12. *Schéma provedení křížového roztěru (E. Syrová).*

Aeromonády jsou mikroorganizmy nenáročné na kultivační média, pro rutinní vyšetření se používá krevní agar, na kterém dobře rostou při pokojové teplotě. Vytváří šedobílé nebo světle hnědé pigmentované kruhovité mukózní kolonie se zónou hemolýzy (projasnění půdy v místech kolem nárůstu bakterií) (Obr. 13).

Obr. 13. *Nárůst bakteriálních kolonií rodu Aeromonas na krevním agaru (fotoarchiv Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie při VFU Brno).*

V případě **flavobakterií** je třeba využít speciální půdy (*Cytophaga agar*). *F. branchiophilum* roste při teplotách 18–25 °C a tvoří světle žlutě pigmentované mírně konkávní hladké kolonie s rovnými okraji *F. columnare* roste optimálně při 20–30 °C a tvoří světle žluté kolonie (Obr. 14).



Obr. 14. *Nárůst bakteriálních kolonií rodu Flavobacterium na Cytophaga agaru (fotoarchiv Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie při VFU Brno).*

Identifikace

Pro identifikaci bakteriálního původce lze využít více metod. Lze postupovat buď klasickým způsobem založeným na určení **biochemické aktivity** původce, který je ale časově náročný. Proto se dnes v rutinní praxi nejčastěji využívá rychlejší metoda **hmotnostní spektrofotometrie MALDI-TOF**. Pro tuto metodu

se použije individuální bakteriální kolonie, vzorek je přenesen na pozici nosiče – terčíku MALDI target, kde je ošetřen speciální matricí a usušen. Vzorek je pak v hmotnostním spektrofotometru MALDI-TOF druhově identifikován porovnáním jeho hmotnostního spektra s databází referenčních bakteriálních kmenů. Vyšetření se v některých případech neobejde bez dalších konfirmačních analýz.

Pro přesné rodové i druhové určení patogenu lze využít také molekulární metody, např. metodu polymerázové řetězové reakce (z ang. *Polymerase Chain Reaction*, **PCR**), metodu **real-time PCR** a ***rpoB* sekvenování**. Tyto metody rovněž nebývají časově náročné.

Metoda PCR slouží k namnožení specifického úseku DNA *in vitro*. Původce je možné také kvantifikovat, a to s využitím velmi citlivé metody real-time PCR, která vychází z klasické PCR, s využitím speciálního cycleru – přístroje, který v průběhu PCR kontinuálně zaznamenává množství bakteriální DNA. Při průkazu a kvantifikaci původců se postupuje dle protokolů zavedených v dané laboratoři. Gen *rpoB* (β-podjednotka RNA-polymerázy) se využívá pro identifikaci u řady bakteriálních rodů. Izoláty jsou amplifikovány (namnoženy) v genu pro *rpoB* a komerčně sekvenovány. Analyzované sekvenční záznamy jsou porovnány s nejpodobnějšími sekvencemi v genové bance a je vyhodnoceno, o který bakteriální druh se jedná.

Stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám

U identifikovaných patogenů lze zjistit jejich citlivost k vybraným antimikrobiálním látkám, a zefektivnit tak následnou léčbu. Zároveň takto chovatel zabrání vzniku či prohlubování antimikrobiální rezistence v důsledku aplikace léčiv tzv. „naslepo“.

V rutinní praxi jsou pro stanovení citlivosti nejčastěji využívány diskové difúzní testy, kdy se na Müeller-Hintonův agar naočkuje standardizované inokulum připravené z dané bakteriální kultury a na takto připravený agar se aplikátorem aplikují disky napuštěné vybranými antimikrobiálními látkami. Standardní doba inkubace je 24–28 hodin při 28 ± 2 °C a 44–48 hodin při 22 ± 2 °C. Kalibrovaným digitálním nebo posuvným měřidlem se na závěr změří průměr inhibičních zón růstu a vyhodnotí se výsledky.

Stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám se dopodrobna věnuje již vydaná metodika FROV JU „Metody stanovení citlivosti původců erytrodermatitidy kaprů k antibakteriálním látkám“ (Čížek a Piačková, 2015). Tato metodika je věnována především bakteriálním původcům erytrodermatitidy kaprů, nicméně ji lze uplatnit i při stanovení citlivosti jiných kultivačně nenáročných bakterií, které se izolují z infikovaných ryb různých druhů.

U aeromonád v rámci ČR se poměrně často vyskytuje rezistence k oxytetracyklinu a chinolonům (Cizek a kol., 2010; Dobiasova a kol., 2014; Syrova a kol., 2018). U flavobakterií je situace s bakteriální rezistencí obdobná (informace poskytnuta Ústavem infekčních chorob a mikrobiologie při VFU Brno).

Interpretace výsledků

Výstupem výše popsaného bakteriologického vyšetření je určení konkrétního původce onemocnění, informace o tom, zda je izolát citlivý, intermediární nebo rezistentní k dané testované antimikrobiální látce a doporučení chovateli týkající se dalšího vhodného léčebného postupu.

2.3.7. Parazitologické vyšetření

Vyšetření a odběr vzorků

Určení původců parazitárního onemocnění se provádí makroskopickým a mikroskopickým vyšetřením, především kůže a žaber, případně i dalších patologicky změněných orgánů odebraných při pitvě. Nejčastěji diagnostikovaní parazité jarního období patří mezi protozoa (bičíkovci, nálevníci), popřípadě metazoa s jednoduchým vývojovým cyklem (jednorodí).

Postup parazitárního vyšetření kůže

V závislosti na velikosti ryby lze vyšetření provést i bez nutnosti usmrcení. Z fixované ryby odebereme táhlým pohybem skalpelu povrchový hlen, který umístíme na podložní sklíčko. Po přidání kapky vody a zakrytí krycím sklíčkem můžeme vzniklý preparát prohlížet pod světelným mikroskopem, nejčastěji při zvětšení 40x až 100x. Preparát prohlížíme meandrovitě a soustředíme se na okrajové části preparátu, kam často dojde k vyplavení pohybujících se parazitů.

Postup parazitárního vyšetření žaber

V případě potřeby i zde je možno provést vyšetření bez předchozího utracení ryby. Fixované rybě opatrně rozevřeme skřelové víčko a skalpelem provedeme co nejšetrněji povrchový stěr po směru žaberních lístků (nebo odstřihneme nůžkami kousek žaberní tkáně). Vzorek tkáně ze skalpelu přeneseme na podložní sklíčko, přikápneme kapku vody a překryjeme krycím sklíčkem. Vzniklý preparát prohlížíme meandrovitě pod světelným mikroskopem, nejčastěji při 40x až 100x zvětšení.

Pokud jsou vyšetřovány živé ryby, je vhodné po odběrech rybu ošetřit v hypermanganové ponořovací koupeli (1 $g.l^{-1}$ po dobu 30–45 s), aby se zabránilo případnému průniku infekce do organizmu.

2.3.8. Hematologické vyšetření

Pro hematologické parametry ryb je charakteristické široké rozmezí fyziologických hodnot a vysoká individuální variabilita. Je to dáno tím, že hematologické ukazatele jsou u ryb ovlivněny nejen chorobnými stavy, ale i mnoha vnitřními faktory (např. věkem, pohlavím, plemennou příslušností nebo fází reprodukčního cyklu) a vnějšími vlivy, např. sezónními cykly, teplotou vody nebo obsahem kyslíku ve vodě (Fazio a kol., 2013; Witeska, 2013; Fazio, 2019). Proto je třeba výsledky hematologického vyšetření vždy porovnat s výsledky, zjištěnými u kontrolních klinicky zdravých ryb, odebraných ve stejnou roční dobu ve stejném chovném zařízení. Nejsou-li v chovu k dispozici klinicky zdravé ryby, je třeba odebrat kontrolní ryby v zařízení podobného typu se stejnou teplotou vody.

Odběr, stabilizace a uchovávání krve

Odběr krve provádíme pokud možno bezprostředně po vylovení ryb. Vylovení a přesun do jiného prostředí je pro ryby velmi stresující zásah; stres může způsobit změny v krevním obrazu i v hodnotách některých biochemických parametrů (Fazio a kol., 2015). Tyto změny mohou být patrné i několik dní po eliminaci stresoru (Clauss a kol., 2008).

U malých ryb a u plůdku odebíráme krev punkcí srdce, u větších ryb obvykle provádíme odběr punkcí ocasních cév (Svobodová a kol., 2012) – viz obr. 15. Odebranou krev zpracujeme co nejdříve po odběru a až do zpracování uchováváme v chladničce nebo v chladicím boxu. Ke stabilizaci krve ryb se používá nejčastěji heparin (Walencik a Witeska, 2007). V České republice je registrován přípravek Heparin inj., což je vodný roztok sodné soli heparinu o koncentraci 5 000 $IU.ml^{-1}$. Pro stabilizaci 1 ml krve stačí 10 µl tohoto roztoku, tj. 50 IU (Svobodová a kol., 2012). Roztokem heparinu je vhodné před odběrem propláchnout i injekční stříkačku s jehlou, aby se krev při odběru nesrazila uvnitř jehly.

Obr. 15. *Vlevo: odběr krve kardiopunkcí, vpravo: odběr krve z ocasních cév (Foto: I. Papežíková).*

Parametry stanovované v rámci hematologického vyšetření

K základním parametrům stanovovaným při hematologickém vyšetření patří počty erytrocytů (z ang. *Red Blood Cells*, RBC), koncentrace hemoglobinu (Hb) a hodnota hematokritu (z ang. *Packed Cell Volume*, PCV). Z těchto hodnot se pak vypočítávají parametry erytrocytů, jako je střední objem erytrocytu (z ang. *Mean Corpuscular Volume*, MCV), střední barevná koncentrace (z ang. *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*, MCHC), a průměrné množství hemoglobinu v erytrocytu (z ang. *Mean Corpuscular Hemoglobin*, MCH).

MCV (hodnota se udává ve femtolitrech; fl) = (PCV . 1 000)/počet erytrocytů

MCH (hodnota se udává v pikogramech; pg) = Hb/počet erytrocytů

MCHC (hodnota se udává v $l.l^{-1}$) = Hb/(PCV . 1 000)

Dále se v rámci vyšetření krevního obrazu stanovují celkové počty leukocytů (z ang. *White Blood Cells*, WBC) a provádí se diferenciální rozpočet leukocytů.

Počty erytrocytů a leukocytů

Počítání erytrocytů i leukocytů ryb provádíme manuálně v Bürkerově komůrce. Plnou krev ředíme v Natt-Herrickově roztoku, který umožňuje počítání erytrocytů i leukocytů najednou. Promíchanou krev ředíme 200x (např. 4 975 µl Natt-Herrickova roztoku + 25 µl krve). Naředěnou krev opatrně promícháme krouživým pohybem a napipetujeme do Bürkerovy komůrky. Erytrocyty se Natt-Herrickovým roztokem barví velmi slabě, spíše se jen mírně zvýrazní jejich obrysy a jádra. Leukocyty se barví fialově.

Pro stanovení počtů erytrocytů počítáme buňky ve dvaceti obdélnících Bürkerovy komůrky (jeden obdélník odpovídá objemu 0,001 µl). Počítáme všechny erytrocyty, které leží uvnitř obdélníku. Dále vybereme dvě strany obdélníku (buď horní a pravou, nebo dolní a levou) a spočítáme i erytrocyty, které se těchto dvou stran dotýkají zevnitř, vně anebo je přesahují. U zbývajících dvou stran nepočítáme ani erytrocyty, které se strany dotýkají zevnitř. Spočítané

erytrocyty sečteme a součet dělíme číslem 100. Výsledkem je počet erytrocytů v $T.l^{-1}$ (= $10^{12}.l^{-1}$).

U kapra se fyziologické počty erytrocytů pohybují v rozmezí 1,1 až 1,8 $T.l^{-1}$ (Svobodová a kol., 2012). Počty erytrocytů se u ryb zvyšují například při akutní stresové reakci, kdy dochází k uvolnění erytrocytů z depozit ve slezině (Witeska, 2013; Fazio, 2015) nebo při pobytu v hypoxickém prostředí, kdy organizmus kompenzuje hypoxii uvolňováním erytrocytů ze sleziny a stimulací erytropoézy (Witeska, 2013). Ke snížení počtu erytrocytů dochází například při chorobách postihujících ledviny a jejich krvetvornou funkci, při některých intoxikacích, při silných invazích krevních bičíkovců (*Trypanosoma* spp., *Trypanoplasma* spp.) anebo parazitů sajících krev (pijavky, parazitičtí členovci) (Clauss a kol., 2008). Další příčinou mohou být infekce hemolytickými bakteriemi nebo infekce, při nichž vznikají krvácející léze (Clauss a kol., 2008).

Pro stanovení počtů leukocytů počítáme buňky ve 100 velkých čtvercích Bürkerovy komůrky (jeden čtverec odpovídá objemu 0,004 µl). Počítáme všechny buňky, které se nacházejí uvnitř čtverce a po dvou stranách čtverce i buňky, které se dotýkají strany čtverce, přesahují ji anebo se jí dotýkají z vnější strany. U zbývajících dvou stran nepočítáme ani leukocyty, které se strany dotýkají zevnitř. Součet spočítaných leukocytů dělíme dvěma. Výsledkem je počet leukocytů v $G.l^{-1}$ (= $10^{9}.l^{-1}$). U kapra se fyziologické počty leukocytů pohybují v rozmezí 10–80 $G.l^{-1}$ (Svobodová a kol., 2012). Celkové počty leukocytů se zvyšují při infekčních onemocněních a při poškození tkání. Ke snížení počtů leukocytů dochází například při vystavení ryb některým toxickým látkám (Witeska a kol., 2010).

Koncentrace hemoglobinu

Koncentraci hemoglobinu stanovujeme spektrofotometricky kyanohemoglobinovou metodou. Koncentrace hemoglobinu v krvi zdravých kaprů se obvykle pohybuje v rozmezí 60–100 $g.l^{-1}$ (Svobodová a kol., 2012).

Hematokritová hodnota

Pro stanovení hodnoty hematokritu nasajeme dobře promíchanou krev do hematokritové kapiláry. Kapiláru utěsníme tmelem, vložíme do hematokritové centrifugy a tři minuty odstřeďujeme při rychlosti 14 000 otáček za minutu. Po odstředění odečteme procento formovaných krevních elementů pomocí hematokritového měřidla a výsledek vynásobíme hodnotou 0,01. Hodnotu hematokritu vyjadřujeme v $l.l^{-1}$. Hodnota hematokritu se u zdravých kaprů obvykle pohybuje v rozmezí od 0,28 do 0,40 $l.l^{-1}$ (Svobodová a kol., 2012).

Diferenciální rozpočet leukocytů (leukogram)

Stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů (relativního zastoupení jednotlivých typů leukocytů v krvi) je náročné a vyžaduje zkušenost, neboť v periferní krvi ryb se kromě zralých krevních elementů běžně vyskytují i nezralé buňky červené i bílé krevní řady. Čím méně je buňka diferencovaná, tím obtížněji se zařazuje k jednotlivým typům.

Krevní nátěry pro stanovení diferenciálního počtu leukocytů zhotovujeme pokud možno ihned po odběru krve. Na suché, čisté podložní sklíčko naneseme kapku plné krve o velikosti špendlíkové hlavičky (5–10 µl), k okraji kapky přiložíme roztěrové sklíčko se zabroušenými rohy a rychlým pohybem roztáhneme kapku po ploše sklíčka. Hotové nátěry necháme zaschnout a obarvíme metodou dle Pappenheima anebo pomocí některého z komerčně dostupných kitů (Svobodová a kol., 2012). Krevní nátěry prohlížíme pod 1 000násobným zvětšením za použití imerzního oleje. Prohlížíme koncovou část nátěru, kde je vrstva buněk nejtenčí. Meandrovitým pohybem prohledáváme krevní nátěr a nalezené leukocyty zařazujeme k jednotlivým typům (lymfocyt, neutrofil, monocyt, eozinofil, bazofil). Vyhodnocujeme 200 leukocytů v nátěru, výsledkem je procentuální zastoupení jednotlivých typů buněk.

Lymfocyty kapra mají velikost 6,6–11,8 µm (Imagawa a kol., 1989). Mají centrálně umístěné kulovité jádro se silně denzním chromatinem a okolo jádra úzký lem bazofilní cytoplazmy (Tripathi a kol., 2004). U některých lymfocytů cytoplazma obklopuje jádro jen okrskovitě. Velké reaktivní lymfocyty mají ve srovnání s malými lymfocyty vyšší podíl cytoplazmy (Tripathi a kol., 2004).

Neutrofilní granulocyty kapra mají velikost 10–15 µm (Imagawa a kol., 1989), kulovitý tvar, segmentované jádro a slabě eozinofilní cytoplazmu, obsahující drobná, nevýrazně se barvící granula (Tripathi a kol., 2004). Mladší vývojová stadia, tzv. tyčky, mají excentricky uložené tyčkovité jádro. Tyčky se u ryb podobně jako u savců zařazují mezi zralé neutrofily.

Eozinofilní granulocyty kapra mají velikost 8–12 µm (Imagawa a kol., 1989). Jejich cytoplazmatická granula jsou větší než u neutrofilních granulocytů a výrazně eozinofilní.

Bazofilní granulocyty kapra mají velikost 10–12 µm, excentricky uložené jádro a modrošedou cytoplazmu (Tripathi a kol., 2004), obsahující silně bazofilní granula (Suzuki, 1986).

Monocyty kapra mají velikost 10–16 µm, oválné nebo ledvinovité jádro a slabě bazofilní cytoplazmu (Imagawa a kol., 1989).

V diferenciálním rozpočtu zdravých ryb výrazně převažují lymfocyty, které u kapra představují 76–97,5 % celkového počtu leukocytů (Svobodová a kol., 2012). Z granulocytární řady jsou nejhojněji zastoupeny neutrofilní granulocyty (Clauss a kol., 2008). Jedním z často stanovovaných parametrů

je poměr neutrofilů a lymfocytů (N : L ratio). Tento poměr se mění například při některých infekčních chorobách, kdy v důsledku vzestupu celkových počtů neutrofilů stoupá i procento neutrofilů v krevním nátěru. Podobný obraz nacházíme i u ryb vystavených stresu, neboť glukokortikoidy produkované v průběhu stresové reakce ovlivňují uvolňování leukocytů z krvetvorných tkání a jejich redistribuci v organizmu. Lymfocyty adherují k endoteliálním buňkám a později migrují do tkání, čímž se snižuje jejich zastoupení v periferní krvi. U cirkulujících neutrofilů naopak glukokortikoidy inhibují migraci do tkání a stimulují uvolňování novotvořených buněk z hematopoetických orgánů (Davis, 2008). U ryb vystavených stresu se zvyšuje také zastoupení nezralých forem neutrofilů (myelocytů a metamyelocytů) (Dobšíková a kol., 2006).

Podrobnější popis jednotlivých typů krevních buněk a interpretace nálezů při hodnocení krevních nátěrů jsou uvedeny v metodice „Stanovení diferenciálního počtu leukocytů ryb" (Piačková a kol., 2014).

Další parametry zjišťované vyšetřením krevního nátěru

Vyšetřením krevního nátěru můžeme hodnotit také změny v morfologii erytrocytů. Morfologické anomálie erytrocytů jsou častým nálezem u ryb vystavených toxickým látkám. Zjišťujeme například změny tvaru a velikosti buněk, malformace jádra, kondenzaci chromatinu na periferii jádra nebo amitózu (Witeska, 2013).

Dále můžeme v krevním nátěru sledovat změny v zastoupení nezralých forem erytrocytů. Zralé erytrocyty kapra mají velikost 10–12 μm. Nezralé formy erytrocytů jsou menší, kulovité nebo krátce oválné, mají kulovité jádro a bazofilní cytoplazmu (Tripathi a kol., 2004). Podíl nezralých forem erytrocytů se zvyšuje při chorobách spojených s krvácením nebo s hemolýzou, ale také při hypoxii, při změnách teploty vody nebo při setkání s některými toxickými látkami (Clauss a kol., 2008). Snížení podílu nezralých erytrocytů signalizuje útlum krvetvorby, ke kterému dochází například při dlouhodobém hladovění (Kondera a kol., 2017).

Vyšetření krevního nátěru je také důležitou součástí diagnostiky při podezření na napadení krevními bičíkovci (*Trypanosoma* spp., *Trypanoplasma* spp.).

Interpretace výsledků

U některých chorob zatím není k dispozici dostatek studií popisujících změny v hodnotách hematologických parametrů. Proto se hematologické vyšetření většinou využívá jen pro doplnění celkového obrazu. Výjimkou je podezření na napadení krevními bičíkovci, u kterého je hematologické vyšetření důležitou součástí diagnostiky. V Tab. 4 jsou uvedeny nálezy popsané různými autory u některých chorob, které je potřeba brát v úvahu z hlediska diferenciální diagnostiky.

Tab. 4. *Změny v hematologických parametrech při některých chorobách objevujících se u kaprů v jarním období.*

Choroba (původce)	Hematologický nález	Literatura
Spavá nemoc kaprů (*Carp edema virus*)	Zvýšení celkových počtů leukocytů, zvýšené procento neutrofilů, snížené procento lymfocytů. Snížení celkových počtů erytrocytů.	Lewisch a kol. (2015)
Jarní virémie karpů (*Carp sprivivirus*)	Zvýšení počtů neutrofilů, monocytů a eozinofilů. U neutrofilů vakuolizace cytoplazmy a jádra. Snížení počtů lymfocytů.	Řehulka (1996)
Trypanoplasmóza (*Trypanoplasma borrelii*)	Snížení celkových počtů erytrocytů, snížení počtů zralých forem erytrocytů, snížení hematokritu. Zvýšení počtů nezralých forem erytrocytů, zvýšení počtů celkových leukocytů, granulocytů a granuloblastů.	Steinhagen a kol. (1990)

2.3.9. Biochemické vyšetření krevní plazmy

Změny v biochemickém profilu krve jsou velmi citlivým indikátorem stavu organizmu ryb. Interpretace výsledků biochemického vyšetření je však obtížná, protože vnitřní stav organizmu je u ryb ovlivněn nejen endogenními faktory (věkem, pohlavím, plemenem a chovnou linií, fází reprodukčního cyklu a zdravotním stavem), ale také mnoha environmentálními faktory, například teplotou vody, obsahem kyslíku, sezónními přírodními cykly a potravní nabídkou (De Pedro a kol., 2005; Arthanari a Dhanapalan; 2015). Proto je vhodné při hodnocení zdravotního stavu ryb porovnat výsledky biochemického vyšetření s výsledky vyšetření klinicky zcela zdravých kontrolních ryb.

Při diagnostice jarních úhynů kaprů má biochemické vyšetření význam především pro posouzení celkového zdravotního stavu obsádky a pro sledování dalšího vývoje onemocnění. Nezastupitelnou úlohu má biochemické vyšetření zejména při podezření na intoxikaci amoniakem exogenního nebo endogenního původu.

Odběr krve

Odběr krve provádíme pokud možno bezprostředně po vylovení ryb. U malých ryb a u plůdku odebíráme krev kardiopunkcí. U větších ryb obvykle provádíme odběr punkcí ocasních cév (Svobodová a kol., 2012). Důležité je odebrat krev šetrně, aby nedošlo k její hemolýze, která může významně ovlivnit výsledky vyšetření.

Získávání krevní plazmy a krevního séra pro biochemické vyšetření

Pro stanovení biochemického profilu se většinou využívá krevní plazma. Při získávání krevního séra může během srážení krve docházet k utilizaci některých složek krevní plazmy, takže hodnoty naměřené v séru nemusí přesně odrážet skutečné hladiny analytů v cirkulující krvi (Hrubec a Smith, 1999).

Pro získání **krevního séra** odebíráme krev bez použití antikoagulačních prostředků. Odebranou krev přeneseme do zkumavky a ponecháme 1 hodinu stát při laboratorní teplotě. Poté zkumavku přesuneme do chladničky a inkubujeme přes noc při 4 °C. Druhý den sraženou krev odstředíme (1 000 x g, 15 minut, 4 °C) a odebereme sérum. Získané sérum buď přímo využijeme k analýze anebo zamrazíme na teplotu minimálně -20 °C (Kolářová a Velíšek, 2012).

Pro získání **krevní plazmy** odebíráme krev do zkumavek s přídavkem antikoagulačních činidel. Ke stabilizaci krve ryb se používá nejčastěji heparin (Walencik a Witeska, 2007) – viz kapitola hematologické vyšetření. Plnou krev po odběru šetrně promícháme s protisrážlivým činidlem opakovaným převracením uzavřené zkumavky. Promíchanou krev odstředíme (1 000 x g, 15 minut, při 4 °C nebo při laboratorní teplotě). Krev by měla být odstředěna co nejdříve po odběru, optimálně do jedné hodiny, a až do odstředění by měla být uchovávána v chladničce (Braceland a kol., 2017). Po odstředění krve odebereme plazmu. V případě, že nelze stanovení biochemického profilu provést bezprostředně po získání plazmy, zamrazujeme vzorky na teplotu minimálně -18 °C.

Ke stanovení biochemického profilu krve se využívají biochemické analyzátory, které umožňují v krátké době změřit velké množství analytů v relativně malém množství plazmy nebo séra.

Biochemické parametry stanovované u ryb

Celková bílkovina

Celková bílkovina představuje souhrn všech proteinů krevní plazmy. U ryb je tento parametr jedním z nejdůležitějších ukazatelů kondice. Stanovení celkové bílkoviny je součástí tzv. zkráceného hematologického kondičního testu (Svobodová a kol., 2012), který slouží například k vyhodnocení kondice ryb před komorováním.

Ke snížení hladiny celkové bílkoviny dochází při hladovění, při poruchách vstřebávání živin a při chorobách spojených s narušením funkce jater, kde je syntetizována převážná většina plazmatických proteinů (Schreiber, 1978).

Při stanovování koncentrace celkové bílkoviny v krevním séru je třeba brát v úvahu absenci fibrinogenu. Při porovnání výsledků měření ve vzorcích

séra a plazmy od stejných jedinců zjišťujeme ve vzorcích séra významně nižší koncentraci proteinů než ve vzorcích plazmy (Bakker a kol, 1992).

Koncentrace celkové bílkoviny v plazmě se u klinicky zdravých kaprů pohybuje v rozmezí 16–45 $g.l^{-1}$ (Kolářová a Velíšek, 2012). Tento parametr má v našich zeměpisných šířkách výraznou sezónní dynamiku související s potravní nabídkou a s intenzitou metabolizmu. Nejvyšší hodnoty celkové bílkoviny byly u ryb zjištěny v létě, nejnižší v zimním období (Svoboda a kol., 2001).

Laktát

Laktát vzniká v organizmu při anaerobní glykolýze. Jeho koncentrace v krvi je odrazem jeho produkce ve tkáních a odbourávání v játrech. Tvorba laktátu se u ryb zvyšuje například při hypoxii nebo při intenzivní tělesné námaze. Vytvořený laktát u ryb přetrvává v krvi déle než u savců, u kostnatých ryb typicky trvá 12–24 hodin, než se po námaze hladina vrátí k původní hodnotě (Hazel, 1993). Odbourávání laktátu je sníženo například při tkáňové hypoxii, při chorobách spojených s postižením jater nebo při poruchách perfuze jater.

Hladina laktátu v krvi se u klinicky zdravých kaprů pohybuje mezi 0,52–6,32 $mmol.l^{-1}$ (Kolářová a Velíšek, 2012).

Amoniak

Amoniak je u sladkovodních ryb hlavním konečným produktem metabolizmu dusíkatých látek. Vzniká převážně deaminací aminokyselin, především v játrech, v ledvinách, ve svalovině a ve střevě. Většina vyprodukovaného amoniaku je u ryb vylučována žábrami, menší část (u kapra pouze 4 %) odchází z těla močí (Smutná a kol., 2002).

Při náhlé změně podmínek vnějšího prostředí může dojít k narušení rovnováhy mezi produkcí a exkrecí amoniaku, ke zvýšení jeho koncentrace v krvi a k tzv. autointoxikaci. Vylučování amoniaku z organizmu se snižuje při náhlém poklesu teploty vody nebo při náhlém poklesu koncentrace kyslíku ve vodě. Další příčinou může být zvýšení pH vody. Amoniak je ve vodném prostředí přítomen v nedisociované formě (NH_3) a jako amonný iont (NH_4^+). Poměr těchto dvou forem závisí na hodnotě pH. Čím vyšší je pH vody, tím více je ve vodě zastoupena nedisociovaná forma amoniaku. Důsledkem je snížení koncentračního gradientu NH_3 mezi vodou a žábrami, jeho pomalejší vylučování z organizmu a vzestup koncentrace v krvi ryb. Exkrece amoniaku může být narušena i při poškození žaber (Svobodová, 2019). Koncentrace amoniaku v krvi po vylovení ryb stoupá, protože jejich žábry nejsou omývány vodou, a nemůže být proto vylučován (Ip a Chew, 2010).

Koncentrace amoniaku v krvi ryb je velmi variabilní. U klinicky zdravých kaprů se pohybuje v zimním období v rozmezí 50–100 $\mu mol.l^{-1}$, ve vegetačním období v rozmezí 500–700 $\mu mol.l^{-1}$ (Svobodová, 2019).

Autointoxikaci amoniakem zahrnujeme do diferenciální diagnostiky jarních úhynů kaprů především v teplých jarních měsících.

Triglyceridy (TAG)

Koncentrace triglyceridů se využívá jako indikátor lipidového metabolizmu. U kapra se hodnoty plazmatických triglyceridů pohybují v rozmezí 0,49–2,83 mmol.l^{-1} (Kolářová a Velíšek, 2012).

Glukóza

Koncentrace glukózy je u ryb využívána především jako jeden z indikátorů stresu (Lee a kol., 2014). Během stresové reakce dochází k mobilizaci energetických rezerv organizmu; katecholaminy uvolňované do cirkulace stimulují glukoneogenezi v játrech a zvyšují glykogenolýzu, v důsledku čehož stoupá hladina glukózy v krvi (Jentoft a kol., 2005). Hladina glukózy je však u ryb ovlivněna i mnoha dalšími faktory, například teplotou vody, obsahem kyslíku, sezónními cykly nebo výživou (Polakof a kol, 2012).

Enzymy

Intracelulární enzymy jsou uvolňovány do cirkulace při poškození tkání. U mírného poškození dochází ke změně permeability buněčných membrán a v krvi se objevují cytosolické enzymy. U závažnějšího poškození spojeného s nekrózou buněk nacházíme v krvi i mitochondriální enzymy. Některé enzymy jsou orgánově nespecifické, jiné jsou ve větší míře obsaženy v určitých tkáních a orgánech a mohou sloužit jako indikátory jejich poškození. Koncentrace některých klinicky významných enzymů naměřené v plazmě zdravých kaprů jsou uvedeny v Tab. 5.

Aspartátaminotransferáza (AST) je mitochondriální a cytosolický enzym, který je ve větší míře obsažen v řadě orgánů (játra, srdce, kosterní svalovina, ledviny (Sampath a Manavalaramanujam, 2002). Aktivita AST v plazmě je využívána jako indikátor poškození jater a kosterní svaloviny. AST je obsažena také v erytrocytech, její aktivita v plazmě se zvyšuje při hemolýze.

Alaninaminotransferáza (ALT) je obsažena především v játrech, v jiných orgánech je její obsah podstatně nižší. Na rozdíl od AST je lokalizována pouze v cytosolu. Je relativně citlivým markerem poškození hepatocytů. Uvolňuje se z buněk už při mírném poškození a její aktivita v plazmě dobře koreluje s rozsahem poškození jater (Knudsen a kol., 2016).

Laktátdehydrogenáza (LDH) je orgánově nespecifický cytosolický enzym, který se uvolňuje do krve už při mírném poškození. Její aktivita v plazmě představuje nespecifický, ale velmi citlivý indikátor tkáňového poškození (Yousaf a Powell, 2012).

Kreatinkináza (CK) je obsažena především v srdci, v kosterní svalovině a v mozku. Je využívána jako indikátor poškození srdce a svalstva (Yousaf a Powell, 2012).

Lipáza je obsažena především v pankreatu a v menší míře i ve sliznici tenkého střeva a v játrech. Zvýšení aktivity lipázy v plazmě je indikátorem poškození pankreatické tkáně.

Alkalická fosfatáza (ALP) je membránově vázaný enzym, obsažený především v játrech a v kostech. Aktivita v plazmě je využívána jako indikátor poškození hepatobiliárního systému.

Tab. 5. *Koncentrace enzymů naměřené v krevní plazmě zdravých kaprů (Kolářová a Velíšek, 2012).*

	Aktivita (μkat.l^{-1})
Aspartátaminotransferáza (AST)	0,55–6,64
Alaninaminotransferáza (ALT)	0,10–1,60
Kreatinkináza (CK)	11,98–18,70
Lipáza	0,0–1,48
Laktát dehydrogenáza (LDH)	9,9–22,0
Alkalická fosfatáza (ALP)	0,05–1,72

Ionty

Sladkovodní ryby žijí v prostředí, které je ve srovnání s jejich tělem hypotonické, takže jejich tělo má tendenci přijímat vodu a ztrácet ionty. Osmolalitu tělních tekutin udržují aktivním příjmem iontů z prostředí (především žábrami) a produkcí velkého množství hypotonické moči, z níž je většina iontů reabsorbována zpět do krve. Poruchy iontové rovnováhy mohou být způsobeny poškozením žaber nebo ledvin. Další možnou příčinou je stres, u kterého se zvyšuje průtok vody přes žábry a následně i příjem vody žábrami. Přebytečnou vodu ryby vylučují ledvinami, což je spojeno se zvýšenými ztrátami elektrolytů (Greenwell a kol., 2003). K narušení iontové rovnováhy dochází i při pobytu ve vodě o nevhodném pH a při vystavení ryb polutantům (Mathan a kol., 2010).

Sodík je hlavním extracelulárním kationtem. Má význam pro udržování osmolality krve a acidobazické rovnováhy. Jeho hladina je regulována žábrami a ledvinami, u sladkovodních ryb se většina sodíku reabsorbuje zpět do krve.

Draslík se v těle účastní řady metabolických procesů. Je nezbytný pro správné fungování nervosvalového přenosu v srdci a ve svalech. Nachází se ve všech buňkách v těle. Jeho koncentrace v buňkách je mnohanásobně vyšší než v extracelulárních tekutinách (Furukawa, 2012). Hladina draslíku v plazmě se zvyšuje při masivním rozpadu buněk, dále v počáteční fázi stresové reakce (Martemyanov, 2014) anebo při pobytu ryb ve vodě o nízkém pH (Mathan a kol., 2010). Ke ztrátám draslíku může dojít při poškození žaber nebo ledvin.

Chlor je nezbytný pro udržování acidobazické a osmotické rovnováhy. Chloridy jsou u sladkovodních ryb přijímány do těla především chloridovými buňkami žaber. V ledvinách se většina chloridů reabsorbuje zpět do krve (Greenwell a kol, 2003).

Vápník představuje jeden z důležitých parametrů pro hodnocení vnitřního prostředí především v souvislosti s nervosvalovou dráždivostí a s posuzováním funkčních změn metabolizmu kostí.

2.3.10. Hydrochemická analýza

Odběr vzorků a terénní analýzy

Základním a nezbytným předpokladem správnosti a použitelnosti výsledků provedeného šetření je odborně provedený odběr vzorků vody a jejich správné skladování do provedení analýz. Vzorky vody se nedoporučuje odebírat v blízkosti břehu rybníka, ale alespoň 1 až 2 m od břehu. K takovému odběru je ideální použít lahev upevněnou na teleskopické tyči. U větších rybníků (nad 5 ha) je vhodnější provádět odběry z více míst za použití loďky a vždy vzorky vody odebírat jak u hladiny, tak z hloubky odpovídající průměrné velikosti vodního sloupce. Při odběru směsného vzorku se odebírají vzorky u hladiny, středu vodního sloupce a nade dnem. Při ponořování lahve a odběru vzorku se musí postupovat velmi opatrně, aby nedošlo ke zvíření bahna nebo jiných usazenin. Máme-li podezření na kontaminaci přítokové vody, je potřeba odebrat vodu i z přítoku do rybníka. Objem vzorku potřebný pro analýzu je dán rozsahem požadovaného rozboru a také výběrem metod, kterými se analýzy budou provádět. Pro běžně stanovované ukazatele postačuje obvykle odběr 2 litrů vody. Při podezření na otravu v důsledku kontaminace vody toxickými látkami je třeba zkontrolovat přítomnost a stav zooplanktonu a fytoplanktonu. V případě, že jsou tyto organizmy ve vodě přítomné a nejeví známky poškození, je možno s velkou pravděpodobností kontaminaci vody toxickou látkou vyloučit, neboť tyto organizmy jsou obvykle ve srovnání s rybami vůči většině toxických látek o 2–3 řády citlivější. V opačném případě, zvláště při podezření na otravu pesticidy, je doporučován odběr 4 litrů vody podle Vyhlášky č. 327/2012 Sb. (ve znění pozdějších předpisů). Vzorek se odebírá do skleněných nebo plastových lahví. Dobře se osvědčují PET lahve od neochucené stolní vody. Pro získání spolehlivých výsledků je potřeba co nejvíce zkrátit dobu mezi odběrem vzorku a jeho analýzou. Pro přepravu vzorků je nutné používat tepelně izolované brašny. Odebrané vzorky vody se po převozu do laboratoře skladují v chladničce při teplotě 4 °C. Doba skladování by měla být co nejkratší a pokud možno by neměla překročit 24 hodin. V laboratořích se provádí základní hydrochemický rozbor, jehož rozsah závisí na okolnostech, které jsou

dávány do souvislosti s úhynem ryb. V případě rybniční vody se běžně sledují následující parametry kvality vody: pH, kyselinová neutralizační kapacita do pH 4,5 – $KNK_{4,5}$, dusík amoniakální – N-(NH_3 + NH_4^+), dusík dusičnanový – N-NO_3^-, fosfor fosforečnanový – P-PO_4^{3-}, fosfor celkový – $P_{celk.}$, chemická spotřeba kyslíku manganistanovou metodou – $CHSK_{Mn}$, biochemická spotřeba kyslíku za 5 dní – BSK_5, dusíkaté látky – NL. Speciální analýzy (stanovení ropných látek, pesticidů, kyanidů apod.) se provádějí jen v určitých specifických případech. Jedná se zejména o hodnocení havarijních situací, kde se na základě anamnézy dá předpokládat, že mohlo dojít k úniku (splachu) nějakých toxických látek do rybníka.

Některé parametry kvality vody, jako jsou např. teplota, koncentrace kyslíku, pH, průhlednost, barva a zápach, se musí stanovit ihned na místě při odběru. K tomu účelu se využívají přenosné (terénní) přístroje (oxy- a pH-metry) a další pomůcky (Secciho deska na stanovení průhlednosti vody). Dále je možno provádět přímo na místě odběru některé zjednodušené analýzy, které umožní získat základní informace o kvalitě vody přímo v terénu. K tomu účelu se používá např. Combi souprava (Valentová a kol., 2009). Pomocí této soupravy lze stanovit průhlednost a barvu vody, hodnotu pH, kyselinovou neutralizační kapacitu, koncentraci rozpuštěného kyslíku, koncentraci amonných iontů, koncentraci ortofosforečnanů. Na trhu jsou dostupné i jiné sety dodávané různými firmami, které umožňují provádět jednoduché analýzy těchto i dalších parametrů kvality vody. Takto provedené analýzy samozřejmě neposkytují úplně přesné výsledky, ale zejména v případech havarijních stavů a úhynů ryb poskytnou cenné okamžité informace, které se poté ověřují přesnými laboratorními analýzami (Valentová a kol., 2013).

Teplota vody

Teplota vody je jedním z významných faktorů, které ovlivňují nejen její kvalitu, ale také (a to především) intenzitu metabolizmu vodních organizmů a rychlost probíhajících biochemických procesů. Podrobné údaje k problematice teploty vody v souvislosti s chovem ryb uvádí Máchová a Svobodová (2014), odkud jsou čerpány dále uvedené stručné informace vztažené k problematice jarních úhynů ryb.

Jak je všeobecně známo, ryby jsou poikilotermní živočichové. To znamená, že teplota jejich těla se mění s teplotou vody, ve které žijí. Optimální teplota pro růst a vývoj kaprovitých ryb je 18 až 28 °C. V oblasti střední Evropy (mírného pásma) jsou ryby schopné ve svém přirozeném prostředí snadno tolerovat sezónní změny teploty vody, tj. pokles na 0 °C v zimním období a vzrůst na 20 až 30 °C v létě. Dá se tedy říci, že kapr se dokáže přizpůsobit značně širokému rozmezí teplot. Nebezpečí však představují náhlé změny

teploty. Při náhlé změně teploty o 12 °C a více dochází u ryb k teplotnímu šoku, který může vyvolat i jejich úhyn. Podstatně vyšší citlivost k teplotním změnám vykazují raná vývojová stadia ryb, kde by náhlé teplotní změny neměly překračovat 3 °C. Na rozdíly teplot je třeba si dávat pozor např. při vysazování váčkového plůdku, který je odchováván v líhních při teplotě kolem 20 °C a poté je vysazován do rybníků. Děje se tak obvykle v květnu, kdy se teplota vody v rybnících pohybuje kolem 15 °C a za nepříznivého počasí může být i nižší (Svobodová a kol., 1987). Při přesazení nakrmených ryb do chladnější vody (o 5 až 8 °C a případně více) dochází k poruchám nebo úplnému zastavení procesu trávení. Kvašením nestrávené nebo částečně natrávené potravy vznikají v trávicím ústrojí plyny, jejichž nahromadění způsobuje zvětšení tělní dutiny, ztrátu rovnováhy a úhyn ryb. V důsledku náhlého snížení intenzity metabolizmu dochází i ke snížení vylučování amoniaku přes žaberní ústrojí a zvyšuje se jeho koncentrace v krevní plazmě. To vede k autointoxikaci amoniakem a k následnému úhynu. Z toho důvodu je třeba věnovat pozornost teplotě vody i při transportu ryb, kdy jsou ryby vystavovány velkému stresu, který pro ně představuje jak jejich odlov, tak transport.

Metoda stanovení: teplota vody se měří teploměrem při odběru vzorků, další možnost poskytují pH-metry a oxymetry, jejichž součástí jsou též čidla na měření teploty. Na počátku jara bývá teplota vody v celém sloupci vyrovnaná. S postupujícím jarem, zvláště na jeho konci, v závislosti na hloubce a průtočnosti nádrže a na celkových povětrnostních podmínkách, může vznikat stratifikace. Proto je pro objektivní posouzení teploty vody třeba provádět měření nejen u hladiny, ale i v různých hloubkách, a na základě zjištěných hodnot je možno posoudit, zda došlo k vytvoření stratifikace. V posledních letech, kdy se typicky jarní teploty mnohdy vyskytují jen na počátku jara a teplota vody poté rychle stoupá, můžeme stratifikaci zaznamenat již velmi brzy.

Průhlednost a barva vody

Průhlednost je závislá na barvě a zákalu vody. U rybníků s většími obsádkami kapra (v důsledku rytí ryb ve dně) se vyskytuje zákal, který je vegetačního i abiotického (jílového) původu. Po prudkých deštích se v rybnících objevuje zákal převážně abiotického původu v důsledku splachů. Změna průhlednosti však nastává i v průběhu bouřek nebo působením silného větru, díky kterému se poruší stratifikace a dojde ke změně původního rozložení organizmů ve vodě (např. při bouřkách). Při zvýšení průhlednosti je nutno počítat s hlubším prosvětlením vodního sloupce (mnohdy až ke dnu), což umožňuje růst makrofyt, která v rybnících s nízkou průhledností nenajdeme.

U vysoce eutrofních (poly- až hypertrofních) a organicky zatížených rybníků se doporučuje měřit průhlednost vody zejména v jarním období častěji (jednou až dvakrát týdně nebo i častěji, pokud se zvyšuje průhlednost vody a narůstá biomasa hrubého dafniového zooplanktonu). Změny průhlednosti mohou predikovat důležité změny v hydrobiologických i hydrochemických poměrech. **Zelený zákal** a **zmenšující se průhlednost** signalizují rozvoj fytoplanktonu a tím i případné zvyšování hodnot pH. Naopak rychle se **zvyšující průhlednost** signalizuje úbytek fytoplanktonu, ke kterému dochází v důsledku intenzivního vyžíracího tlaku převážně hrubého dafniového zooplanktonu. Takový stav nastává při snížení vyžíracího tlaku rybí obsádky, jehož příčinou může být zhoršení zdravotního stavu ryb, nebo dokonce jejich úhyn či provedený odlov. V každém případě je náhlé a výrazné zvýšení průhlednosti vody signálem pro zvýšení pozornosti, kterou je nutno věnovat zdravotnímu stavu obsádky. Současně je nutné se připravit na možnost nástupu kyslíkového deficitu v důsledku přemnožení hrubého zooplanktonu a úbytku fytoplanktonu – producenta kyslíku. Běžné hodnoty průhlednosti vody v rybnících by se ve vegetačním období měly pohybovat řádově v desítkách cm.

Nazelenalá barva vody indikuje přítomnost fytoplanktonu. Naopak tmavohnědá nebo našedlá barva s jílovitým zákalem indikuje, že rybí obsádka nemá k dispozici dostatek planktonní potravy a ryje ve dně. Silný zákal může vyvolat sníženou prostupnost světla a omezení fotosyntetické činnosti.

Metoda stanovení: k měření průhlednosti vody se používá Secciho deska. Jedná se o desku kruhového tvaru o průměru cca 10 cm nebo čtvercovou desku o délce hrany 10 cm. Plocha desky je rozdělena na kvadranty, které jsou vybarveny střídavě bílou a černou barvou. Deska je zavěšena na provázku, nebo upevněna na tyči a ponořuje se pod hladinu. V momentě, kdy se deska „ztratí“ (přestane být vidět), odečte se hloubka ponoření (tedy průhlednost vody). Barva vody se potom posuzuje při ponoření desky do poloviny hloubky průhlednosti proti bílému terči na Secciho desce.

Kyslík

Kyslíkový deficit je velmi častou příčinou zdravotních problémů i havarijních úhynů ryb. Dochází k němu v případě, že jeho spotřeba je větší než dotace z atmosféry a z fotosyntetické asimilace zelených organizmů (fytoplanktonu, makrofyt). Potenciální nebezpečí vzniku kyslíkového deficitu roste se stoupající teplotou a množstvím biologicky rozložitelných látek přítomných ve vodním prostředí, neboť při jejich aerobním rozkladu se značné množství kyslíku spotřebuje. S narůstající teplotou se rychlost rozkladu zvyšuje, a navíc klesá rozpustnost plynů (a tedy i kyslíku) ve vodě. Zdrojem organických látek v rybnících může být např. nedostatečně zmineralizovaná biomasa

z předchozího vegetačního období, splach ornice z okolních pozemků při přívalových deštích nebo rychlém tání sněhu nebo zbytky krmiva, které rybí obsádka z nějakých důvodů nespotřebuje. Stálé nebezpečí také představuje hnojení rybníků, které je často neopodstatněné, a to i přesto, že bylo příslušným vodohospodářským subjektem povoleno. Pokud po aplikaci organického hnojení dojde k rychlému nárůstu teploty vody, vytvoří se kyslíková stratifikace. Rychlý rozklad organické hmoty vede k odčerpání kyslíku a vytvoří se tak anoxické, nebo dokonce anaerobní podmínky, které postihují významný podíl vodního sloupce. Za takových okolností se ryba zdržuje při hladině a stává se tak snadnou kořistí rybích predátorů. Navíc, promíchání obsahu celé nádrže, ať je vyvoláno jakýmkoliv podnětem (bouřka, prudký vítr, náhlé ochlazení nebo instalace a provoz aeračního zařízení), vede k hlubokému kyslíkovému deficitu, a to v celém vodním sloupci. Ryby potom nemají možnost najít zóny s lepšími kyslíkovými poměry. Tato situace je nebezpečná zvláště pro ryby, které mají trávicí trakt naplněný předkládanou potravou.

Deficit kyslíku může být též vyvolán neúměrně vysokou rybí obsádkou, s čímž se můžeme setkat zejména v menších nádržích provozovaných začínajícími chovateli. Provozovatelé takových rybníčků mnohdy nedají do souvislosti nároky ryb s objemem vody, který je v nádrži. Ryby chované v běžných rybnících mají k dispozici v přepočtu i více než 10 m^3 vody na 1 kg hmotnosti ryb i při relativně vysoké obsádce 1 $t.ha^{-1}$ při hloubce 1 m.

Kritické hodnoty koncentrace kyslíku v rybnících s narušeným kyslíkovým režimem se objevují v brzkých ranních hodinách (ještě před východem slunce), neboť díky absenci světla zelené organizmy kyslík neprodukují, ale naopak disimilují, tedy kyslík spotřebovávají. Problémy s kyslíkem se dostavují také při devastaci fytoplanktonu, příp. makrofyt, ať je již příčina jejich poškození jakákoli (např. neúměrně silný vyžírací tlak zooplanktonu nebo poškození zelených organizmů v důsledku kontaminace vodního prostředí herbicidy s algicidním účinkem). V případě poškození fytoplanktonu algicidním přípravkem je nutno počítat s tím, že na jedné straně dochází k omezení produkce kyslíku a na straně druhé vzrůstá jeho spotřeba v souvislosti s biologickým rozkladem takto vzniklé organické hmoty.

Velmi specifickým příkladem, který popisujeme níže, je vznik kyslíkového deficitu vyvolaný nadměrným rozvojem hrubého dafniového zooplanktonu.

Všechny okolnosti vedoucí k tomuto stavu jsou podrobně popsány v metodice autorů Faina a kol. (2007), zkrácený popis převzatý z této metodiky uvádíme níže.

Jedná se o situaci, ke které opakovaně docházelo v jarním období (konec dubna až začátek května) na jednom vysoce eutrofním a organicky zatíženém produkčním rybníku, který sloužil také jako stabilizační rybník. Při dnešním

zatížení rybničních vod intenzivním přikrmováním se do této úrovně dostávají i běžné chovné rybníky.

Prvotní příčinou vzniku níže popsaných problémů byla vysoká trofická úroveň, organické zatížení vody a změny jejího chemizmu, ke kterým dochází právě na začátku jara, kdy se začíná rozvíjet fytoplankton. Na počátku vegetační sezony voda vykazovala vysoké koncentrace živin (fosforu a dusíku, který byl převážně ve formě amoniaku). Díky rozvoji fytoplanktonu, jehož intenzivní fotosyntetickou asimilací byl z vody odčerpáván oxid uhličitý z uhličitanového systému, se snižovala neutralizační kapacita vody a zvyšovalo pH vody na hodnoty vyšší než 10. V tomto období (kdy ve vodě ještě přetrvávaly poměrně vysoké koncentrace celkového amoniaku a již nastoupily vysoké hodnoty pH), byly do rybníka vysazeny ryby. V takových podmínkách je podstatná část z celkového amoniaku přítomna v nedisociované (pro ryby toxické) formě – (viz dále odstavec „Amoniak"). Při zvýšené koncentraci toxického amoniaku ve vodě nejsou ryby schopné amoniak (hlavní produkt metabolizmu bílkovin) z těla vylučovat, a dochází tak k autointoxikaci. Navíc, vysoké hodnoty pH a vysoké koncentrace amoniaku poškodily rybám žábry, což vyústilo v toxickou nekrózu žaber. Vzhledem k tomu, že v tomto období bývá ve vodě v průběhu dne dostatek kyslíku (za dne vysoké přesycení), jsou ryby po určitou dobu schopny tyto nepříznivé podmínky tolerovat. Avšak díky jejich zhoršenému zdravotním stavu ryby přestávaly jevit zájem o potravu. To znamená, že zooplankton přestal být regulován vyžíracím tlakem ryb a došlo k jeho přemnožení. Přemnožený zooplankton velmi rychle redukoval přítomný fytoplankton – producenta kyslíku. Následkem úbytku fytoplanktonu klesla koncentrace chlorofylu a velmi rychle a významně vzrostla průhlednost vody[1] (během dvou až tří dnů z několika centimetrů na 1 m a více). Produkce kyslíku tak prudce klesla (během jednoho až dvou dnů z původního přesycení až na deficitní koncentrace i v průběhu dne). Ryby tak byly vystaveny nedostatku kyslíku (na vzniku deficitu se v tomto případě dominantně podílely převážně velké druhy perlooček). Ryby v té době měly poškozené žábry, což negativně ovlivňovalo možnost výměny plynů. Celá tato situace obvykle vyústila v havarijní úhyn velké části obsádky.

Poznámka: V případě, že lze zaznamenat u většiny přítomných perlooček červené zbarvení, znamená to, že si perloočky vyrobily červené krevní barvivo, což jim umožnilo dlouhodobější přežití silné anoxie. Je to tedy jeden z důkazů, že se vodní prostředí nachází nebo nacházelo v hluboké anoxii (červené zbarvení u perlooček přetrvává po určitou dobu i po odeznění nepříznivých kyslíkových poměrů).

---

[1] právě náhlý vzrůst průhlednosti vody představuje varovný signál pro blížící se deficit kyslíku

Metoda stanovení: jak již bylo zmíněno, koncentraci kyslíku ve vodě nelze v laboratoři stanovit v běžně odebraném vzorku vody, neboť se jeho obsah díky probíhajícím biologickým a biochemickým pochodům velmi rychle mění. Z tohoto důvodu je nutno stanovení koncentrace kyslíku provést ihned v terénu. K tomuto účelu je možno použít některý přenosný bateriový oxymetr, nebo alespoň provést na místě fixaci vzorku. Potřebná činidla pro fixaci vzorku jsou obsažena například v Combi soupravě (Valentová a kol., 2009). Měření koncentrace rozpuštěného kyslíku je třeba provádět nejen u hladiny (tam bývají koncentrace nejvyšší), ale také hlouběji (např. cca 40 cm pod hladinou a podle okolností ještě ve větších hloubkách. Pokud je k dispozici oxymetr, ponoříme sondu do požadované hloubky a v případě, že se koncentrace rozpuštěného kyslíku měří ve speciálně odebraném vzorku vody, je třeba odběr učinit pomocí Hrbáčkovy odběrové lahve, která je součástí vybavení soupravy COMBI.

pH

Hodnota pH významně ovlivňuje chemické a biochemické procesy a formy výskytu řady látek ve vodách přítomných, a tím i jejich rozpustnost a toxicitu. Proto je stanovení hodnoty pH nezbytnou součástí každého chemického rozboru. Z parametrů, které jsou důležité pro rybniční vodu, připadá v úvahu především amoniak. V tomto případě je hodnota pH vody natolik významná, že bez její znalosti nelze vůbec odhadovat potenciální nebezpečí, které rybám a dalším vodním organizmům při výskytu zvýšených koncentrací amoniaku hrozí (viz následující odstavec „Amoniak“). Samozřejmě, i v případě kontaminace vodního prostředí cizorodými látkami, které vnikly do vody při haváriích, je hodnota pH v mnohých případech velmi důležitý faktor, který nám může pomoci při odhalování příčiny poškození ryb.

V jarním období je nejčastějším problémem zvyšování hodnot pH v důsledku fotosyntetické činnosti zelených organizmů (v tomto případě nejsou výjimkou hodnoty pH 10 a výše). Dále, zejména v případě menších nádrží, může dojít k náhlému zvýšení hodnot pH při stavebních úpravách prováděných v blízkém okolí, kdy v důsledku špatného zabezpečení stavby uniknou do vody cementové směsi. V tomto případě je třeba připomenout, že tyto směsi obsahují též amonné sloučeniny, takže je rybí obsádka ohrožena nejen vysokými hodnotami pH, ale také otravou volným (toxickým) amoniakem. K náhlému snížení hodnot pH v rybnících (např. z pH 9 na neutrální hodnoty) může dojít při poškození populace fytoplanktonu, i když voda ještě vykazuje nazelenalý zákal. Děje se tak např. při poškození fytoplanktonu některým z herbicidů s algicidním účinkem. I když takové snížení hodnot pH samo o sobě nepředstavuje pro ryby nebezpečí, je třeba si uvědomit, že může být varováním před hrozícím kyslíkovým deficitem. Nízkými hodnotami pH (a to i pH < 4,5) jsou spíše

ohroženy chovy ryb v recirkulačních systémech, kde je třeba hodnoty pH důsledně kontrolovat, neboť dochází k jejich snižování v důsledku probíhající nitrifikace.

Metoda stanovení: stanovení hodnoty pH je rovněž nutné provést ihned na místě, neboť hodnoty pH se stejně jako koncentrace kyslíku mohou měnit v důsledku probíhajících biologických a biochemických procesů. Ke stanovení se běžně využívá přenosný pH-metr nebo kolorimetrická metoda, která je součástí Combi soupravy, případně jiného terénního setu.

Amoniak

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.3.9. Biochemické vyšetření krevní plazmy, amoniak se ve vodách vyskytuje ve **dvou formách**, a to ve formě **disociované** (**NH_4^+**), která není pro ryby výrazně toxická, a ve formě **nedisociované,** „volné“ **(NH_3**), která je pro ryby silně toxická. O tom, která z těchto dvou forem ve vodě převažuje, rozhodují především hodnoty **pH** a **teploty** vody. V laboratorních protokolech o výsledcích chemických analýz vody jsou však výsledky běžně uváděny jako NH_4^+ (nebo slovně jako amonné ionty), případně jako N-NH_4^+ (nebo slovně jako amoniakální dusík). Ve skutečnosti se ale vždy jedná o koncentraci **celkového amoniaku**, tedy o součet obou forem NH_3 + NH_4^+ nebo o koncentraci **celkového amoniakálního dusíku**, tedy N-(NH_3 + NH_4^+). Je tomu tak proto, že používanými analytickými metodami pro stanovení amoniaku ve vodě se nerozliší jednotlivé formy jeho výskytu. Nás ale především zajímá koncentrace volného (toxického) amoniaku, který musíme dopočítat na základě zjištěné koncentrace celkového amoniaku, hodnoty pH a teploty vody a znalosti podílu toxického amoniaku za daných podmínek. Způsob výpočtu koncentrace volného amoniaku je uveden například ve skriptech Valentová a kol. (2013), kde je rovněž uvedena tabulka procentuálního podílu toxického amoniaku za dané teploty a pH vody (Tab. 6). Tyto tabulky jsou běžně dostupné i v dalších publikacích (namátkou Pitter, 2015, Horáková a kol., 2005).

Tab. 6. *Závislost koncentrace nedisociovaného (volného) amoniaku na teplotě a hodnotě pH v procentech z celkového amoniakálního dusíku (Valentová a kol., 2013).*

	t °C					
pH	**0**	**5**	**10**	**15**	**20**	**25**
7,0	0,082	0,12	0,175	0,26	0,37	0,55
7,2	0,13	0,19	0,28	0,41	0,59	0,86
7,4	0,21	0,30	0,44	0,64	0,94	1,36
7,6	0,33	0,48	0,69	1,01	1,47	2,14
7,8	0,52	0,75	1,09	1,60	2,32	3,35
8,0	0,82	1,19	1,73	2,51	3,62	5,21
8,2	1,29	1,87	2,71	3,91	5,62	8,01
8,4	2,02	2,93	4,23	6,06	8,63	12,13
8,6	3,17	4,57	6,54	9,28	13,02	17,95
8,8	4,93	7,05	9,98	13,95	19,17	25,75
9,0	7,60	10,73	14,95	20,45	27,32	35,46
9,2	11,53	16,00	21,79	28,95	37,33	46,55
9,4	17,12	23,19	30,36	39,23	48,56	57,99
9,6	24,66	32,37	41,17	50,58	59,94	68,63
9,8	34,16	43,14	52,59	61,86	70,34	77,62
10,0	45,12	54,59	63,74	71,99	78,98	84,60
10,2	56,58	65,58	73,59	80,29	85,63	89,70
10,4	67,38	75,12	81,54	86,59	90,42	93,24
11,0	89,16	92,32	94,62	96,26	97,41	98,21

Amoniakální dusík (amoniak) je primárním produktem rozkladu organických dusíkatých látek živočišného a rostlinného původu. Do rybniční vody se může také dostávat splachem ze zemědělsky obdělávaných ploch v okolí rybníků, které jsou hnojeny dusíkatými hnojivy. Amoniak je rovněž hlavním metabolickým produktem ryb, zooplanktonu a dalších vodních organizmů. Produkce amoniaku rybami je velice rozdílná a souvisí s množstvím a kvalitou přijímané potravy, teplotou vody a dalšími faktory. Podle našich měření, která jsme prováděli u různých věkových kategorií kapra obecného za různých podmínek, je nutno počítat s produkcí amoniaku až 300 $mg.kg^{-1}.den^{-1}$ (Máchová a kol., zatím nepublikované výsledky). Koncentrace amoniaku rovněž vzrůstá při aplikaci chlévské mrvy, kterou rybáři do rybníků v jarním období mnohdy aplikují s cílem zvýšit trofickou úroveň vody. V takových případech, zvláště po nástupu rozvoje fytoplanktonu, kdy dojde ke zvýšení hodnot pH, lze očekávat problémy s vysokými koncentracemi toxického amoniaku.

Vznikající amoniak je průběžně využíván fytoplanktonem (přednostně před dusičnany) a na snížení jeho koncentrace se rovněž podílí nitrifikace (biochemická oxidace amoniaku na dusitany a dusičnany). Část amoniaku

se za vysokých hodnot pH také odvětrává. Nebezpečí otravy ryb amoniakem vzrůstá za špatných kyslíkových poměrů a naplnění trávicího traktu ryb zejména předkládaným krmivem, a to včetně cereálií.

Metoda stanovení: orientační hodnoty je možné získat ihned při odběru pomocí Combi soupravy, případně jiných komerčních setů. Vzhledem k tomu, že se jedná o kolorimetrickou metodu stanovení, i zde je nutné počítat s možným zkreslením výsledků v případě přítomnosti jakéhokoli zákalu vody a získané výsledky posuzovat s určitou rezervou. Zvláště v těchto případech je vhodné zjištěné koncentrace amoniaku nechat ověřit v hydrochemické laboratoři, kde se výsledné hodnoty korigují s ohledem na přítomný zákal či zbarvení vody.

Organické látky

Problémy s organickými látkami souvisí obvykle s výskytem deficitů kyslíku a s tvorbou jedovatých plynů (zejména amoniaku a sulfanu[2]). Až na výjimky se jedná o problémy, které se vyskytují spíše v průběhu a na konci léta, kdy dochází k postupnému odumírání fytoplanktonu, případně makrofyt.

Metoda stanovení: vzhledem k tomu, že je ve vodách přítomno velké množství různých organických látek, je separace a identifikace jednotlivých látek velmi složitá a pro účely sledování kvality vody v rybnících není ani úplně nutná. Existují však metody, které umožňují vystihnout celkový obsah organických látek ve vodě, a vyjádřit tak míru celkového znečištění vody. V běžné vodohospodářské praxi jsou ke stanovení obsahu organických látek využívány metody nepřímé, založené na chemické nebo biochemické oxidaci přítomných organických látek. Organické látky v přírodních vodách totiž podléhají biochemické i chemické oxidaci spojené se spotřebou kyslíku. Z toho důvodu se u nepřímých metod vyjadřuje obsah organických látek údajem o spotřebě kyslíku na jejich oxidaci. Základními nepřímými metodami určování obsahu organických látek ve vodách jsou stanovení chemické spotřeby kyslíku (CHSK) a stanovení biochemické spotřeby kyslíku (BSK). V určitých specifických případech může dojít k tomu, že hodnota BSK dává falešně negativní výsledek, přestože voda obsahuje rozpuštěné biologicky odbouratelné organické látky. Stane se tak v případě, že v rybniční vodě dojde k přemnožení hrubého zooplanktonu, který je schopen významně snížit množství bakterií ve vodě, a při stanovení BSK nedochází k rozkladu, a tedy ke spotřebě kyslíku, v důsledku absence bakteriálního inokula. V tom případě je možné při odhadu skutečné BSK vycházet z hodnoty $CHSK_{Mn}$, která z hlediska saprobního odpovídá zhruba dvojnásobku skutečné hodnoty BSK. Další možností je samozřejmě inokulace

[2] Výskyt sulfanu můžeme zaznamenat i v zimním období v rybnících, které byly letněny a před napuštěním rybníka nebyla odstraněna vyprodukovaná rostlinná biomasa.

analyzovaného vzorku bakteriální kulturou, avšak vzhledem k tomu, že absence bakterií v rybniční vodě trvá jen krátce, není nutné tuto modifikaci metody používat a je možné spokojit se s odhadem na základě hodnoty $CHSK_{Mn}$.

2.4. Závěr

Jarní období, jak již bylo řečeno na začátku, je z hlediska zdravotního stavu pro ryby velmi problematické. Chovatelé musí pečlivě a pravidelně sledovat chování obsádky i celkový vzhled rybníka. V předchozích kapitolách byly naznačeny příznaky a signály, které by měly upozornit na to, že něco není v pořádku. Při zjišťování příčin zdravotních problémů či úhynu ryb v rybníce se vyplatí neotálet a co nejdříve zajistit odběr vzorků vody, ryb s příznaky, eventuálně dalšího materiálu, a dopravit je na specializované pracoviště. Na základě různých indicií a znalosti historie rybníka by zkušení chovatelé mohli být schopni sami odhadnout příčinu problémů a zvolit vhodnou analýzu či vyšetření, které by mohly jejich domněnku potvrdit. Doufejme, že jim přitom tato metodika bude nápomocná.

3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

Metodika shrnuje možné příčiny úhynů kaprů v jarním období. Vzhledem k tomu, že v posledních letech se takové případy objevují stále častěji, může být shrnutí možných příčin a diagnostických metod do jedné publikace, doplněné o odkazy na metodiky vydané v předchozích letech a popisující podrobněji jednotlivé metody, pro chovatele i pro veterinární lékaře velmi užitečný.

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena chovatelům ryb a veterinárním lékařům působícím v chovech ryb. Podává souhrnné informace o možných příčinách úhynů kaprů v jarních měsících a o laboratorních metodách využitelných při jejich diagnostice.

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Rychlý odběr vzorků a cílená diagnostika může omezit ztráty způsobené jarními úhyny kaprů. Nemusí to platit vždy, například v případě propuknutí virových onemocnění je zlepšení situace především dílem stoupající teploty vody. I zde však může dojít k ekonomickým úsporám, protože nemusí být vynakládány finanční prostředky na neúčinnou léčbu.

6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

Adamek, M., Teitge, F., Jung-Schroers, V., Heling, M., Gela, D., Piackova, V., Kocour., M., Steinhagen, D., 2018. Flavobacteria as secondary pathogens in carp suffering from koi sleepy disease. Journal of Fish Diseases 41 (11): 1631–1642.

Ambrožová, J., 2004. Mikrobiologie v technologii vod. 1. vyd. VŠCHT, Praha, 68 s.

Arthanari, M., Dhanapalan, S., 2016. Assessment of the haematological and serum biochemical parameters of three commercially important freshwater fishes in river Cauvery Velur, Namakkal district, Tamil Nadu, India. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies 4 (1): 155–159.

Austin, B., Austin, D.A., 2012. Aeromonadaceae Representatives (Motile Aeromonads). In: Austin, B., Austin, D.A. (Eds), Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Willd Fish, 5th edn. Springer, Dordrecht, The Netherlands/Heidelberg, Germany/New York/London, pp. 119–146.

Bakker, A.J., Gorgels, J.P., Draasima, J., Jongendijk, M., Altena, L., Hamersma, A., Weiland, A., 1992. Simple method for correcting total protein in plasma for actual fibrinogen content. Clinical Chemistry 38 (11): 2221–2223.

Bercovier, H., Fishman, Y., Nahary, R., Sinai, S., Zlotkin, A., Eyngor, M., Gilad, O., Eldar, A., Hedrick, R.P., 2005. Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. BMC Microbiology 5: 13.

Braceland, M., Houston, K., Ashby, A., Matthews, C., Haining, H., Rodger, H., Eckersall, P.D., 2017. Technical pre-analytical effects on the clinical biochemistry of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Journal of Fish Diseases 40 (1): 29-40.

Cizek, A., Dolejska, M., Sochorova, R., Strachotova, K., Piackova, V., Vesely, T., 2010. Antimicrobial resistance and its genetic determinants in aeromonads isolated in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*Cyprinus carpio*). Veterinary Microbiology 142: 437–438.

Clauss, T.M., Dove, A.D., Arnold, J.E., 2008. Hematologic disorders of fish. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice 11 (3): 445–462.

Čížek, A., Piačková, V., 2015. Metody stanovení citlivosti původců erytrodermatitidy kaprů k antibakteriálním látkám. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 162, 42 s.

Davis, A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C., 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. Functional Ecology 22: 760–772.

De Pedro, N., Guijarro, A.I., López-Patiño, M.A., Martínez-Álvarez, R., Delgado, M.J., 2005. Daily and seasonal variations in haematological and blood biochemical parameters in the tench, *Tinca tinca* Linnaeus, 1758. Aquaculture Research 36 (12): 1185–1196.

Dobiasova, H., Kutilova, I., Piackova, V., Vesely, T., Cizek, A., Dolejska, M. 2014. Ornamental fish as a source of plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic resistance plasmids. Veterinary Microbiology 171: 413–421.

Dobšíková, R., Svobodová, Z., Blahová, J., Modrá, H., Velíšek, J., 2006. Stress response to long distance transportation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) Acta Veterinaria Brno 75 (3): 437–448.

Faina, R., Máchová, J., Svobodová, Z., Kroupová, H., Valentová, O., 2007. Použití přípravku Diazinon 60 EC v rybníkářské praxi k tlumení nadměrného rozvoje hrubého dafniového zooplanktonu. Edice Metodik, VÚRH Vodňany, č. 80, 18 s.

Fazio, F., 2019. Fish hematology analysis as an important tool for aquaculture: a review. Aquaculture 500: 237–242.

Fazio, F., Marafioti, S., Arfuso, F., Piccione, G., Faggio, C., 2013. Comparative study of the biochemical and haematological parameters of four wild Tyrrhenian fish species. Veterinarni Medicina 58 (11): 576–581.

Fazio, F., Ferrantelli, V., Fortino, G., Arfuso, F., Giangrosso, G., Faggio, C., 2015. The influence of acute handling stress on some blood parameters in cultured Sea Bream (*Sparus Aurata* Linnaeus, 1758). Italian Journal of Food Safety 4 (1): 4174.

Furukawa, F., Watanabe, S., Kimura, S., Kaneko, T., 2012. Potassium excretion through ROMK potassium channel expressed in gill mitochondrion-rich cells of Mozambique tilapia. American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 302 (5): 568–576.

Gilad, O., Yun, S., Zagmutt-Vergara, F.J., Leutenegger, C.M., Bercovier, H., Hedrick, R.P., 2004. Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio* koi as assessed by real-time TaqMan PCR. Diseases of Aquatic Organisms 60: 179–187.

Greenwell, M.G., Sherill, J., Clayton, L.A., 2003. Osmoregulation in fish. Mechanisms and clinical implications. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animals Practice 6: 169–189.

Hazel, J.R., 1993. Thermal biology. In: Evans, D.H. (Ed.), The Physiology of Fishes. CRC Press, 1st ed., 608 pp.

Hoole, D., Bucke, D., Burgess, P., Wellby, I., 2001. Diseases of carp and other cyprinid fishes. Malden, USA: Fishing News Books, 264 pp.

Horáková, M., Janda, V., Koller, J., Kollerová, Ľ., Koubíková, J., Palatý, J., Pokorná, D., Ptáková, H., Schejbal, P., Smrčková, Š., Strnadová, N., Sýkora, V., 2005. Analytika vody. VŠCHT, Praha, 335 s.

Hrubec, T.C., Smith, S.A., 1999. Differences between plasma and serum samples for the evaluation of blood chemistry values in rainbow trout, channel catfish, hybrid tilapias, hybrid striped bass. Journal Of Aquatic Animal Health 11: 116–122.

Imagawa, T., Hashimoto, Y., Kitagawa, H., Kon, Y., Kudo, N., Sugimura, M., 1989. Morphology of Blood Cells in Carp (*Cyprinus carpio* L.). Japan Journal of Veterinary Science 51 (6): 1163–1172.

Janda, J.M., Abbott, S.L., 2010. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity and Infection. Clinical Microbiology Reviews 23 (1): 35–73.

Jentoft, S., Aastveit, A.H., Torjesen, P.A., Andersen, O., 2005. Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology 141 (3): 353–358.

Knudsen, A.R., Andersen, K.J., Hamilton-Dutoit, S., Nyengaard, J.R., Mortensen, F.V., 2016. Correlation between liver cell necrosis and circulating alanine aminotransferase after ischaemia/reperfusion injuries in the rat liver. International Journal of Experimental Pathology 97 (2): 133–138.

Kolářová, J., Velíšek, J., 2012. Stanovení a vyhodnocení biochemického profilu krve ryb. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 135, 54 s.

Kondera, E., Kościuszko, A., Dmowska, A., Witeska, M., 2017. Haematological and haematopoietic effects of feeding different diets and starvation in common carp *Cyprinus carpio*, L. Journal of Applied Animal Research 45 (1): 623–628.

Lee, J., Kim, J., Shin, Y., Ryu, J., Eom, I., SickLee, J., Kim, Y., Kim, P., Choi, K., Lee, B., 2014. Serum and ultrastructure responses of common carp (*Cyprinus carpio* L.) during long-term exposure to zinc oxide nanoparticles. Ecotoxicology and Environmental Safety 104: 9–17.

Lewisch, E., Gorgoglione, B., Way, K., El-Matbouli, M., 2015. Carp edema virus/Koi sleepy disease: an emerging disease in Central-East Europe. Transboundary and emerging diseases 62: 6–12.

Máchová, J., Svobodová, Z., 2014. Teplota vody. In: Velíšek, J., Svobodová, Z. (Eds), Vodní toxikologie pro rybáře. FROV JU, Vodňany: s. 151–160.

Martemyanov, V.I., 2014. Dynamics of sodium and potassium in plasma, erythrocytes, and muscles of freshwater species under the effect of long-term combined stress. Inland Water Biology 7 (4): 389–393.

Mathan, R., Kurunthachalam, S.K., Priya, M., 2010. Alterations in plasma electrolyte levels of a freshwater fish *Cyprinus carpio* exposed to acidic pH. Toxicological & Environmental Chemistry 92 (1): 149–157.

Matras, M., Borzym, E., Stone, D., Way, K., Stachnik, M., Maj-Paluch, J., Palusińska, M., Reichert, M., 2017. Carp edema virus in Polish aquaculture – evidence of significant sequence divergence and a new lineage in common carp *Cyprinus carpio* (L.). Journal of Fish Diseases 40: 319–325.

Navrátil, S., Svobodová, Z., Lucký, Z., 2000. Choroby ryb. 1. vyd. VFU, Brno, 155 s.

Piačková, V., Čížek, A., Veselý, T., Pokorová, D., 2013. Odběr vzorků pro bakteriologické a virologické vyšetření ryb. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 142, 26 s.

Piačková, V., Palíková, M., Zusková, E., Flajšhans, M., 2014. Stanovení diferenciálního počtu leukocytů ryb. Edice Metodik, FROV JU, č. 160, 56 s.

Pitter, P., 2015. Hydrochemie, 5. vydání, VŠCHT, Praha, 792 s.

Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J.L., Moon, T.W., 2012. Glucose metabolism in fish: a review. Journal of Comparative Physiology 82 (8): 1015–1045.

Prováděcí rozhodnutí Komise (EU) 2015/1554, kterým se stanoví prováděcí pravidla ke směrnici 2006/88/ES, pokud jde o požadavky na metody dozoru a diagnostické metody. Úřední věstník Evropské komise, L247/1.

Řehulka, J., 1996. Blood parameters in common carp with spontaneous spring viremia (SVC). Aquaculture International 4: 175–182.

Sampath, H., Ramesh Manavalaramanujam, M., 2002. Responses of plasma transaminase activity in *Cyprinus carpio* var. communis to mercury toxicity. Journal of the Indian Fisheries Association 29: 7–13.

Schreiber, G., 1978. The synthesis and secretion of plasma proteins in the liver. Pathology 10 (4): 394.

Smutná, M., Vorlová, L., Svobodová, Z., 2002. Pathobiochemistry of Ammonia in the Internal Environment of Fish (Review). Acta Veterinaria Brno 71: 169–181.

Steinhagen, D., Maney, D.L., Maerz, J.C., 1990. Some haematological observations on carp, *Cyprinus carpio* L., experimentally infected with *Trypanoplasma borreli* Laveran & Mesnil, 1901 (Protozoa: Kinetoplastida). Journal of Fish Diseases 13 (2): 157–162.

Stone, D.M., Ahne, W., Denham, K.L., Dixon, P.F., Liu, C.T.-Y., Sheppard, A.M., Taylor, G.R., Way, K., 2003. Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike rhabdovirus isolates reveals four genogroups. Diseases of Aquatic Organisms 53: 203–210.

Suzuki, Y., 1986. Cytochemistry of basophil granulocyte in carp and puffer. Nippon Suisan Gakkaishi 52 (11): 1895–1899.

Svoboda, M., Kouřil, J., Hamáčková, J., Kaláb, P., Savina, L., Svobodová, Z., Vykusová, B., 2001. Biochemical profile of blood plasma of tench (*Tinca tinca* L.) during pre- and postpawing period. Acta Veterinaria Brno 70 (3): 259–268.

Svobodová, Z., 2019. Poškození ryb amoniakem. In: Palíková, M. (Ed.), Nemoci a chorobné stavy ryb. FROV JU, Vodňany, 462 s.

Svobodová, Z., Kolářová, J., Navrátil, S., Veselý, T., Chloupek, P., Tesarčík, J., Čítek, J., 2007. Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb, 4. přepracované vydání. Informatorium, spol. s r.o., Praha, 264 s.

Svobodová, Z., Pravda, D., Modrá, H., 2012. Metody hematologického vyšetřování ryb. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 122, 38 s.

Syrova, E., Kohoutova, L., Dolejska, M., Papezikova, I., Kutilova, I., Cizek, A., Navratil, S., Minarova, H., Palikova, M., 2018. Antibiotic resistance and virulence factors in mesophilic *Aeromonas* spp. from Czech carp fisheries. Journal of Applied Microbiology 125 (6): 1702–1713.

Tripathi, N.K., Latimer, K.S., Burnley, V.V., 2004. Hematologic reference intervals for koi (*Cyprinus carpio*), including blood cell morphology, cytochemistry, and ultrastructure. Veterinary Clinical Pathology 33 (2):74–83.

Valentová, O., Máchová, J., Faina, R., Kroupová, H., Svobodová, Z., 2009. Souprava COMBI – terénní analýzy vody. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 90, 28 s.

Valentová, O., Máchová, J., Kocour Kroupová, H., 2013. Základy hydrochemie – návody pro laboratorní cvičení. FROV JU, Vodňany, 103 s.

Vyhláška č. 327/2012 Sb., o ochraně včel, zvěře, vodních organismů a dalších necílových organismů při použití přípravků na ochranu rostlin.

Walencik, J., Witeska, M., 2007. The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology 146 (3): 331–335.

Witeska, M., 2013. Erythrocytes in teleost fishes: a review. Zoology and Ecology 23 (4): 275–281.

Witeska, M., Kondera, E., Szymańska, M., Ostrysz, M., 2010. Hematological changes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) after short-term lead (Pb) exposure. Polish Journal of Environmental Studies 19 (4): 825–831.

Yousaf, M.N., Powell, M.D., 2012. The effects of heart and skeletal muscle inflammation and cardiomyopathy syndrome on creatine kinase and lactate dehydrogenase levels in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). The Scientific World Journal: ID 741302.

Ip, Y.K., Chew, S.F., 2010. Ammonia production, excretion, toxicity and defense in fish: a review. Frontiers in Physiology: 134.

7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Čížek, A., Piačková, V., 2015. Metody stanovení citlivosti původců erytrodermatitidy kaprů k antibakteriálním látkám. Edice Metodik, FROV JU, č. 162, 36 s. (certifikovaná metodika) (dedikace: *MŠMT projekty CENAKVA (CZ.1.05/2.1.00/01.0024) a CENAKVA II (LO1205 v rámci programu NPU I) – 20 %, projekt CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) – 20 %* a *MZe projekt NAZV QJ1210237 – 60 %*)

Piačková, V., Palíková, M., Zusková, E., Flajšhans, M., 2014. Stanovení diferenciálního počtu leukocytů ryb. Edice Metodik, FROV JU, č. 160, 56 s. (certifikovaná metodika) (dedikace: *MŠMT projekty CENAKVA I (CZ.1.05/2.1.00/01.0024) – 20 % a CENAKVA II (LO1205 v rámci programu NPU I) – 20 %, MZe projekty QJ1210013 – 40 % a QJ1210237 – 20 %)*

Piačková, V., Čížek, A., Veselý, T., Pokorová, D., 2013. Odběr vzorků pro bakteriologické a virologické vyšetření ryb. Edice Metodik, FROV JU, č. 142, 26 s. (certifikovaná metodika) (dedikace: *MŠMT – CENAKVA, CZ.1.05/2.1.00/01.0024 – 40 %, MZe – NAZV QJ1210237 – 40 % a MZE 0002716202 – 20 %).*

Svobodová, Z., Máchová, J., Chloupek, P., Večerek, V., 2011. Metodický postup vyšetřování havarijních úhynů ryb. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 107, 28 s.

Valentová, O., Máchová, J., Faina, R., Kroupová, H., Svobodová, Z., 2009. Souprava COMBI – terénní analýzy vody. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 90, 28.

Dedikace

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu MZe č. QK1710114 s názvem „Nová virová onemocnění v chovech kapra obecného – diagnostika a prevence“ (50 %), projektu MŠMT „PROFISH“ (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000869) (30 %) a projektu MŠMT CENAKVA (LM2018099) (20 %).

Externí odborný oponent
RNDr. Antonín Prouza
Státní veterinární ústav Jihlava
Pracoviště České Budějovice
Dolní 2, 370 04 České Budějovice

Interní odborný oponent
prof. MVDr. Zdeňka Svobodová, DrSc.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany, www. frov.jcu.cz

Oponent za státní správu
Ing. Lukáš Mareš, Ministerstvo zemědělství, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství, Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

Osvědčení o uplatněné certifikované metodice č. 64843/2019-MZE-16232 vydalo Ministerstvo zemědělství, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství Těšnov 65/17, Praha 1, 110 00.

Adresa autorského kolektivu
MVDr. Veronika Piačková, Ph.D. (25 %)
MVDr. Eliška Zusková, Ph.D. (5 %)
Doc. Ing. Hana Kocour Kroupová, Ph.D. (10 %)
Ing. Jana Máchová, Ph.D. (10 %)
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany, www.frov.jcu.cz

Ing. Tomáš Veselý, CSc. (2,5 %)
Ing. Kateřina Matějíčková, Ph.D. (2,5 %)
MVDr. Ľubomír Pojezdal, Ph.D. (5 %)
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 296/70, 621 00 Brno

MVDr. Ivana Papežíková, Ph.D. (15 %)
Mgr. Eva Syrová (10 %)
Doc. MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D. (15 %)
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno

V edici Metodik (technologická řada) vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, www.frov.jcu.cz; přidělený editor: dr hab. Ing. Josef Velíšek, Ph.D.; redakce: Zuzana Dvořáková; náklad: 200 ks, 1. vydání; metodika uplatněna v roce 2019; vytištěna v roce 2020; grafický design a technická realizace: Jesenické nakladatelství Jena Šumperk.