

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Změny hematologických parametrů při jarních  
úhynech kaprů**

**Autor:** Alexandr Nádaský

**Vedoucí bakalářské práce:** MVDr. Veronika Piačková, Ph.D.

**Konzultant bakalářské práce:** Ali Asghar Baloch, DVM.

**Studijní program a obor:** Zootechnika, Rybářství

**Forma studia:** Prezenční

**Ročník:** 3.

České Budějovice, 2021

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci na téma “Změny hematologických parametrů při jarních úhynech kaprů” vypracoval samostatně pouze na základě níže uvedených pramenů a literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, 25. 4 2021

.....  
Alexandr Nádaský

## **Poděkování**

V první řadě bych rád věnoval poděkování vedoucí mé bakalářské práce MVDr. Veronice Piačkové, Ph.D., za poskytnutý čas vložený do bakalářské práce, za její ochotu, obětavost a pomocnou ruku při řešení odborných záležitostí. Dále bych rád poděkoval svému konzultantovi Ali Asghar Baloch, DVM. V neposlední řadě děkuji své rodině, přítelkyni Bc. Monice Čermákové, její rodině a svým přátelům, kteří mi byli vždy v průběhu celého studia důležitou oporou.

# JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybnářství a ochrany vod

Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Alexandr NÁDASKÝ**  
Osobní číslo: **V18B013P**  
Studijní program: **B4103 Zootechnika**  
Studijní obor: **Rybářství**  
Téma práce: **Změny hematologických parametrů při jarních úhynech kaprů**  
Zadávající katedra: **Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický**

### Zásady pro vypracování

Cílem práce je vyhodnotit změny v červeném a bílém krevním obrazu kaprů z lokalit, kde byl zaznamenán zvýšený úhyn v jarních nebo podzimních měsících a kde je důvodné podezření na onemocnění způsobené kapřím „edema“ virem (Carp Edema Virus; CEV).

#### Metodický postup:

Práce bude spočívat ve stanovení základních hematologických parametrů: počet červených a bílých krvinek, hodnota hematokritu, koncentrace hemoglobinu, diferenciální rozpočet bílých krvinek z krve odebrané kaprům vykazujícím příznaky onemocnění a v porovnání výsledků s hodnotami naměřenými u klinicky zdravých kaprů. Při statistickém vyhodnocení výsledků budou zohledněny také výsledky virologického vyšetření na přítomnost CEV DNA, teplota vody při odběru a další faktory.

Kromě praktické části, jejímž výsledkem budou naměřené hodnoty a jejich statistické zpracování, by měla práce obsahovat teoretický úvod zabývající se onemocněním způsobeným CEV, změnami hematologických parametrů ryb v souvislosti s onemocněním, intoxikací atd., a diskuse.

Rozsah pracovní zprávy: **30 – 50 stran**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

#### Seznam doporučené literatury:

- Way, K., Stone, D. 2013. Emergence of Carp edema virus-like (CEV-like) disease in the UK. *Finfish News*. 15: 32-34.
- Way, K., Haenen, O., Stone, D., Adamek, M., Bergmann, S. M., Bigarré, L., Diserens, N., El-Matbouli, M., Gjessing, M.C., Jung-Schroers, V., Leguay, E., Matras, M., Olesen, N. J., Panzarin, V., Piačková, V., Toffan, A., Vendramin, N., Veselý, T., Waltzek, T., 2017. Emergence of carp edema virus (CEV) and its significance to European common carp and koi *Cyprinus carpio*. *Diseases of Aquatic Organisms* 126: 155-166.
- Adamek, M., Oschilewski, A., Wohlsein, P., Jung-Schroers, V., Teitge, F., Dawson, A., Gela, D., Piačková, V., Kocour, M., Adamek, J., Bergmann, S. M., Steinhagen, D. 2017. Experimental infections of different carp strains with the carp edema virus (CEV) give insights into the infection biology of the virus and indicate possible solutions to problems caused by koi sleepy disease (KSD) in carp aquaculture. *Veterinary Research* 48: 12.
- Noga, E.J., 2010. *Fish Disease: diagnosis and treatment*, 2nd edition. Blackwell Publishing, Iowa, USA, 519 pp. Palíková, M., Piačková, V., Navrátil, S., Zusková, E., Papežíková, I., Kolářová, J., Pojezdal, L., Dyková, I., Scholz, Z., Gelnar, M., Svobodová, Z., Řehulková, E., Mareš, J., Modrá, H., Blažek, R., Veselý, T., 2019. *Nemoci a chorobné stavy ryb*. JU v Č. Budějovicích, FROV Vodňany, 462 s.
- Piačková, V., Palíková, M., Zusková, E., Flajšhans, M., 2014. Stanovení diferenciálního počtu leukocytů ryb. *Edice Metodik, FROV JU*, č. 160, 56 s. (certifikovaná metodika)

Svobodová, Z., Pravda, D., Modráh, H., 2012. Metody hematologického vyšetřování ryb, Edice Metodik, FROV JU, Vodňany č. 122, 38 s. (certifikovaná metodika)  
a další?

Vedoucí bakalářské práce: **MVDr. Veronika Piačková, Ph.D.**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant bakalářské práce: **MSc. Ali Asghar Baloch**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání bakalářské práce: **10. ledna 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. května 2021**

  
\_\_\_\_\_  
**prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.**  
děkan

L.S.

  
\_\_\_\_\_  
**prof. Ing. Tomáš Randák, Ph.D.**  
ředitel

# Obsah

<b>1. Úvod</b>	<b>9</b>
<b>2. Literární přehled</b>	<b>10</b>
<b>2.1. Zdravotní problematika chovu ryb</b>	<b>10</b>
<b>2.2. Kapr obecný</b>	<b>11</b>
<b>2.3. Hematologie kapra obecného</b>	<b>13</b>
2.3.1. Krev	13
2.3.2. Krevní plazma	14
Proteiny v krevní plazmě	14
Sacharidy v krevní plazmě	14
Lipidy v krevní plazmě	15
2.3.3. Erytrocyty - červené krvinky (Red Blood Cells; RBCs)	15
Funkce erytrocytů	16
Hemoglobin ryb	16
2.3.4. Leukocyty - bílé krvinky (White Blood Cells; WBCs)	17
Funkce leukocytů	17
Lymfocyty	18
Monocyty	19
Neutrofilní granulocyty	19
Eozinofilní granulocyty	21
Bazofilní granulocyty	21
2.3.5. Trombocyty - krevní destičky	22
Funkce trombocytů	22
<b>2.4. Hematologické ukazatele ryb a jejich stanovení</b>	<b>23</b>
2.4.1. Odběr krve ryb	23
Metoda odběru krve ryb s hmotností menší než 8 g	24
Metoda odběru krve ryb kardiopunkcí	24
Metoda odběru krve ryb punkcí cév ocasních	25
2.4.2. Počet erytrocytů (RBC)	25
2.4.3. Počet leukocytů (WBC)	26
2.4.4. Hematokritová hodnota (PCV)	27
2.4.5. Množství hemoglobinu (Hb)	28

2.4.6.	Střední objem erytrocytu (MCV)	29
2.4.7.	Hemoglobin erytrocytu (MCH)	30
2.4.8.	Střední barevná koncentrace (MCHC)	31
2.4.9.	Leukokritová hodnota (Lk)	31
2.4.10.	Diferenciální rozpočet leukocytů (Leukogram)	32
<b>2.5.</b>	<b>Edémová nemoc kaprů (Carp Edema Virus Disease; CEVD)</b>	<b>34</b>
	Původce CEVD	34
	Druhy vnímavé k CEV	35
	Zdroj nákazy	35
	Faktory podmiňující nákazu	35
	Průběh a vývoj onemocnění	35
	Klinické symptomy	36
	Patologické symptomy	36
	Diagnóza CEVD	37
	Léčba CEVD	37
	Prevence před nákazou CEVD	38
<b>3.</b>	<b>Materiál a metodika</b>	<b>39</b>
<b>3.1.</b>	<b>Materiál</b>	<b>39</b>
3.1.1.	Ryby	39
3.1.2.	Lokality odběru vzorků	39
	Lokalita č. 7	39
	Lokalita č. 8	39
	Lokalita č. 11	40
<b>3.2.</b>	<b>Metodika</b>	<b>40</b>
3.2.1.	Vnější ohledání ryb	40
3.2.2.	Odběr vzorků krve a žaberní tkáně	40
3.2.3.	Metodický postup stanovování hematologických ukazatelů	41
3.2.4.	Metodický postup stanovení leukogramu	42
3.2.5.	Stanovení DNA CEV pomocí PCR metody	44
3.2.6.	Vyhodnocení výsledků	44
<b>4.</b>	<b>Výsledky</b>	<b>45</b>
<b>4.1.</b>	<b>Vnější ohledání ryb</b>	<b>45</b>

<b>4.2. Hematologické vyšetření</b>	<b>47</b>
4.2.1. Porovnání výsledků hematologických vyšetření CEV+/- ryb	47
4.2.2. Porovnání výsledků hematologických vyšetření mezi jarním a podzimním obdobím v jednotlivých lokalitách	49
4.2.3. Porovnání výsledků hematologických vyšetření mezi lokalitami v jednotlivých obdobích	51
4.2.4. Porovnání výsledných hodnot s fyziologickými hodnotami	53
<b>5. Diskuze</b>	<b>56</b>
<b>6. Závěr</b>	<b>60</b>
<b>7. Přehled použité literatury</b>	<b>61</b>
<b>8. Seznam tabulek</b>	<b>70</b>
<b>9. Seznam obrázků</b>	<b>70</b>
<b>10. Seznam grafů</b>	<b>71</b>
<b>11. Seznam použitých zkratk</b>	<b>71</b>
<b>12. Abstrakt</b>	<b>72</b>



# 1. Úvod

Tato bakalářská práce se zabývá změnami pozorovanými v červeném a bílém krevním obraze exemplářů kapra obecného (*Cyprinus carpio*), u kterých bylo díky jarním nadprůměrným úhynům v lokalitě odběru vzorků důvodné podezření na edémovou, neboli takzvanou spavou nemoc kaprů. Hlavním přínosem této práce by mělo být odhalení změn v hodnotách hematologických parametrů, ke kterým dochází při onemocnění kaprů způsobeném kapřím edema virem (Carp Edema Virus; CEV).

Téma práce jsem si vybral z toho důvodu, že vnímám zdravotní stav ryb jako jeden z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících a limitujících úspěšné rentabilní chovy polointenzivní a intenzivní akvakultury. Jak sám název výše zmíněné nemoci napovídá, jedná se o onemocnění kapra obecného, který je hlavním rybím druhem chovaným v rybníční akvakultuře České republiky. Na zřetel musíme brát i rychlost šíření nákazy Evropou. Dle Piačkové a kol. (2019a) byl první případ nákazy na našem území v roce 2013, pouhé 4 roky po zjištění prvního případu onemocnění koi kapra edémovou nemocí kaprů v Evropě, konkrétně ve Velké Británii. Vzhledem k významu kapra obecného pro české rybářství je důležité podrobovat nemoc neustálému vědeckému testování a pokusům s následným vývojem vakcín či preparátů zmírňujících průběh onemocnění s cílem omezit, nebo úplně zastavit další šíření nemoci. K důkladnému poznání vlivu infekce CEV na fyziologické procesy hostitelského organismu přispěje i vyhodnocení změn hematologických ukazatelů u nemocných ryb oproti rybám zdravým nebo v porovnání s fyziologickými hodnotami.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Zdravotní problematika chovu ryb

V posledních dekádách dochází k celosvětovému trendu nárůstu počtu ryb chovaných v intenzivních akvakulturních systémech. Tendence chovat více ryb intenzivní cestou je zapříčiněna stále narůstající potřebou rybího masa a produktů z něj a snahou omezit nadměrný lov mořských ryb ve volných vodách (Woo a kol., 1995). Rostoucí význam akvakultury pro nasycení trhu dokazuje i zpráva FAO (Organizace pro výživu a zemědělství Spojených národů), která udává, že mezi lety 1986 – 2018 došlo k nárůstu na 82,1 milionů tun z původních 14,9 milionů tun ryb vyprodukovaných v umělých odchovech ročně (FAO, 2020). S neustále se zlepšující technologií chovu, která umožňuje chov větší biomasy ryb na určitý objem vody, je třeba zajistit rybám adekvátní kvalitu a hygienickou nezávadnost prostředí, ve kterém žijí. Pokud tak není učiněno, zvyšuje se pravděpodobnost nákazy, následných úhynů a finančních ztrát (Woo a kol., 1995). Onemocnění jsou v chovech ryb hlavním limitujícím faktorem, a proto je vyvíjeno obrovské úsilí na průzkum nemocí a vývoj léčiv. Avšak vzhledem ke složitosti aplikovat léky či vakcíny rybám ve vysokých počtech kusů je třeba onemocněním spíše předcházet, než je následně léčit (Kolářová a Svobodová, 2009).

V rámci produkční akvakultury je vyvíjen tlak na maximální předcházení vlivům, které by jakkoliv svým působením mohly oslabit zdravotní stav ryb. Dobrým zdravotním stavem ryby rozumíme stav, kdy ryba nejeví známky onemocnění. U ryb tento stav vyhodnocujeme na základě jejich projevu v přirozeném prostředí, vyživenosti, rychlosti růstu a dle vizuálního posouzení stavu kůže, žaberního aparátu a očí (Svobodová a kol., 2007). Dříve zmiňované vlivy, které mohou vést ke zhoršení zdravotního stavu ryb, jsou například fyzikální (změna pH, obsahu O<sub>2</sub> ve vodě, teploty, tlaku), nebo chemické změny kvality vody (zvýšený obsah dusitanů, amoniaku, dusičnanů, sulfanů, těžkých kovů, kyselin, zásaditých sloučenin, pesticidů, kyanidů) (Velíšek a kol., 2014). Neopomenutelnou příčinou zhoršení stavu ryb může být i mechanické poškození těla (Adámek a kol., 2013).

Paralelně s fyzikálními, chemickými a mechanickými vlivy ovlivňují zdravotní stav ryb různé patogenní organismy a onemocnění s nimi spjatá. Původci nemocí mohou být viry, bakterie, plísně nebo paraziti (Svobodová a kol., 2007). Dle Nogy (2010) onemocněním ryb rozumíme stav odlišný od normálu, při kterém dochází k degradaci schopností ryby udržovat životně důležité tělesné funkce v chodu. Onemocnění se vyjma obecných příznaků (nekoordinované pohyby, snaha uniknout z aktuálního prostředí, snížená potřeba potravy, zhoršená konverze krmiva, apatické chování) manifestuje pro něj příznačnými fyziologickými a patologickými příznaky (Svobodová a kol., 2007).

## 2.2. Kapr obecný

Kapr obecný (*Cyprinus carpio*; Linnaeus, 1758) patří dle taxonomického řazení do třídy paprskoploutvých (*Actinopterygii*), řádu máloostní (*Cypriniformes*), čeledě kaprovití (*Cyprinidae*) a rodu kapr (*Cyprinus*).

Kapr obecný je na našem území sice druhem nepůvodním, avšak zdomácněným. Jediné povodí na území České republiky, kde jej můžeme označit za druh původní, je povodí řeky Moravy, respektive Dunaje (Dubský a kol., 2003). Původním areálem, ze kterého byl kapr díky jeho vlastnostem vhodným pro chov rozšířen do celého světa, je úmoří Černého moře, Kaspického moře a povodí Aralského jezera. První zmínky o jeho chovu pocházejí z Číny a datují se zhruba do období okolo 1 000 let př.n.l. (Balon, 1995). Nakajima a kol. (2019) však uvádějí, že historie chovu kapra obecného v čínské provincii Che-nan sahá až do doby 6 000 let př.n.l. Na našem území se první zmínky o výskytu kapra obecného začínají objevovat v 11. století našeho letopočtu (Hanel a Lusk, 2005).

Kapr obecný se vyznačuje robustním, mírně mediálně sploštělým tělem pokrytým cykloidními šupinami. Postupným šlechtěním došlo ke vzniku nových variant ošupení. Rozeznáváme varianty šupinatý, lysý, hladký a řádkový. Jedinci tohoto druhu mají ústa spodního postavení, v jejich okolí se nachází 2 páry hmatových vousků (Dubský a kol., 2003).

Kapr je hejnová ryba, typicky žijící v mírně tekoucích vodách parrmového a cejnového pásma a ve vodách stojatých (rybníky, údolní nádrže). Jedná se o rybu

všežravou. Ve stádiu plůdku jeho potravu převážně tvoří fytoplankton a drobný zooplankton. S postupným nárůstem se do jeho potravního spektra přidávají hmyzí larvy, nitěnky, hmyz, řasy, ale i části rostlin (Hanel a Lusk, 2005).

Pohlavní zralost nastává u ryb ve věku 3 – 5 let. K výtěru dochází v období května až června, kdy teplota vody dosahuje 18 – 20 °C (Dubský, 2015). Díky výtěru na rostliny jej řadíme mezi fytofilní druhy ryb. Jikry mají žlutozelené zabarvení, vykazují lepivost a mírnou bobtnavost. Relativní plodnost se může pohybovat v rozmezí 100 000 – 300 000 ks·kg<sup>-1</sup> živé hmotnosti ryby (Linhart a kol., 1995). Po naklazení jiker dochází ke kulení larev po dosažení 60 – 70 denních stupňů [d°] (Gela a kol., 2009).

Svou oblibu v chovu si tato ryba získala i díky nízkým nárokům na prostředí, ve kterém žije. Ideální teplota pro dosahování nejlepšího růstu je 20 – 26 °C. Kyslíkové optimum je pro kapra obecného 6 – 8 mg·l<sup>-1</sup>, avšak dokáže se krátkodobě vyrovnat i s pouhými 2 mg·l<sup>-1</sup> (Dubský a kol., 2003). Nižší hodnoty mohou být za současných vyšších teplot vody pro jedince letální (Velíšek a kol., 2014). Vykazuje i velkou toleranci k výkyvům pH vody. Starší jedinci jsou schopni odolávat pH v rozpětí 5 – 10 (Dubský a kol., 2003). Za optimální pH se pro kapra obecného považují hodnoty od 7 do 8,3 (Hartman a Regenda, 2016).

Díky výše zmiňovaným pozitivním vlastnostem pro chov se kapr obecný stal na našem území nejvíce produkovanou rybou (Hanel a Lusk, 2005). Díky dobré evidenci výsledků výlovů, kterou vypracovávali již rybníkáři a rybáři od 13. století, víme, že kapr obecný byl od samého počátku rybníkářství na našem území základním kamenem produkce (Dubský, 2015). Dle zprávy Produkce a trh ryb Rybářského sdružení České republiky (2018) bylo v roce 2018 na našem území vyprodukováno 18 430 tun tržního kapra. Evropská produkce kapra v roce 2013 dosahovala 78 000 tun (European Commission, 2021). Vyprodukované množství kapra obecného v rámci Evropské unie tvoří pouhá 2 % světové produkce. Největší část celosvětové produkce tvoří Čína (až 80 %) a Indonésie (European Commission, 2007).

## 2.3. Hematologie kapra obecného

Hematologií rozumíme vědní obor zabývající se studiem krve jako celku, jejích elementů a látek v ní obsažených. Studiu se v rámci hematologie podrobují i biochemické procesy, které se v krvi odehrávají nebo kterých je krev součástí. Díky stále lepším a dokonalejším metodám v této vědní disciplíně lze sledováním hematologických parametrů lépe pochopit hematologii jako celek a porozumět změnám v krvi, vyvolávaným vlivem různých faktorů (Donner, 1985).

### 2.3.1. Krev

Krev ryb je neprůsvitná, červeně zbarvená kapalina viskózního charakteru (Dvořák a kol., 2014). Jejím nejzásadnějším úkolem v organismu živočichů je zásobování buněk kyslíkem a odvádění oxidu uhličitého do žaberního aparátu. Nezanedbatelná je její funkce v transportu živin potřebných pro zajištění správného chodu celého organismu (Volf a Havelka, 1958). Důležitou funkcí krve je i podílení se na obranných mechanismech těla ryb. Tu zabezpečují leukocyty, cytokiny a imunoglobuliny v krvi obsažené (Doubek a kol., 2003b).

Krev dělíme na dvě základní složky, a to na krevní plazmu a buněčné elementy. Krevní plazma je tekuté médium krve, sloužící k transportu částic po těle ryby (Volf a Havelka, 1958). Krevní elementy dělíme na červené krvinky (*Erythrocyty*), bílé krvinky (*Leukocyty*) a krevní destičky (*Trombocyty*) (Genten a kol., 2009). U ryb tvoří krevní elementy 15 – 40 % z celkového objemu krve (Novotný a kol., 1966).

Množství krve v těle ryby může být ovlivněno velkou škálou faktorů. Nejvýznamnějšími z nich jsou například druh a stáří jedince, tělesná kondice, zdravotní stav či pohlaví (Dvořák a kol., 2014). Obecně se však udává, že krev zabírá pouhé 1 – 2 % tělesné hmotnosti. U ryb s aktivnějším způsobem života, např. lososovitých, se může hmotnost krve v těle přibližovat až k hranici 6 % z hmotnosti těla ryby (Dubanský a Svobodová, 1995).

Ryby řadíme mezi poikilotermní organismy. Jejich krev má zpravidla teplotu stejnou, eventuálně při vyšší fyzické námaze o pouhých 0,5 °C vyšší než vodní prostředí (Dubský a kol., 2003; Adámek a kol., 2013). Poikilotermie, v českém překladu

studenokrevnost, je existenční strategie, při které organismus není schopen mírou metabolismu vyprodukovat dostatek tepelné energie a následně si díky špatné tepelné izolaci vyprodukované teplo nedokáže dlouhodobě udržet (Lavers, 2004).

### **2.3.2. Krevní plazma**

Krevní plazma je transparentní tekutina s nažloutlým barevným nádechem (Dubský a kol., 2003). U kapra obecného plazma vykazuje mírnou bazicitu - pH 7,6 (Dvořák a kol., 2014). Volf a Havelka (1958) definují krevní plazmu jako tekutinu, která v krevním řečišti slouží k transportu krevních částic po celém těle živočicha.

Krevní plazma je tvořena z 92 % vodou. Vyjma krvinek a destiček nese také velké množství dalších komponentů potřebných pro zajištění chodu fyziologických funkcí. Příkladem mohou být základní živiny (lipidy, sacharidy, proteiny), látky anorganické ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ), plyny, enzymatické látky, hormony a vitaminy (Mahoney a McNulty, 1992; Doubek a kol., 2003b).

#### **Proteiny v krevní plazmě**

Dle Svobodové a kol. (1986) jsou proteiny nejpodstatnější organickou složkou v plazmě ryb. Při rozborech krevní plazmy uvádíme všechny proteiny souhrnně jako Total Protein - TP, neboli celkové bílkoviny. V rámci TP jsou zastoupeny albuminy, majoritní část celkové hodnoty a globuliny (alfa, beta, gama globuliny). U zdravého jedince kapra obecného se hodnota TP pohybuje v rozmezí 16 – 45 g·l<sup>-1</sup> (Kolářová a Velíšek, 2012).

#### **Sacharidy v krevní plazmě**

Sacharidy slouží rybám jako primární zdroj energie. Nejdůležitějším sacharidem je glukóza ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) (Folmar, 1993). Za průměrnou hladinu glukózy v krvi u zdravých jedinců pokládáme hodnoty v mezích 1,3 – 6,9 mmol·l<sup>-1</sup>. Pokud dojde k markantnímu snížení hladiny glukózy v krvi, můžeme usuzovat, že v těle ryby došlo k selhání jaterní činnosti (Kolářová a Velíšek, 2012). Naopak stresové situace vyvolávají nárůst

koncentrace zmiňovaného sacharidu v krvi, a to až na hodnoty v rozmezí 10 – 30 mmol·l<sup>-1</sup> (Svobodová a kol., 1986).

### **Lipidy v krevní plazmě**

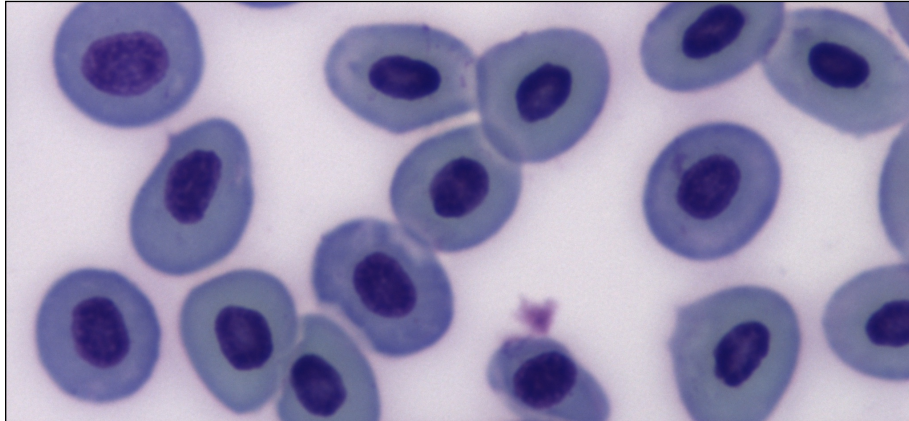
Lipidy jsou nezbytnou živinou, která plní funkci zásobní a funkci sekundárního zdroje energie (Pokorný a kol., 1998; Linhartová, 2020). Množství jejich zastoupení je užitečný faktor při posuzování dobré vyživenosti ryb (Dvořák a kol., 2014). Dle Svobodové a kol. (1986) je fyziologické rozmezí koncentrace lipidů v plazmě 2 – 8 g·l<sup>-1</sup>. Nejzásadnější skupinou lipidů jsou triacylglyceroly (TAG) (Svobodová a kol., 1986). Ty se u zdravého jedince kapra obecného dle Kolářové a Velíška (2012) vyskytují v krvi v koncentraci 0,49 – 2,83 mmol·l<sup>-1</sup>.

### **2.3.3. Erytrocyty - červené krvinky (Red Blood Cells; RBCs)**

Červené krvinky ryb jsou, oproti erytrocytům savců, chápány jako plnohodnotné buňky. Je to dáno tím, že mají jádro (viz Obr. č. 1), zatímco evolučně mladší červené krvinky savců nikoliv (Volf a Havelka, 1958; Svobodová a kol., 2012). Dle Imagawy a kol. (1989) lze v některých erytrocytech pozorovat i mitochondrie a endoplazmatické retikulum. Dubský a kol. (2003) popisují erytrocyty jako buňky eliptického tvaru, vykazující vysokou míru pružnosti a plastičnosti, s buněčným jádrem lokalizovaným ve středu buňky. Velikost červené krvinky u kapra obecného dosahuje 12,3 × 8,8 μm (Lucký, 1962). Její rozměry jsou pro každý rybí druh specifické a mezidruhově se může jednat o rozdíly v řádu jednotek mikrometrů (Hawkins a Mawdesley -Thomas, 2006).

Počet erytrocytů (RBC) se u kapra obecného dle Dubského a kol. (2003) a dle Dvořáka a kol. (2014) pohybuje v rozmezí 1,1 – 1,8 T·l<sup>-1</sup>. T·l<sup>-1</sup> (počet kusů erytrocytů v 1 litru krve, dělený 10<sup>12</sup>). Dříve se RBC uvádělo v jednotkách ks·mm<sup>-3</sup> (Dvořák a kol., 2014). Hodnoty RBC jsou ovlivňovány širokým spektrem faktorů. Za ty nejvlivnější jsou pokládány druh ryby, její věk, kondice, fyzikálně-chemické vlastnosti vody, pohlaví, reprodukční aktivita a stresové faktory (Anderson a kol., 1985). Dle Pravdy a Svobodové (2003) mají ryby, v porovnání se savci, malé množství erytrocytů v krvi. Nízký počet erytrocytů kompenzují jejich dvou až čtyřnásobným objemem oproti

savcům. Tento rozdíl mezi rybami a savci lze vyjádřit v hodnotách středního objemu erytrocytů (MCV). Tento hematologický parametr uvádíme v jednotkách fl (femtolitr) a odpovídá  $1 \cdot 10^{-15}$  litru. U jedinců kapra obecného je fyziologické rozmezí MCV 200 – 300 fl (Lusková, 1997). U savců se hodnoty MCV pohybují v rozmezí 20 – 90 fl (Doubek a kol., 2003a).



**Obrázek č. 1:** Erytrocyty kapra obecného (foto: A. Nádaský).

### **Funkce erytrocytů**

Hlavní funkcí erytrocytů je transport  $O_2$  a  $CO_2$  po těle. Tento transport umožňuje hemoglobin (červené krevní barvivo). Molekula hemoglobinu na sebe váže oxid uhličitý, respektive kyslík pomocí dvojmocného železa ( $Fe^{2+}$ ) v něm obsaženého (Dubský a kol., 2003). Vedlejší funkcí RBCs je také jejich schopnost transportu některých proteinových látek (např. thyroidní hormony) (Pravda a Svobodová, 2003).

### **Hemoglobin ryb**

Hemoglobin je krevní barvivo zprostředkovávající transport kyslíku a oxidu uhličitého v těle. Hb sestává ze dvou základních složek - bílkoviny globinu (96 %) a hemové skupiny (4 %). Hem obsahuje dvojmocné železo, které na sebe váže již zmiňované respirační plyny (Dubský a kol., 2003). Rybí hemoglobin si evolučně, na základě velkých výkyvů  $O_2$  ve vodním prostředí, vytvořil větší míru vaznosti (afinity) ke kyslíku, než je tomu například u hemoglobinu savců (McDonald a Milligan, 1992).

Hodnota množství hemoglobinu v krvi se uvádí v  $g \cdot l^{-1}$ . Množství Hb v krvi kapra obecného by se mělo pohybovat v intervalu 60 – 100  $g \cdot l^{-1}$  (Svobodová a kol., 1986).



#### **2.3.4. Leukocyty - bílé krvinky (White Blood Cells; WBCs)**

Leukocyty jsou skupinou krevních elementů, která primárně plní obrannou funkci organismu (Pravda a Paláčková, 1988). Díky velké odlišnosti mezi jednotlivými typy bílých krvinek nelze jakkoliv sumarizovat průměrnou velikost a tvar (Dubský a kol., 2003). Základním kritériem pro jejich dělení je, stejně jako u savců, výskyt barvitelných zrn - granul v cytoplazmě (Pravda a Svobodová, 2003). Dle tohoto parametru rozlišujeme agranulocyty (nemají granula) a granulocyty (granula mají). Agranulocyty dále dělíme na lymfocyty a monocyty, granulocyty na bazofilní, eozinofilní, potažmo neutrofilní (Volf a Havelka, 1958). Přesná determinace jednotlivých skupin leukocytů je u ryb velmi obtížná na základě skutečnosti, že v rybím krevním obraze nalézáme i nezralá stádia krevních elementů. Složitost bezchybného zařazení potvrzuje i fakt nově vznikajících studií, jejichž výsledky se různí, dokonce si odporují (Dubanský a Svobodová, 1995).

Počet leukocytů (WBC) je udáván v jednotkách  $G \cdot l^{-1}$  (počet kusů leukocytů v 1 litru krve, dělený  $10^9$ ). U zdravého jedince kapra obecného udávají Svobodová a kol. (1986) hodnotu WBC v rozpětí 10 – 80  $G \cdot l^{-1}$ . Tento normální stav může být ovlivněn mnoha faktory, jakými jsou například věk jedince, zdravotní stav a kondice, pohlaví, reprodukční aktivita, teplota prostředí a přítomnost působení patogenních vlivů na organismus (Modrá a kol., 1998). Vlivem teploty na počet leukocytů u kapra obecného se zabývali např. Vuren a Hattingh (1978). Z jejich výzkumu vyplývá, že nejvyšších hodnot WBC je dosahováno v průběhu teplé části roku. Jimi největší zjištěnou hodnotou bylo 104  $G \cdot l^{-1}$ . Počet se stanovuje pomocí Bürkerovy metody z heparinizované krve. WBC je jeden z nejdůležitějších ukazatelů zdravotní kondice ryby (Dubský a kol., 2003; Svobodová a kol., 2012).

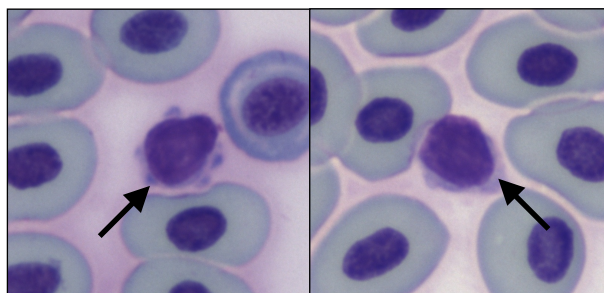
#### **Funkce leukocytů**

Jak již bylo zmiňováno, klíčovou funkci sehrávají leukocyty při ochraně před patogeny. WBCs ke své funkci využívají řadu strategií, jako např. fagocytózu, makrofágií, pinocytózu, schopnost chemotaxe, fixaci toxických látek nebo ameboidní pohyb (Pravda a Paláčková, 1988; Watanuki a kol., 1999; Dubský a kol., 2003).

## Lymfocyty

Lymfocyty patří do skupiny leukocytů agranulocytárních. Dle jejich velikosti rozlišujeme lymfocyty malé, dosahující velikosti 7 – 9  $\mu\text{m}$ , a lymfocyty velké (Dubský a kol., 2003). Ty mohou být až 12  $\mu\text{m}$  velké (Genten a kol., 2009). Jejich jádro je v poměru k velikosti celé buňky poměrně velké, kulatého tvaru a vykazuje silnou bazofilii (Imagawa a kol., 1989; Svobodová a kol., 2012). Cytoplazma lymfocytu je lehce modrá a výjimečně se v ní vyskytují zrna azurové barvy (Pravda a Svobodová, 2003). Dle množství a umístění cytoplazmy kolem jádra rozlišujeme lymfocyty, které mají cytoplazmou utvořený obal kolem celého jádra, dále ty, u nichž cytoplazma neobklopuje celé jádro, ale vytváří pouze lokální výběžky (viz Obr. č. 2) nebo lymfocyty, u nichž cytoplazma kolem jádra úplně chybí. O posledních zmíněných je pojednáváno jako o nahojaderných lymfocytech (Svobodová a kol., 2012; Piačková a kol., 2014b). Dle Feye (1966) jsou rybí lymfocyty svou funkcí a morfologií z krevních buněk nejvíce podobné savčím.

V bílém krevním obraze se jedná o nejhojněji zastoupenou složku. Dřívější studie se velmi různí ve výsledcích jejich množství. Tuto neshodu lze vysvětlit neúplným chápáním dynamiky vývoje množství leukocytů v krvi a záměnou trombocytů za lymfocyty (Dubanský a Svobodová, 1995). U kapra obecného tvoří jejich zastoupení procentuální podíl 76 – 97,5 % (Svobodová a kol., 2012). Hodnota je však významně ovlivňována působením toxických a infekčních činitelů. V tomto případě dochází ke snížení jejich množství na úkor buněk myeloidních (Drastichová a kol., 2004).



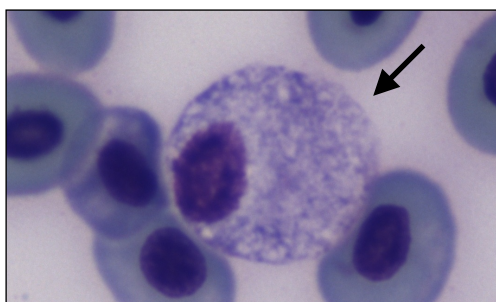
**Obrázek č. 2:** Lymfocyty kapra obecného (označeny šipkou) (foto: A. Nádaský).

## Monocyty

Monocyty jsou druhým typem agranulocytů (Dubský a kol., 2003). Svou velikostí se řadí mezi největší krevní elementy. Mohou dosahovat velikosti 15 – 18  $\mu\text{m}$ , ojediněle lze objevit i větší (Pravda a Svobodová, 2003). Dle Edsalla (1999) má nucleus monocyty proměnlivý tvar - podkovovitý až kruhový. Oproti jádru lymfocytů se vyznačuje řidší chromatinovou strukturou. V buňce je jádro uloženo mimo střed (viz Obr. č. 3) a díky jeho utváření ve formě sítě v něm nalézáme výrazné uzly (Svobodová a kol., 2012). Šedavě zabarvené cytoplazmy okolo jádra již nalézáme více a lze v ní pozorovat velké množství vakuol či azurofilní zrna (Pravda a Svobodová, 2003).

I v tomto případě se hodnoty procentuálního zastoupení monocyty v bílém krevním obraze, uváděné v literatuře, různí. Dubský a kol. (2003) udávají, že jejich počet je maximálně do 1 %, avšak větší část odborné literatury se přiklání k hodnotám mezi 3 – 5 %, které uvádějí i Svobodová a kol. (2012). Hodnota se však odvíjí od vlivů, na základě kterých může relativní zastoupení monocyty v krvi růst (pokles počtu lymfocytů, infekční onemocnění) (Drastichová a kol., 2004; Witeska a kol., 2010b).

Mezi funkce, které v organismu plní, patří makrofagie zaměřená na intracelulární likvidaci partikulí nepůvodního charakteru. Též likvidují staré nebo poškozené červené krvinky a hemoglobin v nich obsažený rozkládají na bilirubin (Svobodová a kol., 2012).



**Obrázek č. 3:** Monocyt kapra obecného (označen šipkou) (foto: A. Nádaský).

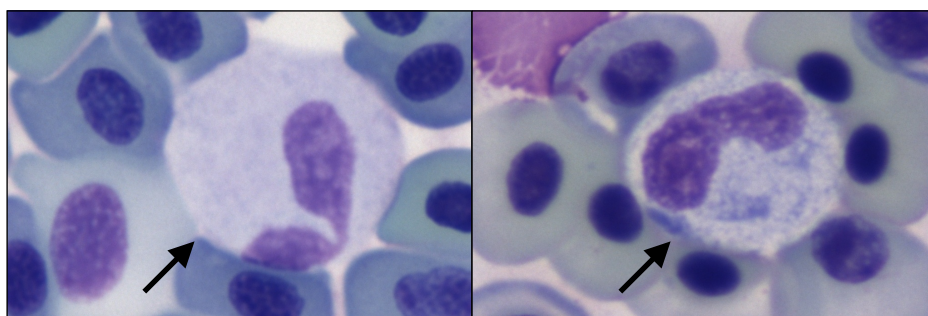
## Neutrofilní granulocyty

Neutrofilní granulocyty získaly své pojmenování na základě vlastnosti svých granul v cytoplazmě, která nemění své zbarvení při přidání barviv na kyselou nebo zásaditou bázi (Piačková a kol., 2014b). Tvar buňky neutrofilních granulocytů je kulatý až mírně oválný a běžně u kapra obecného dosahují velikosti 10 – 15  $\mu\text{m}$  (Imagawa a kol., 1989) (viz Obr. č. 4). V cytoplazmě se vyskytuje množství granul, která vyplňují

cytoplazmatický prostor v okolí jádra. Dynamika množství granul v buňce je ovlivňována jejím vývojovým stádiem (Trebichavský a kol., 2009). Tvar jádra je rozdílný a s jeho pomocí rozdělujeme neutrofilní granulocyty na čtyři podtypy. Podtyp č. 1 (neutrofilní myelocyt) má jádro okrouhlé, lehce excentricky lokalizované, podtyp č. 2 (neutrofilní metamyelocyt) má jádro tvarované do ledvinovitého tvaru, podtyp č. 3 (neutrofilní tyčka) má jádro tyčkovitého tvaru a podtyp č. 4 (neutrofilní segment) má jádro dělené na dvě nebo více částí. Ke změně tvaru jádra dochází postupným stárnutím buňky neutrofilního granulocytu. Výše zmiňované tvarové podtypy jsou souběžně i stádii vývojovými. Uvedené pořadí odpovídá vývojovému stupni v granulocytární řadě. Myelocyty jsou vývojově nejmladší, na druhou stranu segmenty jsou nejstarším stádiem granulocytů (Pravda a Svobodová, 2003; Svobodová a kol., 2012).

Dle Gentena a kol. (2009) se jedná v krvi ryb o nejběžnější granulocyty. Zmínky o jejich procentuálním podílu z celkového počtu bílých krvinek se však v literatuře liší i v řádech desítek procent. Svobodová a kol., (2012) uvádějí, že u kostnatých ryb zabírají od 2 % až do 10 % z celkového počtu leukocytů. Imagawa a kol. (1989) tvrdí, že průměrná procentuální hodnota neutrofilů a kapra obecného je  $30,9 \pm 12,9$  %. To však může být vysvětleno širokou paletou faktorů ovlivňujících jejich množství (Svobodová a kol., 2012).

Hlavní devízou neutrofilních granulocytů je pohlcování pevných částic (fagocytóza) (Ainsworth, 1992). Při projevu zánětlivé reakce se do místa postižení jako první z leukocytů přesouvají právě neutrofilní granulocyty (Rieger a Barreda, 2011). Zde pak následně mírní průběh a léčí oblast zánětu díky svým schopnostem produkce cytotoxických a antimikrobiálních látek. Dostat se k postiženému místu mimo krevní řečiště je jim umožňováno pomocí chemotaxe (Donner, 1985).



**Obrázek č. 4:** Neutrofilní segment (levá část) a neutrofilní tyčka (pravá část) kapra obecného (označeno šipkou) (foto: A. Nádaský).

## **Eozinofilní granulocyty**

Jako eozinofilní granulocyty označujeme granulocyty, jejichž granula se barví při působení barviv vykazujících kyselou reakci (Svobodová a kol., 2012). V okrouhlé buňce nalzáme excentricky uložené jádro a vysoké množství eozinofilních granulí o průměrné velikosti 0,5 – 1  $\mu\text{m}$  (Imagawa a kol., 1989; Pravda a Svobodová, 2003). Dle Dubského a kol. (2003) eozinofilní granulocyty můžeme pozorovat ve velikostním rozmezi 8 – 12  $\mu\text{m}$ .

Při stanovování diferenciálního počtu leukocytů ryb sledujeme výskyt eozinofilů v řádech desetin procenta až jednotek procent. Právě díky takto malým kusovým hodnotám některé studie z počátku 20. století nedokazují jejich přítomnost v krvi (Dubanský a Svobodová, 1995).

Hodnoty u kapra obecného jsou dle Modré (1999)  $0,1 \pm 0,19 \%$ . Avšak Imagawa a kol. (1989) uvádějí průměrnou hodnotu zastoupení  $5,7 \pm 3,7 \%$ . Běžnější výskyt je prokázán u ryb chrupavčitých (3 – 5 %) (Palíková a kol., 1999).

Záslouhou výskytu histaminu ve svých granulech plní v rybí krvi detoxikační funkci (Svobodová a kol., 2012).

## **Bazofilní granulocyty**

Jedná se o posledního zástupce z řady granulocytů v rybí krvi. Buňka má okrouhlý tvar (Svobodová a kol., 2012) a v průměru dosahuje rozměrů 9,1  $\mu\text{m}$  (Imagawa a kol., 1989). V buněčném prostoru je řídké, excentricky ložené jádro, které je zpravidla i s cytoplazmou překrýváno granuly (Pravda a Svobodová, 2003). Zmiňovaná granula lze nalézt ve velikostech od 0,6 do 1,5  $\mu\text{m}$  (Imagawa a kol., 1989).

Ze všech typů bílých krvinek připadá bazofilům nejmenší část v bílém krevním obrazu. Běžně je nalzáme v hodnotách 0 – 0,5 % (Svobodová a kol., 2012). Ojedinelost nálezů bazofilních granulocytů přičítá Suzuki (1986) jednoduchému rozpouštění bazofilních granul v průběhu práce s krevními vzorky.

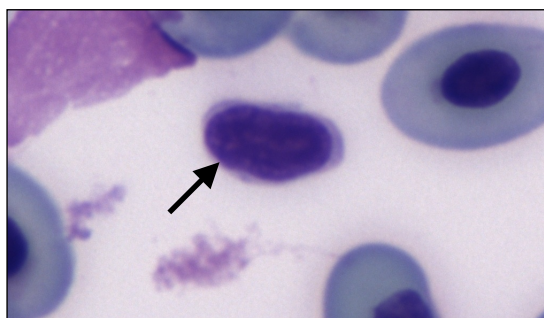
### 2.3.5. Trombocyty - krevní destičky

Stejně jako jaderné erytrocyty ryb vykazují tuto evoluční rozdílnost od savčích trombocytů i krevní destičky - v buňce nalézáme jádro (viz Obr. č. 5). Morfologie trombocytu má více možných variant - vřetenovitá, špičatá, nahojaderná a zakulacená. Nejběžnější jsou však první dvě varianty (Pravda a Svobodová, 2003). Velikostně v průměru dosahují rozměrů  $7,7 \times 4,6 \mu\text{m}$  (Imagawa a kol., 1989).

Množství krevních destiček v krvi uvádí Svobodová a kol. (1986) v hodnotách 10 – 40  $\text{G}\cdot\text{l}^{-1}$ . Jejich zastoupení je však v krvi velmi volatilní (Pravda a Svobodová, 2003), dokazují nám to například Dubský a kol. (2003), kteří jako horní hranici rozptylu uvádí až 83  $\text{G}\cdot\text{l}^{-1}$ .

#### Funkce trombocytů

Zásadní funkcí trombocytů je jejich účast na hemokoagulačních dějích v procesu zástavy krvácení (Pravda a Svobodová, 2003). Ke sražení krve dopomáhá bílkovina fibrinogen, který se při kontaktu krve s vnějším prostředím a přítomnosti enzymu trombinu, mění na fibrin. Na základě životního prostředí si ryby vyvinuly velmi rychlý proces srážení krve. Dle velikosti poškození dochází ke sražení v rámci 30 sekund až jedné minuty (Dubský a kol., 2003). Mnohými autory je trombocytům připisována i spoluúčast na imunitních procesech (Pravda a Svobodová, 2003).



**Obrázek č. 5:** Trombocyt kapra obecného (označen šipkou) (foto: A. Nádaský).

## **2.4. Hematologické ukazatele ryb a jejich stanovení**

Stanovování hematologických ukazatelů při vyšetřování stavu ryb se v posledních desetiletích stalo, díky novým poznatkům, jedním z nejdůležitějších sledovaných parametrů v ichthyopatologii (McDonald a Milligan, 1992; Masopust, 1998). Svou oblibu si hematologické testování získalo díky snadné dostupnosti, velkému spektru testů a možné kvantifikovatelnosti výsledků (Kolářová a Velíšek, 2012). Při vyhodnocování těchto ukazatelů sledujeme změny vyvolávané působením patogenních organismů, toxických látek i stresových situací v porovnání s jedinci nevystavenými těmto vlivům (Svobodová a kol., 1991; Fazio a kol., 2013; Piačková a kol., 2014b). Na zřetel musí být brána skutečnost, že vyhodnocované parametry jsou lehce ovlivnitelné širokou škálou faktorů (McDonald a Milligan, 1992), mezi něž příkladem řadíme: teplotu vody, koncentraci kyslíku ve vodě (Kolářová a Velíšek, 2012), druh a stáří pozorovaných ryb, pohlaví ryb, aktuální stádium reprodukčního cyklu (Svobodová a kol., 1978; Svobodová a kol., 1991) a stres (Anderson a kol., 1985). I v dnešní době jsou postupy zjišťování některých ukazatelů odkázány na manuální metody. Využívání automatizovaných postupů, používaných u krve savců, je u ryb komplikováno přítomností buněčného jádra v erythrocytech a morfológickou podobností některých krevních elementů (Pravda a Svobodová, 2003; Fazio, 2018).

Mezi základní hematologická stanovení se dle Campbella (2004) řadí: počet erythrocytů (RBC), počet leukocytů (WBC), hematokrit (PCV), koncentrace hemoglobinu (Hb), erythrocyt indexy (MCV, MCH, MCHC), stanovení leukokritové hodnoty (Lk) a diferenciální rozpočet leukocytů.

### **2.4.1. Odběr krve ryb**

Vhodnou metodu odběru krevního vzorku vybíráme na základě potřebného množství krve, možného opakovaného odběru a velikosti ryb (Pravda a Svobodová, 2003). Avšak provedení zvolené metody musí být plně v souladu znění zákona České národní rady na ochranu zvířat proti týrání (č. 246/1992 Sb.), ve znění pozdějších předpisů (Kolářová a Velíšek, 2012; Piačková a kol., 2014b).

Odebraný vzorek je důležité ošetřit protisrážlivou (antikoagulační) látkou, aby došlo ke zastavení srážecích procesů krve, a tím se předešlo ke znehodnocení vzorků (Piačková a kol., 2014b). K tomuto účelu je u ryb nejčastěji využíván heparin sodný (Hesser, 1960). Množství heparinu potřebného na 1 ml krve je dle Pravdy a Svobodové (2003) 0,01 ml. Tento poměr lze uvádět i v mezinárodních jednotkách (m.j.). V tomto případě je poměr 50 m.j. heparinu na 1 ml krve (Pravda a Svobodová, 2003; Piačková a kol., 2014b). V praxi se však běžně setkáváme s metodou vytvoření tenkého filmu zaschlého heparinu na vnitřních stěnách laboratorních pomůcek, které pro odběr krve používáme (Svobodová a kol., 2012).

### **Metoda odběru krve ryb s hmotností menší než 8 g**

Využívá se v případě nutnosti odběru krve od velmi raných věkových stádií. Principem metody je oddělení ocasního násadce za pomoci chirurgických nůžek či skalpelu a následné odebrání krve vytékající v místě řezu. Od takto malých ryb lze získat pouze velmi malé množství krve, které je nedostačující pro stanovení všech sledovaných kritérií (Pravda a Svobodová, 2003; Piačková a kol., 2014b).

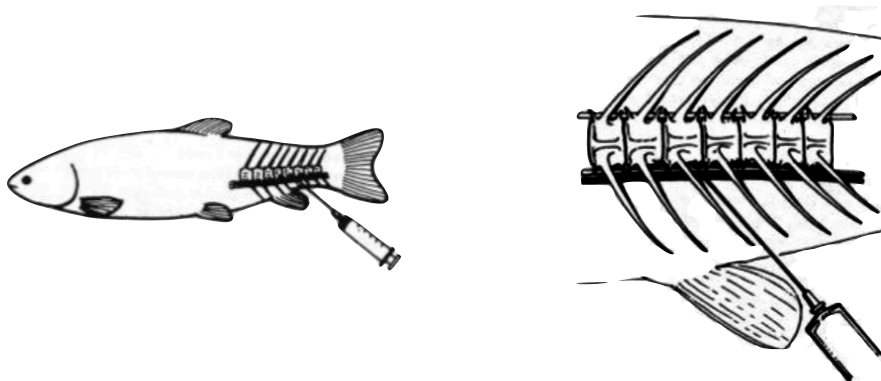
### **Metoda odběru krve ryb kardiopunkcí**

Metodu kardiopunkce lze uplatňovat u ryb dosahujících minimální hmotnosti 8 g (Piačková a kol., 2014b). Pro odběr krve používáme skleněnou kapiláru, u ryb těžších jak 20 g lze tuto kapiláru nahradit injekční jehlou o šířce průsvitu maximálně 0,9 mm (Pravda a Svobodová, 2003; Svobodová a kol., 2012). Metoda vyžaduje manuální zručnost a šetrnost osoby vpravující kapiláru nebo jehlu do srdeční dutiny. Po správném zavedení do srdce dochází díky jeho pulzu k čerpání krve do kapiláry (jehly), kde dochází ke kontaktu s tenkým filmem heparinu (Pravda a Svobodová, 2003; Svobodová a kol., 2012; Piačková a kol., 2014b). Po dokončení odběru je nutné rybu neprodleně usmrtit (Kolářová a Velíšek, 2012).



## Metoda odběru krve ryb punkcí cév ocasních

Jedná se o nejhojněji využívanou metodu u ryb dosahujících minimální kusové hmotnosti 20 gramů. K odběru využíváme jednorázové injekční stříkačky s průměrem jehly 0,8 – 1,2 mm, dle velikosti ryby (Piačková a kol., 2014b). K odběru se výhradně používají ryby živé. V průběhu procesu musí být zabráněno nechtěným pohybům jedince. Docílí se toho fixováním těla k podložce přidržením či u větších ryb použitím anestetických látek (Pravda a Svobodová, 2003). Injekční jehla je vpichována do ryby v místech vedení páteře, zhruba 1 cm kaudálním směrem za řitní ploutví (viz Obr. č. 6). Jehla by měla být vedena pod úhlem 45 ° k ventrální straně ryby. V momentu punkce ocasní cévy začne natékat krev do injekční stříkačky. Po odebrání dostatečného množství vzorku musí být injekční jehla šetrně vyjmuta z těla ryby (Pravda a Svobodová, 2003; Svobodová a kol., 2012; Piačková a kol., 2014b). Podstatnou součástí odběru je provedení dezinfekce. K tomuto účelu jsou využívány celkové ponořovací koupele ryb v manganistanu draselném (Svobodová a kol., 2007; Kolářová a Svobodová, 2009).



**Obrázek č. 6:** Odběr krve metodou punkce ocasní cévy (Svobodová a kol., 1986).

### 2.4.2. Počet erytrocytů (RBC)

Stanovování hodnoty RBC probíhá za účelem porovnání aktuálního množství červených krvinek s referenčními hodnotami pro zdravého jedince daného druhu. Toto porovnání poskytuje určitou výpovědní hodnotu o aktuálním zdravotním stavu (Kolářová a Velíšek, 2012). Komplikací při tomto porovnávání je ovlivnitelnost RBC působením dalších, vedlejších faktorů (Anderson a kol., 1985).

Stále nejběžněji používaným postupem určení celkového množství RBCs je manuální počítání v Bürkerově komůrce (Dubský a kol., 2003). Odebraná heparinizovaná krev je ředěna v poměru 1:200 s Hayemovým roztokem a za pomoci baničkové metody dle Bürkera a krouživých pohybů s baničkou dojde k promísení. Následně se naředěná krev aplikuje na počítací mřížku Bürkerovy komůrky, kde se stanoví počet erytrocytů ve 20 obdélnících. Po vydělení výsledné hodnoty číslem 100 je získán údaj RBC udávaný v  $T \cdot l^{-1}$  (Pravda a Svobodová, 2003; Svobodová a kol., 2012). K určení RBC lze použít i fotometrickou metodu dle Pawinského. Její výhodou je kratší doba stanovení, menší náročnost a nižší obtížnost provedení. Nevýhodou je vyvolávání zvětšeného MCV a následné ovlivnění vypočítávaných hodnot z něj. Z tohoto důvodu není v ichtyopatologii běžně využívána (Svobodová a kol., 1986).

RBC se u zdravého jedince kapra obecného pohybuje v intervalu 1,1 – 1,8  $T \cdot l^{-1}$  (Svobodová a kol., 1991).

Vyjma již zmíněných faktorů ovlivňujících hodnotu RBC v kapitole 2.3.3., je jedním z nejdůležitějších faktorů onemocnění (Anderson a kol., 1985; Lusková, 1997). Onemocnění, která způsobují snížení hodnoty RBC, jsou kupříkladu virová hemoragická septikémie, infekční nekróza krvevorné tkáně a ceroidní degenerace jater (Pravda a Svobodová, 2003; Piačková a kol., 2014a; Máchová a kol., 2014). Snížení hodnoty RBC způsobují i někteří parazité. Za jednoho z nich lze označit zástupce třídy jednorodých motolic *Eudiplozoon nipponicum* (Pravda a Svobodová, 2003). Změny RBC zapříčiňuje i vystavení ryby působení mědi a pesticidů na její bázi (snížení hodnoty RBC) (Svobodová a Máchová, 1985), herbicidu na bázi MCPA kyseliny (Lutnicka a kol., 2018), nanočástic stříbra (Vali a kol., 2020) a rtuti. Právě při působení rtuti, konkrétně chloridu rtuťnatého ( $HgCl_2$ ), došlo u kapra obecného ke snížení hodnoty RBC oproti kontrolním rybám o 0,148  $T \cdot l^{-1}$  (Setiyowati a kol., 2019).

### **2.4.3. Počet leukocytů (WBC)**

Stanovení celkového počtu bílých krvinek je dle Dubského a kol., (2003) jedním z nejdůležitějších sledovaných kritérií. Tuto významnost si určení WBC zasloužilo především díky obranné funkci leukocytů a jejich podílení se na imunitě organismu (Pravda a Paláčková, 1988). WBC je stejně jako předešlé RBC ovlivňováno vlivem

různých faktorů, a tak nelze určit, zda k případné změně došlo jen na základě sledovaného onemocnění nebo se na ní spoluúčastnily i jiné vlivy (Modrá a kol., 1998).

K určení WBC se využívá obdobná metoda jako v předešlém případě. Krev se ovšem v tomto případě ředí Natt-Herrickovým roztokem v poměru 1:200. Pro lepší rozlišitelnost bílých krvinek je doporučováno míchání po dobu 2 – 3 minut a následné barvení krvinek 10 – 15 minut. Následně je pipetou aplikována krev do Bürkerovy komůrky a je zde spočteno množství leukocytů ve 100 velkých čtvercích. K určení WBC, které se uvádí v jednotkách  $G \cdot l^{-1}$ , je zapotřebí zjištěné číslo vydělit dvěma (Svobodová a kol., 1986; Pravda a Svobodová, 2003). Lucký (1962) uvádí jako orientační metodu možnost dopočtu WBC z RBC za předpokladu, že na 1 200 červených krvinek je počítána jedna bílá krvinka. Tato metoda není v dnešní době využívána.

Hodnota WBC se u kapra obecného uvádí v rozmezí 10 – 80  $G \cdot l^{-1}$  (Svobodová a kol., 1986; Dubský a kol., 2003).

Obdobně jako RBC je i WBC ovlivňováno věkem a pohlavím ryb, teplotou vody a kvalitou životního prostředí (Lusková, 1997). Výrazně se však na hodnotě WBC projevují vlivy široké škály toxických látek, kovů a těžkých kovů. Mezi ty, které WBC snižují, jsou řazeny: amoniak (Dabrowska a Własow, 1986), fenoly (Máchová a kol., 2014), organofosfáty (Svoboda a kol., 2001), chrom (Abedi a kol., 2012), zinek (Witeska a Kościuk, 2003) a stříbro (Vali a kol., 2020). Naopak za látky, které hodnotu WBC navyšují, lze označit ropné látky (Jahanbakhshi a kol., 2013), olovo (Witeska, 2005) a rtuť. Při 6 dní trvající expozici kapra obecného v prostředí se zvýšenou koncentrací chloridu rtuťnatého došlo k navýšení hodnoty WBC o 2,31  $G \cdot l^{-1}$  (Setiyowati a kol., 2019). Modrá a kol. (1998) uvádějí, že při průběhu kteréhokoliv onemocnění dochází k nárůstu počtu leukocytů. Jako vzorový příklad lze zmínit studii Steinhagen a kol. (1997), která uvádí nárůst WBC při nákaze kokcií (*Goussia carpelli*) o 20  $G \cdot l^{-1}$ .

#### **2.4.4. Hematokritová hodnota (PCV)**

PCV, neboli Packed Cell Volume, je Svobodovou a kol. (1986, 2012) a Dubským a kol. (2003) definován jako objem všech erytrocytů ku celkovému množství krve. Určení

hematokritové hodnoty se stalo hojně používané na základě jednoduchého postupu metody a jejích přesných výsledků (Pravda a Svobodová, 2003).

Metoda funguje na principu oddělení erytrocytů od krevní plazmy centrifugací. Do heparinizovaných kapilár o délce 7,5 cm se do  $\frac{2}{3}$  objemu nechá nasát krev. Spodní část kapiláry je zapotřebí utěsnit a zabránit tak výtoku krve z kapiláry. Běžně je používána modelovací hmota. Následně jsou kapiláry s krví po dobu 3 minut podrobovány odstředování v hematokritové odstředivce při 14 000 otáčkách za minutu. Po dokončení procesu se vkládají kapiláry do hematokritového měřidla. Procentuální hodnotu odečtenou z měřidla je důležité vynásobit koeficientem 0,01. Tento údaj je hodnotou výslednou. Výsledek PCV je udáván v jednotkách  $l \cdot l^{-1}$  (Svobodová a kol., 1986, 1991, 2012).

Běžně udávanou hodnotou u kapra obecného je 0,28 – 0,40  $l \cdot l^{-1}$  (Svobodová a kol., 1991; Dubský a kol., 2003).

Změna hematokritové hodnoty je, obdobně jako RBC a WBC, ovlivňována širokým spektrem vlivů. Jedním typem jsou onemocnění. Příkladem lze zmínit kachexii kapřího plůdku (snížení PCV pod 0,20  $l \cdot l^{-1}$ ), infekční anémii lososů (snížení PCV pod 0,1  $l \cdot l^{-1}$  oproti normální hladině u lososovitých ryb v rozmezí 0,3 – 0,45  $l \cdot l^{-1}$ ), ceroidní degeneraci jater (snížení PCV) a napadení parazitem *Eudiplozoon nipponicum* (Pravda a Svobodová, 2003). K ovlivnění PCV dochází i vlivem amoniaku (zvyšování PCV při akutní intoxikaci) (Spangenberg a kol., 1989), organofosfátů (snížení PCV) (Svoboda a kol., 2001), diazinů (snížení PCV po expozici ryb v prostředí s pesticidem Betoxon F 430) (Pečená a Svobodová, 1989) a kovů, jakými jsou například olovo a měď. Oba tyto kovy zapříčiňují vzrůst hodnoty PCV (Witeska, 2005; Svobodová a kol., 1994). Zajímavostí je fakt, že ke změnám hodnoty PCV dochází i při úpravě diety. To dokazuje Kesbiç (2019) ve své studii, při které došlo k prokazatelnému navýšení PCV jen díky aplikaci 10 ml oleje z plodů jalovce obecného (*Juniperus communis*) v 1 kg krmiva.

#### **2.4.5. Množství hemoglobinu (Hb)**

Stanovení množství hemoglobinu je nepostradatelnou součástí diagnostiky anémie (chudokrevnosti) či poškození erytrocytů vlivem toxických látek. (Donner, 1985; Pravda a Svobodová, 2003). Při diagnostikování anémie musí být zohledňovány

parametry věk a pohlaví, neboť množství hemoglobinu se od nich odvíjí (Buliková a Kisoová, 2011).

Nejvhodnější metodou stanovení Hb je, stejně jako u savců, fotometrická kyano-hemoglobinová metoda (Larsen a Snieszko, 1961). Princip spočívá v přeměně hemoglobinu na kyanohemoglobin za intervence transformačního roztoku. Po přidání roztoku dle Kampena a Zijlstra nebo dle Drabkina dojde za 3, respektive 15 minut k přeměně hemoglobinu na kyanohemoglobin. Samotné měření je prováděno fotometricky při vlnové délce 540 – 546 nm. Odečtení výsledné hodnoty v  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  se provádí na kalibrační křivce sestavené dle komerčních standardů a transformačního roztoku (Svobodová a kol., 1986, 2012; Pravda a Svobodová, 2003).

Množství hemoglobinu v krvi u kapra obecného v dobrém zdravotním stavu udávají Svobodová a kol. (1986) a Dubský a kol. (2003) souhlasně v rozmezí 60 – 100  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Množství hemoglobinu je ovlivňováno obdobnými faktory jako předchozí hematokritová hodnota. Z onemocnění ovlivňující Hb lze zmínit, již uváděnou kachexii kapřího plůdku, ceroidní degeneraci jater, napadení ryb parazitem *Eudiplozoon nipponicum* (Pravda a Svobodová, 2003), trypanoplasmózu a postodiplostomózu (Zusková a kol., 2019). Množství hemoglobinu může fluktuovat i na základě působení léčiv. To popisují Svobodová a kol. (2006) ve studii, při které bylo podáváno jedincům kapra obecného krmivo s oxytetracyklinem ( $5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), a v důsledku toho byly následně zjišťovány nižší hodnoty Hb oproti kontrolním jedincům. Obdobně, jako tomu bylo u PCV, došlo i k prokazatelnému nárůstu Hb v krvi po aplikaci oleje z plodů jalovce obecného (Kesbić, 2019).

#### **2.4.6. Střední objem erytrocytu (MCV)**

Výpočet hodnoty středního objemu erytrocytu je prováděn na základě znalosti hodnoty PCV [ $\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$ ] a RBC [ $\text{T}\cdot\text{l}^{-1}$ ]. Tyto údaje dosazujeme do vzorce pro výpočet MCV - viz vzorec níže. Vypočtená hodnota je uváděna ve femtolitrech [fl]. Jeden femtolitr je roven  $1 \cdot 10^{-15}$  litru (Svobodová a kol., 1986, 2012).

Svobodovou a kol. (1986) je uváděna hodnota pro zdravého jedince kapra obecného v rozmezí 200 – 300 fl.

Vzorec pro výpočet MCV:

$$MCV = \frac{PCV \cdot 1\,000}{RBC}$$

Ke změně hodnoty MCV od normálního stavu může docházet při působení organofosfátů (markantní zvýšení hodnoty) (Pravda a Svobodová, 2003), MCPA herbicidu (nárůst MCV u kapra obecného v rozmezí 50 – 100 fl) (Lutnicka a kol., 2018) a probiotického přípravku Immunowall® (snížení MCV o 33,6 fl oproti kontrolním jedincům kapra obecného při dávkování 1,5 g probiotik na 1 kg krmení) (Mehrabi a kol., 2018). Na hodnotu MCV má vliv pohlaví ryby (Karimi a kol., 2013), sezónní vlivy a teplota (Vuren a Hattingh, 1978). Dle studie těchto autorů docházelo v průběhu roku k fluktuaci MCV u kapra obecného v rozmezí  $141,05 \pm 62,47$  –  $309,23 \pm 108,59$  fl.

#### 2.4.7. Hemoglobin erytrocytu (MCH)

Průměrné množství hemoglobinu na 1 erytrocyt je počítáno z hodnoty Hb [ $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ] a z celkového počtu erytrocytů, udávaného v  $\text{T} \cdot \text{l}^{-1}$  dle vzorce níže. Výsledná hodnota je udávána v pikogramech [pg]. Jeden pikogram je roven  $1 \cdot 10^{-12}$  gramu (Svobodová a kol., 1986, 2012).

Hodnota 50 – 60 pg je Svobodovou a kol. (1986) pokládána za přirozenou hodnotu u zdravého kapra obecného.

Vzorec pro výpočet MCH:

$$MCH = \frac{Hb}{RBC}$$

Hodnota MCH je stejně jako MCV ovlivňována pohlavím jedince, teplotou prostředí a sezónními změnami (Vuren a Hattingh, 1978; Lusková, 1997). Vliv na MCH je také dokázán pro MCPA herbicidy (nárůst hodnot) (Lutnicka a kol., 2018), probiotické látky (snížení MCH o 8,3 pg při podávání 1,5 g probiotik na 1 kg krmení) (Mehrabi a kol., 2018) a pro pesticid Diazinon. Při expozici tolstolobika bílého (*Hypophthalmichthys molitrix*) 50% koncentraci LC50 diazinonu bylo zjištěno navýšení hodnoty MCV oproti kontrole o 20 pg (Hedayati a Niazie, 2015). Zvýšení hodnoty MCV bylo pozorováno při vystavení kapra obecného působení mědi (Witeska a kol., 2010a), naopak při vystavení kapra obecného působení chromu ( $\text{CrCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ )

o koncentraci 2 mg·l<sup>-1</sup> dochází ke snížení hodnoty MCV (Abedi a kol., 2012).

#### 2.4.8. Střední barevná koncentrace (MCHC)

Střední barevná koncentrace udává zastoupení hemoglobinu v určitém objemu erytrocytů. Výpočet se provádí z hodnot Hb [g·l<sup>-1</sup>] a z PCV [l·l<sup>-1</sup>] dle níže uvedeného vzorce. Výsledná hodnota je uváděna v l·l<sup>-1</sup> (Svobodová a kol., 1986, 2012).

U zdravého kapra obecného se hodnota MCHC pohybuje v rozmezí 0,20 – 0,26 l·l<sup>-1</sup> (Svobodová a kol., 1986).

Vzorec pro výpočet MCHC:

$$MCHC = \frac{Hb}{PCV \cdot 1\,000}$$

Schopnost ovlivnit hodnotu MCHC byla prokázána u nanočástic stříbra (zvyšování hodnoty MCHC při expozici kapra obecného v 50% koncentraci LC50 nanočástic Ag a AgNO<sub>3</sub>) (Vali a kol., 2020), chromu (snížení hodnoty) (Abedi a kol., 2012), olova (vzrůst hodnoty MCHC při expozici kapra obecného prostředí s koncentrací olova 10 mg·l<sup>-1</sup>) (Witeska a kol., 2010b) a v neposlední řadě u amoniaku (snížení hodnoty MCHC při akutní intoxikaci amoniakem - NH<sub>3</sub>) (Spangenberg a kol., 1989). Dále lze snížený stav MCHC nacházet u kapřího plůdku při hypochromní anémii (Pravda a Svobodová, 2003).

#### 2.4.9. Leukokritová hodnota (Lk)

Zjištění leukokritové hodnoty je hojně využíváno díky svému snadnému a rychlému provedení, nezátíženosti subjektivní chybou a vhodností pro vyšetření velkého množství vzorků (Svobodová a kol., 2012). Dle Luskové (1997) by však tomuto parametru neměla být přikládána velká vypovídací hodnota, neboť vyjma pstruha obecného (*Salmo trutta*) a ostroretky stěhovavé (*Chondrostoma nasus*) nebyl u žádných ryb prokázán statistický vztah mezi hodnotou Lk a WBC. Problémem při stanovování Lk je dle citované autorky skutečnost, že nelze v některých vzorcích jakkoliv odlišit a určit přesnou délku vrstvy leukocytů v kapiláře.

Stanovení probíhá v kapiláře upravené pro stanovení hematokritové hodnoty (viz kapitola 2.4.4. Hematokritová hodnota (PCV)). V kapiláře je pod 60násobným

zvětšením sledována a měřena tenká vrstvička leukocytů na rozhraní červených krvinek a krevní plazmy. Výsledná hodnota je vypočtena z poměru délky vrstvy leukocytů ku celkové délce krve v kapiláře. Hodnota je uváděna v  $l \cdot l^{-1}$  (Svobodová a kol., 1986, 1991; Pravda a Svobodová, 2003).

Leukokritová hodnota kapra obecného se pohybuje v intervalu 0,002 – 0,01  $l \cdot l^{-1}$  (Svobodová a kol., 1986).

Změny leukokritové hodnoty u ryb dle Luskové (1997) sledujeme v průběhu roku díky působení sezónních vlivů. Tatáž autorka uvádí, že hodnota Lk nedosahovala rozdílných hodnot mezi pohlavími ani u rozdílně starých ryb. Možným důvodem pro změnu hodnoty Lk je i fotoperioda. Při posunu fotoperiody z 12 světelných a 12 temných hodin na 18 světelných a 6 temných došlo ke snížení Lk na poloviční množství (Sari a kol., 2020). Faktorem ovlivňujícím Lk je i amoniak. Při akutní intoxikaci  $NH_3$  dochází ke snižování hodnoty Lk (Spangenberg a kol., 1989).

#### **2.4.10. Diferenciální rozpočet leukocytů (Leukogram)**

Nejčastějšími důvody pro stanovování diferenciálního rozpočtu leukocytů jsou: podpůrné vyšetření pro stanovení diagnózy nakažených ryb, kontrola průběhu nemoci či léčby a experimentální zjišťování změn v počtech leukocytů při vlivu patogenů a chemických látek. Metoda stanovení leukogramu má svá úskalí. K bezchybnému provedení je zapotřebí určité zručnosti při přípravě, respektive barvení vzorků, a následně je důležitá dobrá rozpoznávací zdatnost při určování jednotlivých typů leukocytů (Piačková a kol., 2014b). Obtížné určování leukocytů je dle Hrubce a Smitha (2006) zapříčiněno výskytem vývojových stádií leukocytů v krevním řečišti a stále celosvětově nesjednoceným tříděním a terminologií bílých krvinek.

Princip metody stanovení leukogramu sestává z následujících kroků: vytvoření krevního nátěru na podložní sklo, obarvení krevního nátěru, zafixování vzorků (pokud nátěr není obarven do 4 hodin od vyhotovení, je potřebné zafixovat předem za pomoci metanolu) a následné počítání leukocytů. Počítání jednotlivých typů leukocytů probíhá do dosažení souhrnné sumy 100, respektive 200 kusů. Ze zjištěných dat je dopočítáván procentuální podíl zastoupení jednotlivých typů bílých krvinek a kusový podíl určený z celkového množství bílých krvinek (WBC), který je, stejně jako WBC, uváděn



v jednotkách  $G \cdot l^{-1}$  (Pravda a Svobodová, 2003; Svobodová a kol., 2012; Piačková a kol., 2014b). Podrobný popis metody je uveden v kapitole 3.2.3. - Metodický postup stanovování hematologických ukazatelů.

Průměrné hodnoty diferenciálního rozpočtu leukocytů u kapa obecného podle Svobodové a kol. (2012) – jsou uvedeny v Tab. č. 1.

Změny v diferenciálním rozpočtu leukocytů nejčastěji nastávají vlivem patogenních činitelů nebo chemických látek. Při onemocnění, které je doprovázeno zánětlivými procesy, dochází především k nárůstu počtu myelocytů a metamyelocytů (Pravda a Svobodová, 2003). Při vystavení ryb prostředí se zvýšenou koncentrací mědi se v krvi začne snižovat procentický podíl lymfocytů a zvyšuje se množství monocytů (Svobodová a Máchová, 1985). Pokud dojde k vystavení ryb zvýšené koncentraci zinku ( $20 \text{ mg} \cdot l^{-1}$ ), projevem bude zvýšení procenta zastoupení neutrofilních granulocytů a pokles procentuálního zastoupení lymfocytů (Pravda a Svobodová, 2003; Witeska a Kościuk, 2003). Inhibiční vliv na množství lymfocytů v krvi mají organofosfáty a pesticidy na bázi triazinů. Triaziny svým vlivem způsobují navyšování počtů monocytů (Pravda a Svobodová, 2003), organofosfáty spíše vyvolávají nárůst množství neutrofilních granulocytů (Svoboda a kol., 2001).

**Tabulka č. 1:** Diferenciální rozpočet leukocytů kapa obecného (Svobodová a kol., 2012).

Lymfocyty [%]	Monocyty [%]	Neutrofilní granulocyty [%]	Eozinofilní granulocyty [%]	Bazofilní granulocyty [%]
76 – 97,5	3 – 5	2 – 10	0 – 1	0 – 0,5

Poznámka: Nf. = Neutrofilní

## 2.5. Edémová nemoc kaprů (Carp Edema Virus Disease; CEVD)

Edémová nemoc kaprů, či mnohými autory uváděná spavá nemoc koi kaprů (Koi sleepy disease; KSD), je řazena do virových onemocnění (Ono a kol., 1986).

První zmínky o tomto onemocnění pochází ze sedmdesátých let dvacátého století z Japonska (Murakami a kol., 1976). Vyjma Japonska byla nákaza prokázána na přelomu tisíciletí v USA. V Evropě byla nákaza poprvé objevena v roce 2009 na území Velké Británie (Hedrick a kol., 1997; Way a Stone, 2013). V rámci České republiky byla nákaza poprvé zaznamenána v roce 2013 (Piačková a kol., 2019a).

### Původce CEVD

Původce CEVD, označovaný jako kapří edema virus (CEV), je DNA virem z čeledi Poxviridae, z podčeledi Chordopoxvirinae (Moss, 2007). Poxviry, dosahující velikosti 230 – 300 nm, mají genom složený z dvouvláknové lineární DNA a ve své virové partikuli mají obsaženou enzymatickou výbavu pro syntézu RNA i DNA (Murray a kol., 2021). Vyjma CEVD jsou prokázána další dvě onemocnění ryb způsobovaná poxvirem. Jedná se o poxvirovou nemoc žaber u lososa obecného (*Salmo salar*) a proliferativní zánět žaber aju východního (*Plecoglossus altivelis*) (Wada a kol., 2008; Gjessing a kol., 2017). Společným znakem všech jmenovaných nemocí je dle Mosse (2007) jejich afinita k žábrám.

U kapřího edema viru jsou rozeznávány dvě genetické skupiny. Genetická skupina I je známa u kaprů obecných a skupina II je především nalézána ve vzorcích z kaprů koi. Genetická skupina II je dále rozdělena na dvě genetické linie (linie IIa; linie IIb). Právě linii IIb lze naleznout i ve vzorcích z kaprů obecných (Matras a kol., 2017). Morfologie CEV je sledována pod elektronovými mikroskopy, ovšem bez provedení zdárné kultivace viru na buněčných liniích je obtížné stanovit výslednou podobu kapřího edema viru (Piačková a kol., 2019a).

## **Druhy vnímavé k CEV**

Vnímavost k tomuto viru byla doposud prokázána pouze u kapra obecného a u jeho barevné variety koi (Piačková a kol., 2019a). Hesami a kol. (2015) však uvádějí, že by vnímavým druhem mohl být i karas zlatý (*Carassius auratus*), neboť tento druh vykazuje vnímavost i k ostatním virovým agens působícím pouze na kapra obecného a koi.

## **Zdroj nákazy**

Za hlavní zdroje nákazy jsou považovány již nakažené ryby a voda, do které se viry dostávají z nemocí poškozené tkáně žaber a kůže (Hesami a kol., 2015). Piačková a kol. (2019a) dodávají, že potenciálním zdrojem nákazy může být i rybářské náčiní. Předpokládanou vstupní branou CEV jsou žábra a mechanicky poškozená kůže ryb (Hesami a kol., 2015). Pro budoucí studium choroby je důležité zjistit, zda se CEV přenáší na larvální stádia skrze jikry a sperma a po jakou dobu zůstává virus bez hostitele infekční (Oyamatsu a kol., 1997).

## **Faktory podmiňující nákazu**

Nejdůležitějším podmiňujícím faktorem propuknutí nákazy je teplota. U genetické skupiny II je optimálním teplotním rozmezím 15 – 25 °C (Hendrick a kol., 1997). Pro genetickou skupinu I se optimum teplot pohybuje v rozmezí 6 – 10 °C (Way a Stone, 2013). Tyto teplotní rozsahy jsou důvodem propuknutí onemocnění v rámci České republiky pouze v období jara a podzimu (Piačková a kol., 2019a).

## **Průběh a vývoj onemocnění**

Při nákaze u kaprů koi dochází k projevení prvních příznaků v průběhu jednoho týdne. Posléze 2 – 3 dny po prvních příznacích dochází k úhynu nakažených ryb. Mortalita může dosahovat 80 – 100 % (Hedrick a kol., 1997; Miyazaki a kol., 2005; Jung-Schroers a kol., 2015; Swaminathan a kol., 2016). Nákaza u jedinců kapra obecného se projevuje v rozmezí 4 – 10 dnů po nakažení. Díky nižší teplotě vody je průběh onemocnění mírnější a i úroveň mortality nedosahuje takových hodnot (Way a

Stone, 2013; Lewisch a kol., 2015). V průběhu nákazy dochází u ryb k častému projevení sekundárních onemocnění z důvodu oslabení organismu nákazou CEVD (Piačková a kol., 2019a).

### **Klinické symptomy**

Ani klinické symptomy nejsou pro kapra koi a kapra obecného totožné. Nakažení jedinci kaprů koi vykazují vysokou míru letargie a ztrátu únikového reflexu. Nakažené ryby se pohybují těsně nad hladinou či leží přímo na dně laterální stranou těla. Po podráždění letargická ryba na krátkou chvíli vyvine aktivitu, posléze však znovu upadá ke dnu nádrže (Miyazaki a kol., 2005; Hesami a kol., 2015). Oyamatsu a kol. (1997) uvádějí, že nakažená juvenilní stádia se spíše velmi pomalu pohybují po okrajích nádrže či těsně pod hladinou. U nakažených jedinců kapra obecného se projevuje pokles či úplná ztráta reflexů, malátnost a dušení. Typickým projevem je nahromadění ryb v místech s větší koncentrací O<sub>2</sub> a nouzové dýchání (troubení) kaprů (Piačková a kol., 2019a). Infikované ryby obvykle snižují příjem potravy (Miyazaki a kol., 2005).

### **Patologické symptomy**

Nejvíce postiženým místem při nákaze CEVD jsou žábry, a to díky afinitě poxvirů právě k této tkáni (Piačková a kol., 2019a). Na první pohled jsou žábry bledé, oteklé a nachází se na nich větší množství hlenu (Oymatsu a kol., 1997; Haenen a kol., 2014). Vyjma těchto změn žaberní tkáň je patrná hyperplazie (zmnožení) epitelálních buněk, otok postihující žaberní lístky i jejich báze (Miyazaki a kol., 2005; Jung-Schroers a kol., 2015) a nekrózy (viz Obr. č.7; 8). V průběhu onemocnění se v žaberní tkáni navyšuje koncentrace eosinofilních granulocytů a monocytů (Ono a kol., 1986; Miyazaki a kol., 2005). Na kůži se vytvářejí, zejména u mladších věkových kategorií kaprů, hemoragie a edém (Miyazaki a kol., 2005). Dospělým rybám bývá diagnostikován enoftalmus oka, zánět v oblasti řitního otvoru a vředové projevy v okolí ploutví a úst (Miyazaki a kol., 2005; Haenen a kol., 2016; Swaminathan a kol., 2016; Zhang a kol., 2017). Lewisch a kol. (2015) uvádějí, že CEV způsobuje i multifokální nekrózy na hepatopankreatu a srdeční svalovině.



**Obrázek č. 7; 8:** Edém žaber a nekrotické konce žaberních lístků(vlevo). Výrazné zahlenění a nekróza žaber (vpravo) (foto: V. Piačková).

### **Diagnóza CEVD**

Definitivní diagnózu poskytuje pouze výsledek PCR testů (Hesami a kol., 2015). Jako pomocné metody lze využít transmisní elektronovou mikroskopii, eventuálně optickou mikroskopii (Way a kol., 2017). U poxvirů nelze využít metodu kultivace virů na buněčných liniích, jako je běžné u jiných virových onemocnění nepoxvirového původu (Jung-Schroers a kol., 2015; Lewisch a kol., 2015). Laboratorní diagnostika se provádí na základě zjištění patognomických klinických příznaků (Ono a kol., 1986).

K provedení PCR testu je jako zdroj virové DNA nejvhodnější žaberní tkáň. Pro jisté stanovení přítomnosti DNA kapřího edema viru je nutné, z důvodu genetické variability viru, použít více sad primerů. Tímto postupem je zajištěno zachycení DNA všech variant CEV (Miyazaki a kol., 2005; Adamek a kol., 2017a; 2017b).

### **Léčba CEVD**

Specifická léčba CEVD, stejně jako jiných virových chorob ryb, není známa. Při propuknutí infekce je rybám možno podávat podpůrně antibiotika k potlačení možných druhotných bakteriálních nákaz (Way a kol., 2017; Piačková a kol., 2019a). Experimentálně Lewisch a kol. (2015) zkusili léčbu CEVD podáním antibiotika Enrofloxacinu a podpůrné dávky vitamínů A, D<sub>3</sub>, E a C. V průběhu léčby nebylo pozorováno žádné zlepšení zdravotního stavu a třetí den od počátku experimentu byla zaznamenána 100% mortalita ryb.

## **Prevence před nákazou CEVD**

Za základní preventivní opatření před nákazou CEVD považují Way a kol. (2017) opatření běžně používaná i před nákazou koi herpes virem. Autoři uvádějí tato opatření: zajišťování ryb z prověřených a kvalitních chovů, následná karanténizace ryb (minimálně 30 dní ve vodě s teplotním rozmezím 10 – 15 °C), provádění pravidelných desinfekcí chovných nádrží a rybářského náčiní, zabránění vniku ryb do chovné nádrže s přítokovou vodou a zajištění dobrého kondičního stavu ryb. V Japonsku je běžně používaným preventivním opatřením po vystavení ryb stresové situaci (výlov, transport) dlouhodobá koupel ryb v 0,5% roztoku NaCl. Působení soli vede ke snížení toxicity dusitanů, a tím ke snížení hladiny methemoglobinu v krvi. Zvýšená hladina methemoglobinu je výrazný stresor a jeho potlačení zajistí lepší rezistenci vůči CEV (Seno a kol., 2003; Miyazaki a kol., 2005; Way a kol., 2017). Někteří chovatelé z preventivních důvodů neprovádějí výlovy a transport ryb v období, kdy se teplota vody pohybuje v rozmezí vhodném pro propuknutí infekce CEVD (Hesami a kol., 2015; Way a kol., 2017).

### **3. Materiál a metodika**

Bakalářská práce je cílena na „Změny hematologických parametrů při jarních úhynech kaprů“. V průběhu jara 2019 byly odebírány vzorky tkání a krve ryb v terénu na základě hlášeného zvýšeného úhynu kapra. Ve stejných lokalitách byly odběry provedeny na podzim. Vzorky byly následně zpracovány v laboratořích Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického Fakulty rybářství a ochrany vod ve Vodňanech a v laboratořích Oddělení infekčních chorob a preventivní medicíny Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně. Projekt byl zaměřen především na zkoumání vlivu edémové nemoci kaprů na hematologické parametry nakažených ryb, obzvláště pak na změny v diferenciálním rozpočtu leukocytů.

#### **3.1. Materiál**

##### **3.1.1. Ryby**

Zkoumanými rybami bylo padesát osm jedinců kapra obecného (*Cyprinus carpio*) o hmotnosti v rozmezí 850 – 3095 g ze třech odlišných lokalit. Zkoumaná jedinci byli odebráni při terénním šetření úhynů na základě podezření na onemocnění CEVD.

##### **3.1.2. Lokality odběru vzorků**

###### **Lokalita č. 7**

Rybník o rozloze 8,5 ha vodní plochy. Odběr vzorků byl proveden 24. 4. 2019 při teplotě 12 °C na základě pozorovaného zvýšeného úhynu kapra. Ve stejné lokalitě byly odebrány vzorky ryb 29. 11. 2019 při teplotě 5 °C. Na jaře byly odebrány vzorky z 10 ryb o kusové hmotnosti 1 150 – 1 875 g, na podzim z 10 ks ryb o kusové hmotnosti 1 550 – 2 320 g.

###### **Lokalita č. 8**

Rybník o rozloze 12 ha vodní plochy. Odběr vzorků byl proveden 24. 4. 2019 při teplotě 12 °C na základě pozorovaného zvýšeného úhynu kapra. Ve stejné lokalitě byly odebrány vzorky ryb 8. 11. 2019 při teplotě 7 °C. Na jaře byly odebrány vzorky z 8 ryb o kusové hmotnosti 1 230 – 3 095 g, na podzim z 10 ks ryb o kusové hmotnosti 1 885 – 3 325 g.

## **Lokalita č. 11**

Rybník o rozloze 4 ha vodní plochy. Odběr vzorků byl proveden 6. 5. 2019 při teplotě 8 °C na základě pozorovaného zvýšeného úhynu kapra. Ve stejné lokalitě byly odebrány vzorky ryb 20. 11. 2019 při teplotě 5 °C. Na jaře byly odebrány vzorky z 10 ryb o kusové hmotnosti 640 – 1 000 g, na podzim z 10 ks ryb o kusové hmotnosti 995 – 1 730 g.

## **3.2. Metodika**

### **3.2.1. Vnější ohledání ryb**

Ryby, u kterých bylo podezření na nákazu CEVD, byly podrobeny důkladnému vnějšímu ohledání. Největší soustředění bylo směřováno na žaberní tkáň, kůži, případné hemoragie, vředové útvary u bází ploutví a v okolí úst a na úroveň zahlenění kůže a žaber. V rámci nákazy CEVD byla sledována vnímavost na vzruchy z okolí a následně míra únikové schopnosti. Zjištěné změny byly zaznamenány do protokolu a následně byly vyhodnoceny. Pozorované výsledky jsou zmíněny v kapitole 4.1.

### **3.2.2. Odběr vzorků krve a žaberní tkáně**

Pro potřeby analýzy hematologických parametrů u sledovaných jedinců bylo každé rybě odebráno cca 2 ml krve. K odběru krve byly použity injekční stříkačky propláchnuté heparinem sodným a mikrozkuhavky. Krev byla odebírána z ocasní cévy dle metody popsané v kapitole 2.4.1. (Metoda odběru krve ryb punkcí cév ocasních). Část krve byla nakapána na hodinové sklíčko, odkud byla nabrána do hematokritových kapilár a napipetována do Hayemova roztoku pro počítání krvinek. Také krevní nátěry byly zhotoveny přímo na místě a po zaschnutí fixovány metanolem. Zbytek krve byl transportován na ledu do laboratoře v hermeticky uzavřených mikrozkuhavkách označených číselným kódem, aby nemohlo dojít k záměně vzorků.

Vzorek žaberní tkáně, který byl následně využit pro stanovení přítomnosti CEV pomocí PCR testu, byl odebrán za pomoci sterilních chirurgických nástrojů po omrácení a usmrcení ryby. Odebraný vzorek byl vložen do sterilní zkuhavky s totožným číselným označením jako vzorek krve daného jedince.



### 3.2.3. Metodický postup stanovování hematologických ukazatelů

Stanovování hematologických parametrů krve ryb probíhalo v laboratorních podmínkách VÚRH Vodňany. Stanovení jednotlivých parametrů proběhla v nejkratším možném čase, aby nedošlo k případným degradačním procesům v krvi, které by mohly vést ke snížení výpovědní hodnoty vzorků.

Stanovení hodnoty RBC bylo provedeno dle metody popsané v kapitole 2.4.2. - Počet erytrocytů (RBC). K ředění krve byl využit Hayemův roztok připravený dle Svobodové a kol. (2012). Krev byla přímo na místě odběru naředěna Hayemovým roztokem v poměru 1:200, respektive 25  $\mu$ l krve na 4 975  $\mu$ l Hayemova roztoku. Počítání bylo provedeno v laboratoři pod dvou set násobným zvětšením z 20 obdélníků stejnoměrného rozmístění po celé počítací mřížce dle Bürkera. Výsledná hodnota, vydělená číslem 100, byla řádně zapsána pod číselným kódem ryby.

Stanovení hodnoty WBC bylo provedeno dle metody popsané v kapitole 2.4.3. - Počet leukocytů (WBC). V tomto případě byl k ředění krve ve stejném poměru a množství využit Natt-Herrickův roztok připravený dle Svobodové a kol. (2012). Počítání proběhlo pod stejným zvětšením mikroskopu jako to předchozí. Počet leukocytů, stanovený ze sta velkých čtverců Bürkerovy komůrky, byl následně vydělen dvěma a zapsán do výsledkových tabulek.

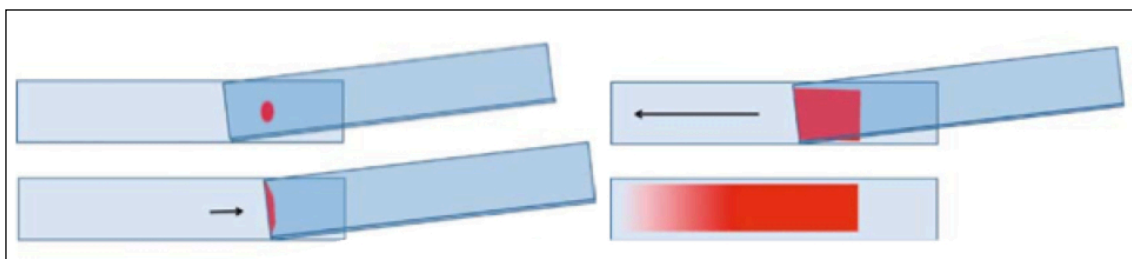
Hematokritová hodnota byla stanovena pomocí metody popsané v kapitole 2.4.4. - Hematokritová hodnota (PCV). Pro každý vzorek krve byla provedena dvě měření. Hodnoty odečtené z hematokritového měřidla byly vynásobeny koeficientem 0,01. Následně byl ze dvou hodnot vypočten aritmetický průměr, který je uváděn jako hodnota výsledná.

Množství hemoglobinu bylo stanoveno na základě metody Svobodové a kol. (2012), která je blíže popsána v kapitole 2.4.5. - Množství hemoglobinu (Hb). V tomto případě byl použit roztok dle van Kampena a Zijlstra. Krev byla ředěna v poměru 25  $\mu$ l krve ku 7 ml roztoku. Stanovení při vlnové délce 540 – 546 nm bylo provedeno ve fotometrickém přístroji SPECTRONIC® 20 GENESYS™.

Charakteristiky erytrocytů (MCV, MCH, MCHC) byly vypočteny z již zjištěných a zapsaných hodnot. Hodnoty byly vypočítávány pomocí vzorců uvedených v kapitolách 2.3.6., 2.3.7. a 2.3.8.

### 3.2.4. Metodický postup stanovení leukogramu

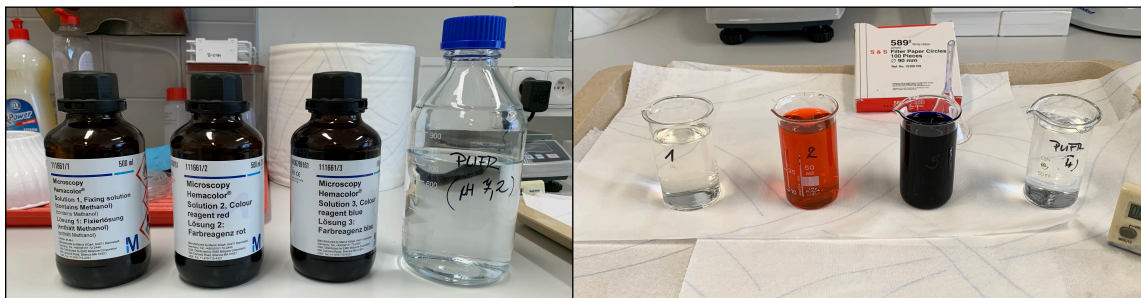
Za pomoci odebrané krve, podložního skla, roztěrového sklíčka a laboratorní pipety bylo utvořeno po dvou krevních nátěrech pro každého jedince kapra obecného. Vytvořením dvou kusů je předcházeno případným ztrátám či znehodnocení jednoho ze vzorků. Na číselným kódem označené podložní sklíčko bylo pipetou naneseo 5  $\mu$ l krve. Ke kapce krve bylo pod úhlem 30 – 40 ° přiloženo roztěrové sklíčko a následným plynulým pohybem byla krev rozetřena po celé délce podložního skla (viz Obr. č. 9). Vyhotovené nátěry se nechaly důkladně zaschnout. Posléze byly zafixovány v metylalkoholu (zhotovení nátěrů a jejich fixace byly provedeny přímo v terénu).



**Obrázek č. 9:** Zhotovení krevního nátěru (Piačková a kol., 2014).

K barvení krevních nátěrů byl využit komerční barvicí kit Hemacolor<sup>®</sup>. Využití tohoto kitu bylo zvoleno na základě jednoduchosti a rychlosti provedení v porovnání s jinými metodami barvení (Piačková a kol., 2014). Barvicí sada Hemacolor<sup>®</sup> sestává ze tří roztoků (1. Fixing solution (contains Methanol); 2. Colour reagent red; 3. Colour reagent blue) a z fosfátového pufru o pH 7,2 (viz Obr. č. 10). Fosfátový pufr je dodáván ve formě tablety, kterou je potřeba rozpustit přesně v 1 litru destilované vody. Zbylé tři roztoky jsou připravené k okamžitému použití. Pro potřeby barvení bylo nutné roztoky a pufr přelít v menším množství do laboratorních kádinek o objemu 50 ml (viz Obr. č. 11). Přelévání bylo provedeno skrze laboratorní nálevku opatřenou filtračním papírem. V průběhu vlastního barvení bylo nutné dodržovat doby ponoření nátěrů v jednotlivých roztocích a pufru, které udává výrobce barvicího kitu. V roztoku č. 1 bylo nutné ponechat nátěr po dobu 30 sekund, v roztoku č. 2 tři sekundy, v roztoku č. 3 šest sekund

a ve fosfátovém pufru byly vzorky ponechány po dobu 20 sekund. Mezi každým přesunutím nátěru z jednoho roztoku do druhého bylo zapotřebí nechat sklíčko důkladně okapat, aby nedocházelo k mísení roztoků. Posledním krokem bylo vložení obarvených nátěrů do stojanů pod úhlem cca 45 °(viz Obr. č. 12). Zde došlo k oschnutí nátěrů a díky sklonu k odtoku přebytečné kapaliny z nátěru.



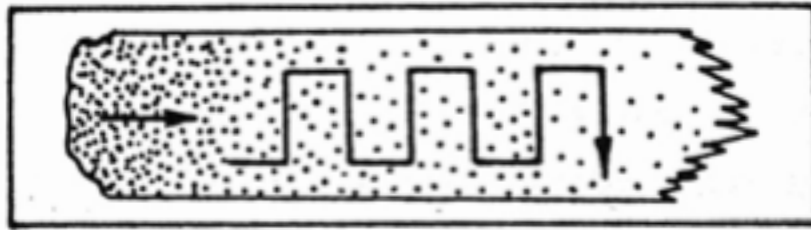
**Obrázek č. 10; 11:** Komerční barvicí kit Hemacolor® (vlevo). Barvicí řada Hemacolor® v 50ml kádinkách (vpravo) (foto: A. Nádaský).



**Obrázek č. 12:** Obarvené krevní nátěry (foto: A. Nádaský).

Počítání jednotlivých typů leukocytů bylo provedeno za pomoci optického mikroskopu opatřeného digitální kamerou. Obraz byl promítán na obrazovce skrze softwarové řešení Olympus Stream o tisícinásobném zvětšení s využitím imerzního objektivu. Počty typů leukocytů byly stanovovány v zadní části krevního nátěru, kde byla hustota nátěru menší a jednotlivé krevní elementy zde byly lépe identifikovatelné. Nátěr byl prohlížen meandrovitým pohybem v jednom směru, abychom předešli opakovanému započítání jednoho leukocytu (viz Obr. č. 13). Z každého krevního nátěru bylo stanoveno přesně 200 leukocytů. Následně bylo ze zjištěných údajů dopočteno procentuální zastoupení sledovaných typů leukocytů a přesné množství v jednotkách  $G \cdot l^{-1}$  z celkové hodnoty WBC.

Celý metodický postup stanovení leukogramu byl proveden dle Piačkové a kol. (2014).



**Obrázek č. 13:** Způsob prohlížení krevního nátěru (Svobodová a kol., 1986).

### **3.2.5. Stanovení DNA CEV pomocí PCR metody**

Stanovení přítomnosti DNA kapřího edema viru proběhlo na Oddělení infekčních chorob a preventivní medicíny, Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně dle metody popsané Piačkovou a kol. (2019b).

### **3.2.6. Vyhodnocení výsledků**

Veškeré stanovené údaje a výsledky byly průběžně zaznamenány v programu Apple Numbers. Vyhodnocení zjištěných výsledků bylo provedeno v softwarovém řešení STATISTICA 12, za použití jednofaktorového ANOVA testu. Statisticky významné změny byly vyhodnoceny na hranici významnosti  $P < 0,05$ . Z výsledků statistického zpracování je vyhotoveno konečné vyhodnocení výsledků podložené grafickým znázorněním.

## 4. Výsledky

### 4.1. Vnější ohledání ryb

Při vnějším ohledání ryb byly nejčastěji pozorovanými patologickými změnami edém a nekróza žaber, zarudlá kůže v břišní části těla ryb a zvětšená slezina. Přesný popis každé odlovené ryby v jarním období je uveden v Tab. č. 2. Při podzimních odběrech byly ryby v dobrém zdravotním stavu, bez viditelných změn na žábrách, na kůži i na vnitřních orgánech. Vzorčky byly odebírány z důvodu ověření, zda ve tkáni žaber stále přetrvává virová DNA.

**Tabulka č. 2:** Výsledky zevního ohledání a patologicko-anatomického vyšetření ryb v jarním období. Ve třech podtabulkách jsou vyjma patologických změn uvedeny i výsledky PCR testů na přítomnost DNA kapřího edema viru, číslo ryby a lokalita, ze které byla sledovaná ryba odlovena.

Lokalita 7			
Č. ryby	CEV +/-	Změny na žábrách	Další patologické změny
1	+	Světlé skvrny (počínající nekróza)	-
2	+	Edém žaber	Zarudnutí břicha
3	+	Zvýšené zahlenění	-
4	+	Edém žaber	Zarudnutí břicha
5	+	Nekróza žaber	-
6	+	-	Mléčně zakalený hlen – skvrnitý vzhled
7	-	Nekróza žaber	Zarudlé břicho
8	+	Edém žaber	Zarudlé břicho
9	+	Edém žaber, počínající nekróza	Zarudlé břicho
10	+	Edém žaber, počínající nekróza	Zarudlé břicho

Lokalita 8			
Č. ryby	CEV +/-	Změny na žábrách	Další patologické změny
1	+	-	-
2	+	Edém žaber	Zvětšená slezina
3	+	-	Skvrny na kůži, mléčně zakalený hlen
4	-	Mramorování žaber – počínající nekróza	Nástřík cév mezi prsními ploutvemi
5	-	Edém žaber	Zarudlé břicho (nástřík cév)
6	+	Edém žaber	Zarudlé břicho, zvětšená slezina
7	+	Edém žaber	Zarudlé břicho
8	-	Edém žaber	Zarudlé břicho
Lokalita 11			
Č. ryby	CEV +/-	Změny na žábrách	Další patologické změny
1	-	Edém žaber	-
2	-	Zarudnutí žaber, krváceniny	-
3	+	Edém žaber	Zarudlé skvrny na kůži
4	+	Edém žaber	Zarudlé skvrny na kůži, zvětšená slezina
5	-	Edém žaber	Zvětšená slezina
6	+	Edém žaber	Zarudlé skvrny na kůži
7	-	Edém žaber	Zvětšená slezina
8	+	Edém žaber	Zvětšená slezina
9	-	-	-
10	+	-	-

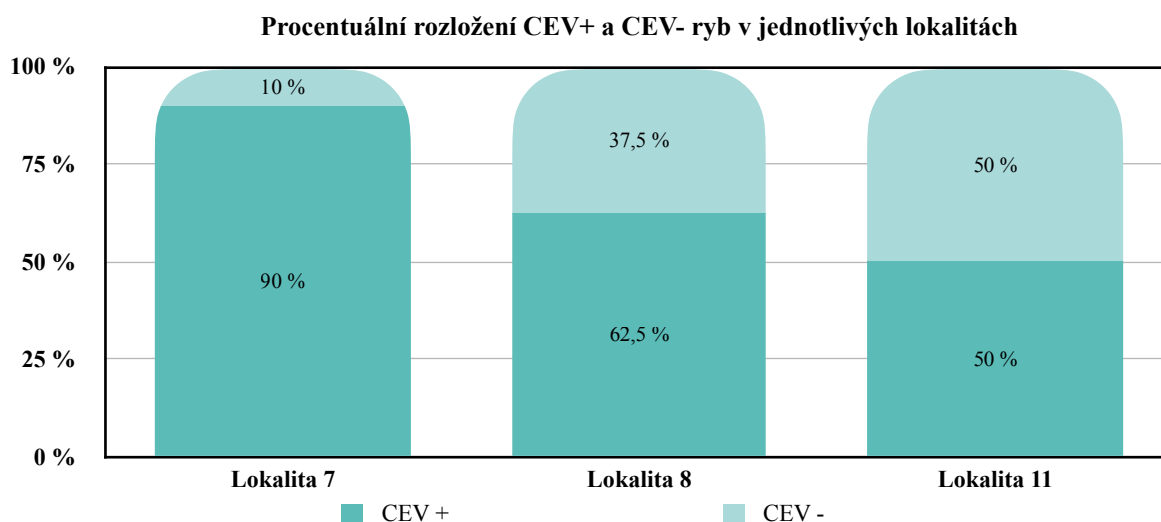
## 4.2. Hematologické vyšetření

### 4.2.1. Porovnání výsledků hematologických vyšetření CEV+/- ryb

Do porovnání byly zařazeny pouze ryby z jarního vzorkování, protože na podzim PCR testy neprokázaly DNA kapřího edema viru v žádném ze vzorků. U ryb z jarního období byla PCR testy prokázána DNA kapřího edema viru u devatenácti jedinců z celkových dvaceti osmi. Procentuální zastoupení CEV+ a CEV- ryb v jednotlivých lokalitách je znázorněno v Grafu č. 1. Do statistického vyhodnocení byly zařazeny všechny CEV + a CEV – ryby z jarního vzorkování bez ohledu na lokalitu.

Po vyhodnocení všech sledovaných hematologických parametrů byl prokázán statisticky významný rozdíl u následujících tří parametrů: celkový počet erytrocytů (RBC), hematokrit (PCV) a koncentrace hemoglobinu (Hb). Po stanovení hodnot RBC a po zjištěném navýšení této hodnoty u CEV+ ryb o  $0,55 \text{ T}\cdot\text{l}^{-1}$ , bylo zvýšení hodnot PCV a Hb očekáváno. Následné stanovení hodnot PCV a Hb potvrdilo předpoklady. U obou hematologických parametrů došlo k nárůstu hodnoty u CEV+ ryb zhruba o jednu třetinu - viz Tab. č. 3. U zbylých hematologických parametrů nebyl mezi zdravými a nakaženými jedinci zaznamenán statisticky významný rozdíl.

Při sledování rozdílů v diferenciálním rozpočtu leukocytů, zapříčiněných vlivem CEV, bylo zjištěno, že hodnoty jsou u jednotlivých ryb velmi variabilní a vlivem nízké homogenity nebyl žádný rozdíl statisticky vyhodnocen jako signifikantní. Pouze v relativním zastoupení neutrofilů – tyček byla průměrná hodnota u CEV+ ryb signifikantně vyšší (o 4,3 %) - viz Graf č. 2.



**Graf č. 1:** Procentuální zastoupení CEV+ a CEV- ryb v jednotlivých lokalitách.

**Tabulka č. 3:** Výsledné hodnoty hematologických parametrů při vlivu CEV. V tabulce jsou uvedeny zvlášť hodnoty pro ryby, u kterých PCR prokázalo přítomnost DNA CEV a u kterých nikoliv, z jarního období. Jednotlivé výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Rozdíly mezi skupinami označenými odlišným abecedním znakem jsou statisticky významné na hladině  $P < 0,05$ .

	Jarní období, CEV +	Jarní období, CEV -
<b>RBC [T·l<sup>-1</sup>]</b>	1,81 <sup>a</sup> ± 0,54	1,26 <sup>b</sup> ± 0,35
<b>WBC [G·l<sup>-1</sup>]</b>	32,32 ± 23,87	47,00 ± 19,32
<b>PCV [l·l<sup>-1</sup>]</b>	0,35 <sup>a</sup> ± 0,12	0,23 <sup>b</sup> ± 0,06
<b>Hb [g·l<sup>-1</sup>]</b>	91,72 <sup>a</sup> ± 22,34	60,49 <sup>b</sup> ± 19,98
<b>MCV [fl]</b>	194,07 ± 42,24	187,11 ± 33,81
<b>MCH [pg]</b>	52,43 ± 10,46	47,55 ± 8,29
<b>MCHC [l·l<sup>-1</sup>]</b>	0,27 ± 0,04	0,26 ± 0,05

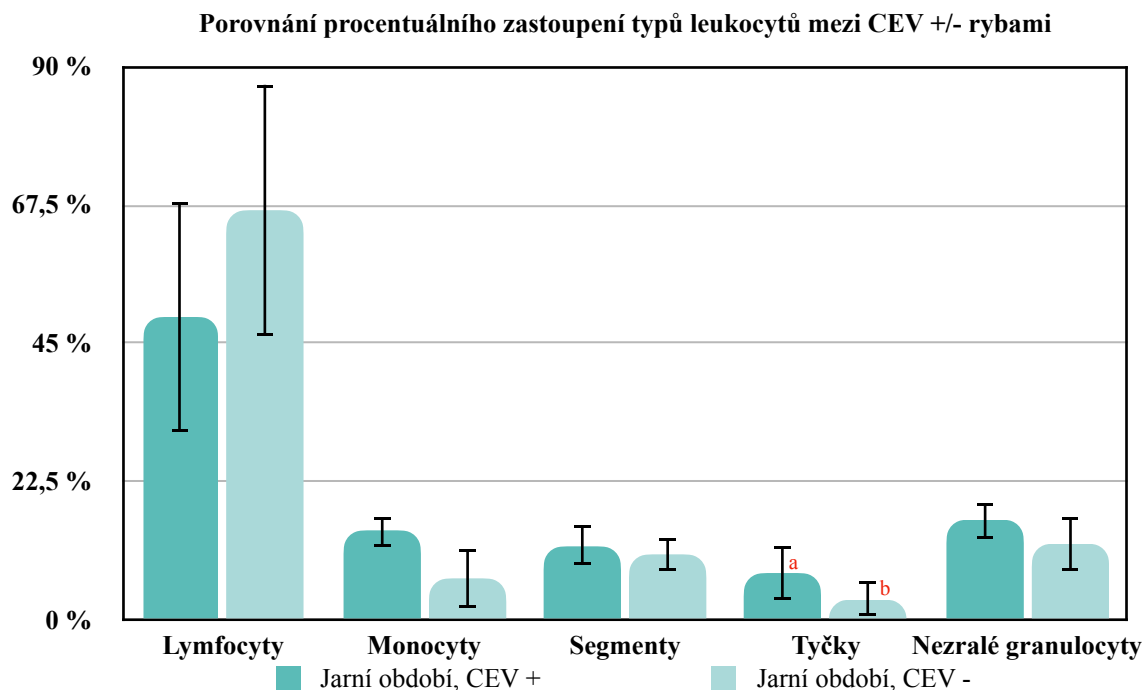
Poznámka: CEV + (CEV pozitivní); CEV - (CEV negativní)

**Tabulka č. 4:** Výsledné hodnoty jednotlivých typů leukocytů při vlivu nákazy CEVD. V tabulce jsou uvedeny zvlášť hodnoty pro ryby, u kterých PCR prokázalo přítomnost DNA CEV a u kterých nikoliv, z jarního období. Jednotlivé výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Rozdíly mezi skupinami označenými odlišným abecedním znakem jsou statisticky významné na hladině  $P < 0,05$ .

	Jarní období, CEV +	Jarní období, CEV -
<b>Lymfocyty [G·l<sup>-1</sup>]</b>	18,35 ± 18,64	28,03 ± 20,53
<b>Monocyty [G·l<sup>-1</sup>]</b>	3,37 ± 2,47	3,31 ± 4,79
<b>Segmenty [G·l<sup>-1</sup>]</b>	3,99 ± 3,29	5,09 ± 2,46
<b>Tyčky [G·l<sup>-1</sup>]</b>	2,16 ± 2,33	1,53 ± 1,14
<b>Nez. gran. [G·l<sup>-1</sup>]</b>	4,44 ± 2,82	5,55 ± 4,37

Poznámka: CEV + (CEV pozitivní); CEV - (CEV negativní); Nez. gran. (nezralé granulocyty)





**Graf č. 2:** Porovnání procentuálního zastoupení typů leukocytů mezi CEV+ a CEV- rybami. Rozdíly mezi skupinami označenými odlišným abecedním znakem jsou statisticky významné na hladině  $P < 0.05$ .

#### 4.2.2. Porovnání výsledků hematologických vyšetření mezi jarním a podzimním obdobím v jednotlivých lokalitách

Statistické porovnání rozdílů hematologických parametrů mezi rybami z jarního a podzimního vzorkování bylo provedeno doplňkově. Nelze toto stanovení považovat za směrodatné, neboť rozdíly mohly vzniknout působením širokého spektra odlišných vlivů (teplota, světelný režim, potravní aktivita, reprodukční aktivita, působení polutantů, nemocí, patogenů, toxických látek a mnohé další).

Ke statisticky významnému rozdílu hematologických parametrů došlo ve čtrnácti z celkových jedenadvaceti sledovaných údajů. Hodnota RBC doznala významných rozdílů ve všech lokalitách. V prvních dvou došlo u ryb z podzimního vzorkování ke snížení hodnoty RBC, naopak tomu bylo v lokalitě 11, kde došlo k navýšení. Počet bílých krvinek významně klesl v lokalitě 7 a 11. Ve druhé zmiňované lokalitě došlo ke snížení průměrné hodnoty WBC v podzimním období o  $40,5 \text{ G} \cdot \text{l}^{-1}$ . Statisticky významný nárůst byl zaznamenán u podzimních hodnot PCV a Hb v lokalitách 7 a 11. Velké rozdíly byly zaznamenány u hodnoty MCV. V lokalitě 8 došlo k nárůstu

podzimních hodnot o 57,48 fl, respektive o 50,64 fl v lokalitě 11. Ve stejných lokalitách došlo ke statisticky významnému nárůstu i u hodnoty MCH. Posledním statisticky významným rozdílem je nárůst podzimní hodnoty MCHC v lokalitě 7 - viz Tab. č. 5.

Po vyhodnocení diferenciálního rozpočtu leukocytů bylo zjištěno devět statisticky významných rozdílů z patnácti sledovaných porovnaní. Statisticky významný rozdíl počtu lymfocytů byl prokázán ve všech lokalitách. U ryb z podzimního vzorkování lokality 7 došlo ke snížení o pouhých 0,72  $G \cdot l^{-1}$  lymfocytů. Klesající trend byl zaznamenán i v lokalitě 11, kde však došlo ke snížení o celých 30,94  $G \cdot l^{-1}$ . K podzimnímu nárůstu této hodnoty došlo v lokalitě 8. V témže místě a období došlo i k poklesu hodnoty celkového počtu monocytů. V případě granulocytů, došlo u všech statisticky významných rozdílů pouze ke snížení počtů jednotlivých typů v průběhu podzimního období. Největší rozdíl nastal u segmentů v lokalitě 11, kde došlo ke snížení hodnoty o 4,36  $G \cdot l^{-1}$  a u nezralých granulocytů v krvi ryb z lokality 8, kde došlo ke snížení o 4,79  $G \cdot l^{-1}$  - viz Tab. č. 6.

**Tabulka č. 5:** Výsledné hodnoty hematologických parametrů z jarního a podzimního období pro jednotlivé lokality. Jednotlivé výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Rozdíly mezi skupinami označenými odlišným abecedním znakem jsou statisticky významné na hladině  $P < 0,05$ .

	Lokalita 7		Lokalita 8		Lokalita 11	
	Jaro	Podzim	Jaro	Podzim	Jaro	Podzim
<b>RBC</b> [ $T \cdot l^{-1}$ ]	2,02 <sup>a</sup> $\pm$ 0,57	1,80 <sup>b</sup> $\pm$ 0,30	1,69 <sup>A</sup> $\pm$ 0,46	1,30 <sup>B</sup> $\pm$ 0,11	1,20 <sup>a</sup> $\pm$ 0,21	1,57 <sup>b</sup> $\pm$ 0,22
<b>WBC</b> [ $G \cdot l^{-1}$ ]	22,75 <sup>a</sup> $\pm$ 17,93	10,55 <sup>b</sup> $\pm$ 5,60	25,71 $\pm$ 15,33	27,10 $\pm$ 12,60	58,25 <sup>a</sup> $\pm$ 16,14	17,75 <sup>b</sup> $\pm$ 5,74
<b>PCV</b> [ $l \cdot l^{-1}$ ]	0,41 <sup>a</sup> $\pm$ 0,12	0,42 <sup>b</sup> $\pm$ 0,08	0,33 $\pm$ 0,06	0,33 $\pm$ 0,02	0,21 <sup>a</sup> $\pm$ 0,05	0,35 <sup>b</sup> $\pm$ 0,04
<b>Hb</b> [ $g \cdot l^{-1}$ ]	86,83 <sup>a</sup> $\pm$ 21,94	111,42 <sup>b</sup> $\pm$ 14,64	91,92 $\pm$ 23,81	83,31 $\pm$ 10,58	59,64 <sup>a</sup> $\pm$ 15,73	93,47 <sup>b</sup> $\pm$ 10,98
<b>MCV</b> [fl]	205,06 $\pm$ 51,65	238,15 $\pm$ 47,45	198,42 <sup>A</sup> $\pm$ 31,77	255,90 <sup>B</sup> $\pm$ 31,69	173,32 <sup>a</sup> $\pm$ 23,47	223,96 <sup>b</sup> $\pm$ 34,31
<b>MCH</b> [pg]	49,51 $\pm$ 13,63	62,99 $\pm$ 9,41	54,87 <sup>A</sup> $\pm$ 7,31	64,46 <sup>B</sup> $\pm$ 8,77	49,00 <sup>a</sup> $\pm$ 6,97	60,61 <sup>b</sup> $\pm$ 10,54
<b>MCHC</b> [ $l \cdot l^{-1}$ ]	0,24 <sup>a</sup> $\pm$ 0,04	0,27 <sup>b</sup> $\pm$ 0,03	0,28 $\pm$ 0,04	0,25 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,02

**Tabulka č. 6:** Výsledné hodnoty leukogramu jarního a podzimního období pro jednotlivé lokality. Jednotlivé výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka. Rozdíly mezi skupinami označenými odlišným abecedním znakem jsou statisticky významné na hladině  $P < 0,05$ .

	Lokalita 7		Lokalita 8		Lokalita 11	
	Jaro	Podzim	Jaro	Podzim	Jaro	Podzim
<b>Lymfocyty</b> [G·l <sup>-1</sup> ]	8,88 <sup>a</sup> ± 6,48	8,16 <sup>b</sup> ± 4,35	9,60 <sup>A</sup> ± 4,28	23,19 <sup>B</sup> ± 11,89	44,49 <sup>a</sup> ± 12,37	13,55 <sup>b</sup> ± 4,14
<b>Monocyty</b> [G·l <sup>-1</sup> ]	4,06 ± 3,18	0,38 ± 0,29	5,13 <sup>A</sup> ± 4,23	0,87 <sup>B</sup> ± 0,63	1,40 ± 0,90	0,73 ± 0,50
<b>Segmenty</b> [G·l <sup>-1</sup> ]	3,12 ± 3,05	0,87 ± 0,65	3,38 ± 2,43	1,71 ± 0,90	6,17 <sup>a</sup> ± 2,78	1,81 <sup>b</sup> ± 1,25
<b>Tyčky</b> [G·l <sup>-1</sup> ]	2,66 ± 3,17	0,32 ± 0,24	1,92 <sup>A</sup> ± 0,71	0,43 <sup>B</sup> ± 0,20	1,33 <sup>a</sup> ± 0,90	0,45 <sup>b</sup> ± 0,34
<b>Nez. gran.</b> [G·l <sup>-1</sup> ]	4,04 ± 3,30	0,82 ± 0,49	5,69 <sup>A</sup> ± 4,48	0,90 <sup>B</sup> ± 0,59	4,85 <sup>a</sup> ± 2,46	1,22 <sup>b</sup> ± 0,53

#### 4.2.3. Porovnání výsledků hematologických vyšetření mezi lokalitami v jednotlivých obdobích

Ve vzájemném porovnání všech lokalit z jarních odlovů lze pozorovat, že v některých parametrech se lokalita 11 statisticky významně liší od zbývajících dvou. U ryb odlovených z této lokality došlo k výraznému snížení hodnot RBC, PCV a koncentrace hemoglobinu v porovnání s lokalitami 7 a 8. Naopak u těchto ryb vzrostlo celkové množství bílých krvinek o 35,50 G·l<sup>-1</sup>, respektive 32,54 G·l<sup>-1</sup>. V diferenciálním počtu bílých krvinek byl u ryb z této lokality zaznamenán významně vyšší absolutní počet i procentuální podíl lymfocytů.

U ryb z podzimního vzorkování byly statisticky významné rozdíly zaznamenány u stejných hematologických ukazatelů, jako na jaře, ale tentokrát byly lokality v jiném pořadí - viz Tab. č. 7. Nižší hodnoty celkového množství červených krvinek byly prokázány u ryb z lokality 8. Při porovnání lokalit 7 a 8 bylo zjištěno, že v lokalitě 8 měly ryby v průměru o 16,55 G·l<sup>-1</sup> bílých krvinek více. Významný rozdíl byl zjištěn i u hematokritové hodnoty a koncentrace hemoglobinu. V obou případech byla vyšší hodnota zaznamenána u ryb z lokality 7. Při porovnání diferenciálního počtu bílých krvinek bylo zjištěno, že jediného statisticky významného rozdílu dosáhly lymfocyty

v lokalitě 8. V porovnání s lokalitou 7 bylo u těchto ryb zjištěno o 15,03  $G \cdot l^{-1}$ , a s lokalitou 11 o 9,64  $G \cdot l^{-1}$  více lymfocytů.

**Tabulka č. 7:** Výsledné hodnoty hematologických parametrů ze všech sledovaných lokalit pro jednotlivá období. Jednotlivé výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Rozdíly mezi skupinami označenými odlišným abecedním znakem jsou statisticky významné na hladině  $P < 0,05$ .

	Jaro			Podzim		
	Lokalita 7, $t=12\text{ }^{\circ}\text{C}$	Lokalita 8, $t=12\text{ }^{\circ}\text{C}$	Lokalita 11, $t=8\text{ }^{\circ}\text{C}$	Lokalita 7, $t=5\text{ }^{\circ}\text{C}$	Lokalita 8, $t=7\text{ }^{\circ}\text{C}$	Lokalita 11, $t=5\text{ }^{\circ}\text{C}$
<b>RBC</b> [ $T \cdot l^{-1}$ ]	2,02 <sup>a</sup> $\pm$ 0,57	1,69 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,45	1,20 <sup>b</sup> $\pm$ 0,21	1,80 <sup>A</sup> $\pm$ 0,30	1,30 <sup>B</sup> $\pm$ 0,11	1,57 <sup>A</sup> $\pm$ 0,22
<b>WBC</b> [ $G \cdot l^{-1}$ ]	22,75 <sup>a</sup> $\pm$ 17,93	25,71 <sup>a</sup> $\pm$ 15,33	58,25 <sup>b</sup> $\pm$ 16,14	10,55 <sup>A</sup> $\pm$ 5,60	27,10 <sup>B</sup> $\pm$ 12,60	17,75 <sup>AB</sup> $\pm$ 5,74
<b>PCV</b> [ $l \cdot l^{-1}$ ]	0,40 <sup>a</sup> $\pm$ 0,12	0,33 <sup>a</sup> $\pm$ 0,06	0,21 <sup>b</sup> $\pm$ 0,04	0,42 <sup>A</sup> $\pm$ 0,08	0,33 <sup>B</sup> $\pm$ 0,02	0,35 <sup>B</sup> $\pm$ 0,04
<b>Hb</b> [ $g \cdot l^{-1}$ ]	86,83 <sup>a</sup> $\pm$ 21,94	91,92 <sup>a</sup> $\pm$ 23,81	59,64 <sup>b</sup> $\pm$ 15,73	111,42 <sup>A</sup> $\pm$ 14,64	83,31 <sup>B</sup> $\pm$ 10,57	93,47 <sup>B</sup> $\pm$ 10,98
<b>MCV</b> [fl]	205,06 $\pm$ 51,65	198,42 $\pm$ 31,77	173,32 $\pm$ 23,47	238,15 $\pm$ 47,45	255,90 $\pm$ 31,69	223,96 $\pm$ 34,31
<b>MCH</b> [pg]	49,51 $\pm$ 13,63	54,87 $\pm$ 7,32	49,00 $\pm$ 6,97	62,99 $\pm$ 9,41	64,46 $\pm$ 8,77	60,61 $\pm$ 10,54
<b>MCHC</b> [ $l \cdot l^{-1}$ ]	0,24 $\pm$ 0,04	0,28 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,02

**Tabulka č. 8:** Výsledné hodnoty leukogramu ze všech sledovaných lokalit pro jednotlivá období. Jednotlivé výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Rozdíly mezi skupinami označenými odlišným abecedním znakem jsou statisticky významné na hladině  $P < 0,05$ .

	Jaro			Podzim		
	Lokalita 7, $t=12\text{ }^{\circ}\text{C}$	Lokalita 8, $t=12\text{ }^{\circ}\text{C}$	Lokalita 11, $t=8\text{ }^{\circ}\text{C}$	Lokalita 7, $t=5\text{ }^{\circ}\text{C}$	Lokalita 8, $t=7\text{ }^{\circ}\text{C}$	Lokalita 11, $t=5\text{ }^{\circ}\text{C}$
<b>Lymfocyty</b> [ $G \cdot l^{-1}$ ]	8,88 <sup>a</sup> $\pm$ 6,48	9,60 <sup>a</sup> $\pm$ 4,28	44,49 <sup>b</sup> $\pm$ 12,37	8,16 <sup>A</sup> $\pm$ 4,35	23,19 <sup>B</sup> $\pm$ 11,89	13,55 <sup>A</sup> $\pm$ 4,14
<b>Monocyty</b> [ $G \cdot l^{-1}$ ]	4,06 $\pm$ 3,18	5,13 $\pm$ 4,23	1,40 $\pm$ 0,90	0,38 $\pm$ 0,29	0,87 $\pm$ 0,63	0,73 $\pm$ 0,50
<b>Segmenty</b> [ $G \cdot l^{-1}$ ]	3,12 $\pm$ 3,05	3,38 $\pm$ 2,43	6,17 $\pm$ 2,78	0,87 $\pm$ 0,65	1,71 $\pm$ 0,90	1,81 $\pm$ 1,25
<b>Tyčinky</b> [ $G \cdot l^{-1}$ ]	2,65 $\pm$ 3,17	1,92 $\pm$ 0,71	1,33 $\pm$ 0,90	0,32 $\pm$ 0,24	0,43 $\pm$ 0,20	0,45 $\pm$ 0,34
<b>Nez. gran.</b> [ $G \cdot l^{-1}$ ]	4,04 $\pm$ 3,30	5,69 $\pm$ 4,48	4,85 $\pm$ 2,46	0,82 $\pm$ 0,49	0,90 $\pm$ 0,59	1,22 $\pm$ 0,53

#### 4.2.4. Porovnání výsledných hodnot s fyziologickými hodnotami

Při porovnávání ryb z jarního vzorkování bylo nejvíce parametrů mimo rozmezí fyziologických hodnot popsáno u lokality 11 - viz Tab. č. 9. V tomto případě došlo ke snížení hodnoty PCV na 0,21 l·l<sup>-1</sup>. Nižší hematokrit mohl být způsoben nízkým počtem červených krvinek, který byl na spodní hranici fyziologické hodnoty, a nižší hodnotou středního objemu erytrocytů. U ryb z téže lokality a období došlo i k nepatrnému snížení celkové koncentrace hemoglobinu a s ním spojeného hemoglobinu erytrocytu (MCH) oproti fyziologickým hodnotám.

U ryb z podzimních odlovů byly průměrné hodnoty všech parametrů v rámci fyziologických rozmezí, kromě mírného zvýšení koncentrace hemoglobinu v krvi u ryb z lokality 7. Toto navýšení zároveň ovlivnilo i výslednou hodnotu MCH, kde byl zjištěn rozdíl od horní hranice udávané fyziologické hodnoty o 2,99 pg. Navýšení hodnoty MCH bylo zjištěno i u ryb ze zbylých lokalit, v těchto případech však nedošlo k nárůstu množství hemoglobinu.

Na základě diferenciálního rozpočtu leukocytů bylo zjištěno, že ryby z jarních odlovů v lokalitách 7 a 8 měly výrazně nižší procentuální zastoupení lymfocytů - viz Tab. č. 10. Naopak, v těchto lokalitách došlo k nárůstu zastoupení monocytů. V lokalitě 7 o 13,45 % a v lokalitě 8 o 11,06 %. Jediné snížení procenta monocytů pod fyziologickou hodnotu bylo popsáno v lokalitě 11, kde však tato hodnota klesla o pouhých 0,7 % oproti spodní hranici fyziologického normálu. U ryb ze všech sledovaných lokalit a období bylo pozorováno navýšení koncentrace neutrofilních granulocytů nad udávanou fyziologickou hodnotu. Nejvíce markantní rozdíl byl popsán u ryb z lokality 7, které byly odebrány v jarním období. V tomto případě se průměrné procentuální zastoupení neutrofilních granulocytů navýšilo o 30,05 %.

U CEV pozitivních ryb došlo k výraznému poklesu procentuálního zastoupení lymfocytů ve všech lokalitách. Největší pokles byl zaznamenán v lokalitě 7, kde došlo ke snížení počtu lymfocytů o 36,2 % pod spodní hranici fyziologické hodnoty. Naopak, u monocytů a neutrofilních granulocytů byl zaznamenán nárůst jejich procentuálního zastoupení nad horní hranici fyziologických hodnot takřka ve všech případech. Jedinou výjimkou jsou monocyty v lokalitě 11, kde jejich zastoupení zůstalo v intervalu fyziologických hodnot. V lokalitách 7 a 8 došlo až k čtyřnásobnému nárůstu monocytů

oproti horní hranici fyziologické hodnoty kapra obecného. Obdobný nárůst byl zaznamenán i u netrofilních granulocytů v totožných lokalitách. V lokalitě 11 došlo také k nárůstu procentuálního zastoupení netrofilních granulocytů, avšak ne v takové míře. V tomto případě hodnota procentuálního zastoupení vzrostla o necelý dvouapůlnásobek horní hranice fyziologické hodnoty - viz Tab. č. 11.

**Tabulka č. 9:** Porovnání hodnot hematologických ukazatelů ryb z jednotlivých lokalit a období s fyziologickými hodnotami. Jako referenční fyziologické hodnoty byly použity hodnoty uváděné Svobodovou a kol. (2012). Jednotlivé výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka.

	Fyziologické hodnoty	Lokalita 7, jaro	Lokalita 8, jaro	Lokalita 11, jaro
RBC [T·l <sup>-1</sup> ]	1,1 – 1,8	2,02 $\pm$ 0,57	1,69 $\pm$ 0,46	1,20 $\pm$ 0,21
WBC [G·l <sup>-1</sup> ]	10 – 80	22,75 $\pm$ 17,93	25,71 $\pm$ 15,33	58,25 $\pm$ 16,14
PCV [l·l <sup>-1</sup> ]	0,28 – 0,40	0,41 $\pm$ 0,12	0,33 $\pm$ 0,06	0,21 $\pm$ 0,05
Hb [g·l <sup>-1</sup> ]	60 – 100	86,83 $\pm$ 21,94	91,92 $\pm$ 23,81	59,64 $\pm$ 15,73
MCV [fl]	200 – 300	205,06 $\pm$ 51,65	198,42 $\pm$ 31,77	173,32 $\pm$ 23,47
MCH [pg]	50 – 60	49,51 $\pm$ 13,63	54,87 $\pm$ 7,31	49,00 $\pm$ 6,97
MCHC [l·l <sup>-1</sup> ]	0,20 – 0,26	0,24 $\pm$ 0,04	0,28 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,05
	Fyziologické hodnoty	Lokalita 7, podzim	Lokalita 8, podzim	Lokalita 11, podzim
RBC [T·l <sup>-1</sup> ]	1,1 – 1,8	1,80 $\pm$ 0,30	1,30 $\pm$ 0,11	1,57 $\pm$ 0,22
WBC [G·l <sup>-1</sup> ]	10 – 80	10,55 $\pm$ 5,60	27,10 $\pm$ 12,60	17,75 $\pm$ 5,74
PCV [l·l <sup>-1</sup> ]	0,28 – 0,40	0,42 $\pm$ 0,08	0,33 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,04
Hb [g·l <sup>-1</sup> ]	60 – 100	111,42 $\pm$ 14,64	83,31 $\pm$ 10,58	93,47 $\pm$ 10,98
MCV [fl]	200 – 300	238,15 $\pm$ 47,45	255,90 $\pm$ 31,69	223,96 $\pm$ 34,31
MCH [pg]	50 – 60	62,99 $\pm$ 9,41	64,46 $\pm$ 8,77	60,61 $\pm$ 10,54
MCHC [l·l <sup>-1</sup> ]	0,20 – 0,26	0,27 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,02

Poznámka: ■ výsledná hodnota < fyziologická hodnota, ■ výsledná hodnota je v rozmezí fyziologické hodnoty, ■ výsledná hodnota > fyziologická hodnota

**Tabulka č. 10:** Porovnání hodnot leukogramu ryb z jednotlivých lokalit a období s fyziologickými hodnotami. Jako referenční fyziologické hodnoty byly použity hodnoty uváděné Svobodovou a kol. (2012). Jednotlivé výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka.

	Fyziologické hodnoty	Lokalita 7, jaro	Lokalita 8, jaro	Lokalita 11, jaro
Lymfocyty [%]	76 – 97,5	41,50 ± 10,08	44,06 ± 15,08	76,85 ± 7,11
Monocyty [%]	3 – 5	18,45 ± 5,21	16,06 ± 8,28	2,30 ± 1,27
Neutrofilní granulocyty [%]	2 – 10	40,05 ± 6,44	39,88 ± 8,51	20,85 ± 6,62
	Fyziologické hodnoty	Lokalita 7, podzim	Lokalita 8, podzim	Lokalita 11, podzim
Lymfocyty [%]	76 – 97,5	77,20 ± 8,34	84,35 ± 5,70	76,65 ± 5,74
Monocyty [%]	3 – 5	3,55 ± 1,85	3,75 ± 2,72	3,85 ± 1,53
Neutrofilní granulocyty [%]	2 – 10	19,25 ± 6,65	11,90 ± 3,21	19,50 ± 5,33

Poznámka: ■ výsledná hodnota < fyziologická hodnota, ■ výsledná hodnota je v rozmezí fyziologické hodnoty, ■ výsledná hodnota > fyziologická hodnota

**Tabulka č. 11:** Porovnání hodnot leukogramu CEV pozitivních ryb s fyziologickými hodnotami. Jako referenční fyziologické hodnoty byly použity hodnoty uváděné Svobodovou a kol. (2012). Jednotlivé výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka.

	Fyziologické hodnoty	Lokalita 7, CEV+	Lokalita 8, CEV+	Lokalita 11, CEV+
Lymfocyty [G·l <sup>-1</sup> ]	76 – 97,5	41,50 ± 10,69	39,80 ± 6,29	72,80 ± 7,69
Monocyty [G·l <sup>-1</sup> ]	3 – 5	18,33 ± 5,52	19,00 ± 4,74	3,20 ± 0,91
Neutrofilní granulocyty [%]	2 – 10	40,17 ± 6,82	41,20 ± 5,18	24,00 ± 7,99

Poznámka: ■ výsledná hodnota < fyziologická hodnota, ■ výsledná hodnota je v rozmezí fyziologické hodnoty, ■ výsledná hodnota > fyziologická hodnota

## 5. Diskuze

K účelům této práce bylo využito celkem padesát osm jedinců kapra obecného ze tří různých lokalit. V jarním a podzimním období bylo odloveno dvacet osm, respektive třicet jedinců kapra obecného. V jarním období byly odlovovány vzorky ryb z důvodu zvýšeného úhynu kaprů v daných lokalitách a na podzim byly tyto lokality vzorkovány znovu pro ověření možné perzistence CEV ve tkáních ryb. V průběhu odlovování ryb, manipulace s rybami a odběru krevních vzorků bylo důležité zacházet s rybami tak, aby nedocházelo k jejich nadměrnému stresování. Šetrné zacházení bylo důležité, jelikož působením stresových situací může dle Andersona a kol. (1985), Svobodové a kol. (1991) a Fazia a kol. (2013) docházet k ovlivnění některých sledovaných hematologických ukazatelů.

Při vnějším ohledání jedinců kapra obecného při jarních odlovech byly nejčastěji pozorovanými patologickými změnami žaberní tkáň edém (otok tkáň), zvýšené zahlenění, krváceniny a v neposlední řadě i nekrózy v různých fázích závažnosti. Tyto změny byly očekávány, neboť jsou mnohými autory uváděny jako hlavní patologické změny nacházené u ryb infikovaných kapřím edema virem. Totožné patologické změny u kaprů nakažených CEV ve svých studiích popisují Oymatsu a kol. (1997), Haenen a kol. (2014), Jung-Schroers a kol. (2015) a Lewisch a kol. (2015). Nejčastějšími změnami jiných tkání bylo zarudnutí břicha, mléčně zakalený hlen a zvětšení sleziny. Obdobné patologické změny popisují ve své studii Oymatsu a kol. (1997), Miyazaki a kol. (2005) a Lewisch a kol. (2015). Je však velmi důležité brát v potaz skutečnost, že tyto patologické změny nejsou pro CEVD patognomické. Podobné změny jsou způsobovány kupříkladu koi herpesvirózou. Tudíž nelze diagnózu CEVD stanovit pouze na základě patologicko-anatomického vyšetření, lze pouze vyslovit podezření na základě nízké teploty vody v době úhynu ryb (Piačková a kol., 2019a).

Statistickým porovnáním výsledků ryb CEV pozitivních a CEV negativních bylo zjištěno, že došlo ke statisticky významnému rozdílu u celkového množství erytrocytů a s ním souvisejících hodnot hematokritu a množství hemoglobinu. Ve všech případech byla stanovena vyšší hodnota u CEV pozitivních ryb. Obdobnou studii provedli Lewisch a kol. (2015), ti však uvádějí, že u CEV pozitivních ryb došlo k poklesu hodnoty RBC. Vyjma této změny tito autoři popisují, že u infikovaných kaprů došlo



k lymfocytopenii (snížení zastoupení lymfocytů) až na pouhých 35 % a k neutrofilii (zvýšení zastoupení neutrofilních granulocytů), a to až na 64 %. V rámci této bakalářské práce došlo ke statisticky významnému rozdílu pouze u procentuálního zastoupení neutrofilních tyčků. Ryby pozitivní na CEV vykazovaly zastoupení tyčků 7,7 %, kdežto ryby negativní pouze 3,4 %. Ovšem u porovnání procentuálního zastoupení jednotlivých typů leukocytů s fyziologickými hodnotami kapra obecného, udávaných Svobodovou a kol. (2012), lze pozorovat, že u CEV pozitivních ryb ze všech lokalit došlo k výraznému poklesu zastoupení lymfocytů a nárůstu celkového množství neutrofilních granulocytů. Tato skutečnost plně odpovídá výsledkům uváděným Lewisch a kol. (2015) v jejich studii zaměřené na CEVD.

Ve statistickém porovnání výsledků hematologických ukazatelů pro rozdílná roční období bylo zjištěno čtrnáct statisticky významných rozdílů z celkových jednadvaceti porovnání na hranici významnosti  $P < 0,05$ . U celkového počtu erytrocytů došlo k rozdílným hodnotám ve všech sledovaných lokalitách. U ryb z lokalit 7 a 8 bylo zjištěno, že v průběhu podzimního období je jejich hodnota RBC nižší, nežli tomu bylo na jaře. Naopak, ryby z lokality 11 vykazovaly na podzim vyšší hodnotu RBC. Obdobnou neshodu mezi lokalitami v témže ročním období popisují ve své studii, o působení vlivů jednotlivých ročních období na kapra obecného, Vuren a Hattingh (1978). Nutno však dodat, že v jejich studii byly zahrnuty pouze zdravé ryby. K těmto rozdílným výsledkům mohlo dopomoci, vyjma nákazy CEVD, působení jiných faktorů v každé z lokalit, ovlivňujících hodnotu RBC (Anderson a kol., 1985). Vyšší hodnoty PCV byly popsány ve všech lokalitách vždy u ryb z podzimního vzorkování. V případě lokality 8 se však nejednalo o rozdíl statisticky významný. Vyšší hodnoty v podzimním období byly též popsány u MCV. Zde však hranici statistické významnosti překlenuly pouze rozdíly v lokalitách 8 a 11. Srovnatelné rozdíly popisují ve své práci Le a kol. (1976). V jejich publikaci uvádějí, že v měsíci listopadu byla zjištěná hodnota MCV vyšší o 70,85 fl oproti hodnotě dubnové. Statisticky významné rozdíly byly určeny i u hodnot hemoglobinu a MCH. V sedmé a jedenácté lokalitě byla zjištěna vyšší koncentrace hemoglobinu v podzimním období. Tato skutečnost vedla i ke zvýšení hodnoty hemoglobinu erytrocytu (MCH) u ryb z lokality 11. Naprosto odlišné výsledky popisují Le a kol. (1976). Ti uvádí, že v listopadu došlo, oproti dubnu, ke snížení

množství hemoglobinu i hodnoty MCH. U MCHC byla významný rozdíl zaznamenán pouze u ryb z lokality 7. V tomto případě došlo ke zjištění mírně vyšší hodnoty v podzimním období. Ve zbylých lokalitách však došlo k přesnému opaku. Nesourodých výsledků hodnot MCHC u kapra obecného dosáhli ve své práci i Vuren a Hattingh (1978). Z jejich studie je patrné, že působení stejných sezónních podmínek v různých lokalitách, nevede k obdobným výsledkům hematologických ukazatelů a proto je zapotřebí brát toto porovnání spíše jako doplňkové a kontrolní. Důležité je brát u tohoto stanovení v potaz i to, že nadpoloviční většina ryb odlovených v jarním období byla CEV pozitivní, kdežto ryby z podzimních odlovů byly ze sta procent CEV negativní. Pokud bychom chtěli znát přímý vliv sezónních podmínek na hematologické parametry ryb, je nutné zabránit při studii vlivu jakýkoliv jiných faktorů.

Při vyhodnocování rozdílů diferenciálního počtu leukocytů mezi ročními obdobími byly statisticky významné rozdíly stanoveny u všech sledovaných typů bílých krvinek. K výraznému navýšení počtů lymfocytů v podzimním období došlo u ryb z lokality 8. Naopak markantně nižší podzimní hodnoty byly zaznamenány u ryb odebraných z lokality 11. Nezanedbatelný rozdíl monocytů byl objeven u jedinců kapra obecného z lokality 8. V tomto případě došlo ke snížení celkového počtu monocytů u ryb odebraných na podzim o  $4,26 \text{ G} \cdot \text{l}^{-1}$ . U kaprů odlovených na podzim bylo v krvi, oproti rybám z jarních odběrů, stanoveno menší množství všech sledovaných typů granulocytů. Vyšší hodnoty u ryb odlovených v jarním období lze dle Vurena a Hattingha (1978) a Luskové (1997) vysvětlit vyšší teplotou vody při odlovu ryb. Neboť, jak autoři uvádějí, díky vyšším teplotám dochází k nárůstu celkového počtu leukocytů. Své při porovnávání jarního a podzimního období sehrál i fakt, že mezi jedinci z podzimních odlovů nebyla žádná ryba CEV pozitivní. Významnost vlivu patogenních činitelů na diferenciální počet bílých krvinek potvrzují Steinhagen a kol. (1997), Pravda a Svobodová (2003), Lutnicka a kol. (2018) a Vali a kol. (2020).

Při vzájemném porovnání ryb odebraných na jaře z jednotlivých lokalit byly zjištěny signifikantní rozdíly u hodnot RBC, WBC, PCV, Hb a množství lymfocytů. Všechny tyto rozdíly byly popsány u ryb z lokality 11. V jejich krvi byla stanovena nižší hodnota PCV a Hb oproti rybám ze zbývajících lokalit, nižší celkové množství červených krvinek oproti rybám z lokality 7 a markantní nárůst celkového množství

bílých krvinek a lymfocytů. Svou roli v odlišnosti pouze jedné lokality by mohl sehrát faktor teploty a nákazy CEVD. Neboť teplota, při které byly ryby z lokality 11 odebírány, byla o 4 °C nižší než ve zbylých dvou místech. Zjištěné hodnoty neodpovídaly tvrzení Luskové (1997) o navyšování celkového počtu bílých krvinek s rostoucí teplotou, neboť právě hodnota WBC byla nejvyšší u ryb, které byly odebrány z chladnější vody. Lze usuzovat, že odlišnost v lokalitě 11 mohla způsobit i skutečnost nejmenšího procentuálního zastoupení CEV pozitivních ryb ze všech lokalit. Právě menší zastoupení CEV pozitivních ryb mohlo způsobit zjištěný statisticky významný rozdíl počtu lymfocytů. Ty totiž byly v krvi ryb z lokality 11 zastoupeny v násobně větší míře, než tomu bylo u ryb z lokality 7 a 8. Toto konstatování lze podložit tvrzením Drastichové a kol. (2004). Tito autoři tvrdí, že k poklesu množství lymfocytů dochází působením infekčních vlivů. Pokud tedy nedošlo ke snížení počtů lymfocytů vlivem nákazy CEVD u stejného procenta ryb jako ve zbylých lokalitách, může být vyšší průměrná hodnota lymfocytů u ryb z lokality 11 způsobena právě takto.

Vzájemné porovnání lokalit z podzimního období odhalilo statisticky významné rozdíly u stejných hematologických ukazatelů. V tomto případě však nemohla výsledky ovlivnit nákaza CEVD, neboť všechny ryby odlovené na podzim byly CEV negativní. Zjištěnou vyšší hodnotu WBC u ryb z lokality 8 oproti lokalitě 7 mohla ovlivnit vyšší teplota v lokalitě 8. Zjištěné zvýšené množství lymfocytů v lokalitě 8 lze vysvětlit právě větším celkovým počtem bílých krvinek, než ve zbylých dvou lokalitách, neboť ani procentuální zastoupení lymfocytů mezi lokalitami nedoznalo výrazných rozdílů. Avšak je důležité brát v potaz fakt, že v každé z lokalit na ryby mohlo působit široké spektrum rozdílných faktorů, které následně mohly ovlivnit zjištěné hodnoty. Proto nelze teplotu a nákazu CEVD jednoznačně označit za faktory způsobující tyto rozdíly.

Výsledky této bakalářské práce shrnují a popisují některé změny v krevním obrazu ryb, které mohou být způsobené nákazou CEVD. Avšak dle mého názoru, je velmi důležité pro komplexnější pochopení a popsání změn způsobovaných CEVD provést studii, ve které bude předcházeno působení rozdílných vlivů, či bude provedeno porovnání s kontrolní skupinou zdravých ryb ve srovnatelných podmínkách. Pouze v tomto případě by bylo možno označit případné změny za změny způsobené výlučně infekcí kapřího edema viru a nemocí s ní spojenou.

## 6. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo posoudit případné změny hematologických ukazatelů, způsobené edémovou nemocí kaprů (CEVD), u nejvýznamnějšího rybního druhu pro českou akvakulturu - kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Mezi zdravými a nakaženými rybami byly porovnávány základní hematologické ukazatele: počet erytrocytů, počet leukocytů, hematokritová hodnota, množství hemoglobinu, střední objem erytrocytu, hemoglobin erytrocytu, střední barevná koncentrace a diferenciální rozpočet leukocytů.

Po stanovení jednotlivých hematologických ukazatelů a porovnání hodnot infikovaných ryb oproti rybám neinfikovaným kapřím edema virem byl prokázán statisticky významný rozdíl v celkovém počtu erytrocytů (RBC), hematokritové hodnotě (PCV) a množství hemoglobinu (Hb). U těchto parametrů došlo k nárůstu hodnoty oproti rybám CEV negativním. V rámci diferenciálního počtu leukocytů byl jediným signifikantním rozdílem nárůst procentuálního zastoupení tyčků v krvi CEV pozitivních ryb.

Výsledky bakalářské práce shrnují některé patologické i hematologické rozdíly, způsobené touto relativně novou nákazou virového původu. I přestože mohou výsledky dopomoci k lepšímu poznání choroby, je důležité brát v potaz možnost ovlivnění výsledků hematologických parametrů i jinými vlivy než samotnou nákazou CEVD. Do budoucna bude velmi důležité podrobovat nákazu CEVD dalším studiím, neboť se může stát jedním z hlavních činitelů ohrožujících rybníční akvakulturu kapra obecného v České republice i v Evropě.

## 7. Přehled použité literatury

- Abedi, Z., Khalesi, M.K., Kohestan Eskandari, S., 2012. Biochemical and Hematological Profiles of Common Carp (*Cyprinus carpio*) under Sublethal Effects of Trivalent Chromium. *Iranian Journal of Toxicology*: 7 (20), 282-292.
- Adamek, M., Matras, M., Jung-Schroers, V., Teitge, F., Heling, M., Bergmann, S.M., Reichert, M., Way, K., Stone, D.M., Steinhagen, D., 2017a. Comparison of PCR methods for the detection of genetic variants of carp edema virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 126, 75-81. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3354/dao03152>
- Adamek, M., Oschilewski, A., Wohlsein, P., Jung-Schroers, V., Teitge, F., Dawson, A., Gela, D., Piačková, V., Kocour, M., Adamek, J., Bergmann, S. M., Steinhagen, D., 2017b. Experimental infections of different carp strains with the carp edema virus (CEV) give insights into the infection biology of the virus and indicate possible solutions to problems caused by koi sleepy disease (KSD) in carp aquaculture. *Veterinary Research* 48, 12. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0416-7>
- Adámek, Z., Dubský, K., Jarolímková, B., Just, T., Kolářová, J., Lusk, S., Navrátil, S., Nusl, P., Svobodová, Z., Šíma, A., Štípek, J., Vančura, Z., Vrána, K., 2013. Příručka pro rybářské hospodáře. Praha: Český rybářský svaz, 512 s. ISBN 978-80-905280-2-4.
- Ainsworth, A.J., 1992. Fish granulocytes: Morphology, distribution and function. *Annual Review of Fish Diseases* 2, 123-148. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(92\)90060-B](https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90060-B)
- Anderson, N.A., Laursen, J.S., Lykkeboe, G., 1985. Seasonal variations in hematocrit, red cell hemoglobin and nucleoside triphosphate concentrations in the European eel *Anguilla anguilla*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 81A, 87-92. Dostupné z: doi: 10.1016/0300-9629(85)90271-3
- Balon, E.K., 1995. Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: from Roman gourmets to the swimming flowers. In: Billard, R., Gall, G.A.E. (Eds), *The Carp*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, 3-12. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00227-F](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00227-F)
- Bulíková, A., Kissová, J., 2011. Anemie v praxi. *Interní medicína pro praxi* [online]. 13 (1), 31-34 [cit. 2021-03-24]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2011/01/08.pdf>
- Campbell, T.W., 2004. Hematology of lower vertebrates. In: 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) and 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP), 2004-Orlando, FL, USA, ACVP and ASVCP (Eds.). Publisher: American College of Veterinary Pathologists & American Society for Veterinary Clinical Pathology, Middleton WI, USA.
- Dabrowska, H., Własow, T., 1986. Sublethal effect of ammonia on certain biochemical and haematological indicators in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 83 (1), 179-184. Dostupné z: doi: 10.1016/0742-8413(86)90033-2
- Donner, L., 1985. *Klinická hematologie*. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n.p., 448 s.
- Doubek, J., Bouda, J., Doubek, M., Füll, M., Knotková, Z., Pejřilová, S., Pravda, D., Scheer, P., Svobodová, Z., Vodička, R., 2003a. *Veterinární hematologie*. Brno: Noviko, 464 s. ISBN 80-86542-02-5.

- Doubek, J., Bouda, J., Scheer, P., 2003b. Fyziologie krve a krvetvorných tkání savců. In: Doubek, J., Bouda, J., Doubek, M., Füll, M., Knotková, Z., Pejšilová, S., Pravda, D., Scheer, P., Svobodová, Z., Vodička, R., 2003. Veterinární hematologie. Brno: Noviko, 27-89 s. ISBN 80-86542-02-5.
- Drastichová, J., Svobodová, Z., Lusková, V., Máchová, J., 2004. Effect of Cadmium on hematological Indices of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 72, 725-732. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00128-004-0305-4>
- Dubanský, V., Svobodová, Z., 1995. Krev ryb. Veterinářství. Praha: Strategie Praha s.r.o., 1995, roč. 95, č. 2, 52; 54; 69-75 s. ISSN 0506 8231.
- Dubský, K., 2015. Chov ryb v rybnících: pro stavební zaměření. Vydání 2. Vodňany: Střední rybářská škola a Vyšší odborná škola vodního hospodářství a ekologie, 194 s. ISBN 978-80-87096-20-8.
- Dubský, K., Šrámek, V., Kouřil, J., 2003. Obecné rybářství. Praha: Informatorium, 308 s. ISBN 80-7333-019-9.
- Dvořák, P., Pyszko, M., Velíšek, J., Dvořáková Lišková, Z., Andreji, J., 2014. Anatomie a fyziologie ryb. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 189 s. ISBN 978-80-87437-80-3.
- Edsall, C.C., 1999. A blood chemistry profile for lake trout. Journal of Aquatic Animal Health 11, 81-86. Dostupné z: [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1999\)011<0081:ABCPFL>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1999)011<0081:ABCPFL>2.0.CO;2)
- European Commission, 2007. Carp Fisheries. [online]. Copyright © ScandFish [cit. 08.03.2021]. Dostupné z: [https://ec.europa.eu/fisheries/marine\\_species/farmed\\_fish\\_and\\_shellfish/carp\\_en](https://ec.europa.eu/fisheries/marine_species/farmed_fish_and_shellfish/carp_en)
- European Commission, 2021. Directorate General for Maritime Affairs and Fisheries. & EUMOFA. Price structure in the supply chain for fresh carp in Central Europe: case study. Publications Office. Dostupné z: <https://doi.org/10.2771/865750>
- FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action [online]. Rome. Copyright © [cit. 06.03.2021]. Dostupné z: <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Fazio, F., 2018. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: A review. Aquaculture 500. Italy, Messina, 2019 (500), 237-242. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.030>
- Fazio, F., Marafioti, S., Torre, A., Sanfilippo, M., Panzera, M., Faggio, C., 2013. Haematological and serum protein profiles of Mugil cephalus: effect of two different habitat. Ichthyol. Res. 60, 36-42. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10228-012-0303-1>
- Fey, F., 1966. Vergleichende Hämazytologie niederer Vertebraten III. Granulozyten. Leipzig: Folia Haematologica 86, 1-20.
- Folmar, L.C., 1993. Effects of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish: A bibliography and synopsis of selected effects. Environmental Toxicology and Chemistry 12, 337-375. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/etc.5620120216>

- Gela, D., Kocour, M., Rodina, M., Flajšhans, M., Beránková, P., Linhart, O., 2009. Technologie řízené reprodukce kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.). Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 43 s. ISBN 978-80-85887-99-0.
- Genten, F., Terwinghe, E., Danguy, A., 2009. Atlas of Fish Histology. Enfield, NH, USA: Science Publishers, pp. 215. ISBN 978-1-57808-544-6.
- Gjessing, M.C., Thoen, E., Tengs, T., Skotheim, S.A., Dale, O.B., 2017. Salmon gill poxvirus, a recently characterized infectious agent of multifactorial gill disease in freshwater and seawater reared Atlantic salmon. *Journal of Fish Diseases* 40, 1253-1265. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jfd.12608>
- Haenen, O., Way, K., Stone, D., & Engelsma, M., 2014. 'Koi Sleepy Disease' found for the first time in Koi Carps in the Netherlands. *Tijdschrift voor diergeneeskunde*, 139 (4) 26-29.
- Haenen, O. L. M., Way, K., Gorgoglione, B., Ito, T., Paley, R., Bigarré, L., & Waltzek, T., 2016. Novel viral infections threatening Cyprinid fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 36 (1), 11-23.
- Hanel, L., Lusk, S., 2005. Ryby a mihule České republiky: rošíření a ochrana = Fishes and lampreys of the Czech Republic: distribution and conservation. Vlašim: Český svaz ochránců přírody Vlašim, 447 s. ISBN 80-86327-49-3.
- Hartman, P., Regenda, J., 2016. Praktika v rybníkářství. 2. vydání. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 375 s. ISBN 978-80-7514-042-5.
- Hawkins, R.I., Mawdesley-Thomas, L., 2006. Fish haematology-A bibliography. *Journal of Fish Biology* 4, 193-232 s. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1972.tb05668.x>
- Hedayati, A., Niazie, E.H.N., 2015. Hematological changes of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) in response to Diazinon pesticide. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 2015, 13 (1), 1-5. Dostupné z: doi: 10.1186/s40201-015-0208-9
- Hedrick, R. P., Antonio, D. B., Munn, R. J., 1997. Poxvirus like agent associated with epizootic mortality in juvenile koi (*Cyprinus carpio*). *FHS Newsletter*, 25, 1-2.
- Hesami, S., Viadanna, P., Steckler, N., Spears, S., Thompson, P., Kelley, K., Yanong, R., Francis-Floyd, R., Shelley, J., Groff, J., Goodwin, A., Haenen, O., Waltzek, T. B., 2015. Carp edema virus disease (CEVD)/koi sleepy disease (KSD). [online]. In: . 2015, s. 1-6 [cit. 2021-03-30]. Dostupné z: [https://drjohnson.com/wp-content/uploads/2019/09/Carp-Edema-Virus-Disease-CEVD\\_Koi-Sleepy-Disease.pdf](https://drjohnson.com/wp-content/uploads/2019/09/Carp-Edema-Virus-Disease-CEVD_Koi-Sleepy-Disease.pdf)
- Hesser, E. F., 1960. Methods for routine fish hematology. *The Progressive Fish- Culturist*, 22 (4), 164-171.
- Hrubec, T.C., Smith, S.A., 2006. Hematology of Fish. In: Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C. (Eds), *Shalm's Veterinary hematology*. Blackwell Publishing Professional, Iowa, USA, 1120-1125.
- Imagawa, T., Hashimoto, Y., Kitagawa, H., Kon, Y., Kudo, N., Sugimura, M., 1989. Morphology of Blood Cells in Carp (*Cyprinus carpio* L.). Japan, Hokkaido: Department of Veterinary Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, 1163-1172. Dostupné z: <https://doi.org/10.1292/jvms1939.51.1163>

- Jahanbakhshi, A., Hedayati, A., Harsij, M., Barkhodar, M., 2013. Hematological and biochemical responses of common carp *Cyprinus carpio* to direct infusion of crude oil. *Comparative Clinical Pathology*, 23 (3), 799-803. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00580-013-1691-y>
- Jung-Schroers, V., Adamek, M., Teitge, F., Hellmann, J., Bergmann, S. M., Schütze, H., Kleingeld, D.W., Way, K., Stone, D., Runge, M., Keller, B., Hesami, S., Waltzek, T., Steinhagen, D., 2015. Another potential carp killer?: Carp Edema Virus disease in Germany. *BMC veterinary research*, 11 (1), 1-4. Dostupné z: doi: 10.1186/s12917-015-0424-7
- Karimi, S. H., Kochinian, P., Salati, A. P., 2013. The effect of sexuality on some haematological parameters of the yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus* in Persian Gulf. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 2013, 14 (1), 65-68. Dostupné z: doi: 10.22099/IJVR.2013.1392
- Kesbiç, O. S., 2019. Effects of juniper berry oil on growth performance and blood parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Research*, 50 (1), 342-349. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/are.13908>
- Kolářová, J., Svobodová, Z., 2009. Léčebné a preventivní postupy v chovech ryb. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, 30 s. ISBN 978-80-85887-88-4.
- Kolářová, J., Velišek, J., 2012. Stanovení a vyhodnocení biochemického profilu krve ryb. V Českých Budějovicích: Jihočeská univerzita, Fakulta rybářství a ochrany vod, 54 s. ISBN 978-80-87437-58-2.
- Larsen, H.N., Snieszko, S.F., 1961. Comparison of Various Methods of Determination of Hemoglobin in Trout Blood. *The Progressive Fish-Culturist* [online]. 23(1), 8-17 [cit. 2021-03-24]. ISSN 0033-0779. Dostupné z: doi: 10.1577/1548-8659(1961)23[8:COVMOD]2.0.CO;2.
- Lavers, Ch., 2004. Proč mají sloni velké uši. Praha: Dokořán. Aliter (Argo: Dokořán): Dokořán), 264 s. ISBN 80-7203-544-4.
- Le, F., Fourie, R., & Hattingh, J., 1976. A seasonal study of the haematology of carp (*Cyprinus carpio*) from a locality in the Transvaal, South Africa. *African Zoology*, 11(1), 75-80. eISSN: 2224-073X
- 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 (1), 6-12. Dostupné z: doi: 10.1111/tbed.12293
- Linhart, O., Kudo, S., Billard, R., Slechta, V., Mikodina, E.V., 1995. Morphology, composition and fertilization of carp eggs: a review. In: Billard, R., Gall, G.A.E. (Eds), *The Carp*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 75-93. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00230-L](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00230-L)
- Linhartová, Z., 2020. Základní živinové složení [přednáška]. České Budějovice, Fakulta rybářství a ochrany vod.
- Lucky, Z., 1962. Návod k diagnostice nemocí ryb. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, n.p., 72 s.



- Lusková, V., 1997. Annual cycles and normal values of hematological parameters in fishes. Brno: Institute of Landscape Ecology, Academy of Sciences of the Czech Republic. Acta Sc. Nat. Brno, 31 (5), pp. 70. ISBN 80-238-2664-6.
- Lutnicka, H., Bojarski, B., Witeska, M., Chmurska-Gasowska, M., Trybus, W., Trybus, E., Kopacz-Bednarska, A., Lis, M., 2018. Effects of MCPA herbicide on hematological parameters and ultrastructure of hematopoietic tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Poland, Kraków: Folia Biologica, 2018, 66 (1), 1-11. ISSN 1734-9168.
- Mahoney, J.B., McNulty, J.K., 1992. Disease-associated blood changes and normal seasonal hematological variation in winter flounder in the Hudson-Raritan Estuary. Transactions of the American Fisheries Society 12, 261-268. Dostupné z: doi: 10.1577/1548-8659(1992)121<0261:NDBCAN>2.3.CO;2
- Masopust, J., 1998. Klinická biochemie: požadování a hodnocení biochemických vyšetření, 1. část. Praha: Karolinum, 429 s. ISBN 80-7184-648-1.
- Matras, M., Borzym, E., Stone, D., Way, K., Stachnik, M., Maj-Paluch, J., Palusinska, 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 (3), 319-325. Dostupné z: doi:10.1111/jfd.12518
- Máchová, J., Svobodová, Z., Valentová, O., Kocour Kroupová, H., Zusková, E., Modrá, H., Velíšek, J., Stará, A., Bláhová, J., Dobšíková, R., 2014. Faktory a látky způsobující akutní otravy vodních organismů. In: Velíšek, J., Svobodová, Z., Bláhová, J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šírká, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Maršálek, P., Kocour Kroupová, H., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2014. Vodní toxikologie pro rybáře. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 149-356 s. ISBN 978-80-87437-89-6.
- McDonald, D.G., Milligan, C.L., 1992. Chemical properties of the blood. In: Hoar, W.S., Randall, D.H., Farrell, A.P. (Eds), Fish Physiology. Academic Press, New York, USA, pp 56-135. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60009-6](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60009-6)
- Mehrabi, F., Khalesi, M.K., Hazaie, K., 2018. Effects of Pre- and Probiotics on Growth, Survival, Body Composition, and Hematology of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Fry from the Caspian Sea. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 18, 597-602. [http://doi.org/10.4194/1303-2712-v18\\_4\\_11](http://doi.org/10.4194/1303-2712-v18_4_11)
- Miyazaki, T., Isshiki, T., & Katsuyuki, H., 2005. Histopathological and electron microscopy studies on sleepy disease of koi *Cyprinus carpio* koi in Japan. Diseases of aquatic organisms, 65 (3), 197-207. Dostupné z: doi: 10.3354/dao065197
- Modrá, H., 1999. Hodnocení vlivu různých neinfekčních faktorů na bílý krevní obraz ryb. Disertační práce, VFU Brno, 57 s.
- Modrá, H., Svobodová, Z., Kolářová, J., 1998. Comparison of differential leukocyte counts in fish of economic and indicator importance. Acta Veterinaria Brno 67, 215-226 s.
- Moss, B., 2007. Poxviridae: the Viruses and their Replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds). Fields Virology, fifth edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 2905-2947.
- Murakami, Y., Shitanaka, M., Toshida, S., Matsuzato, T., 1976. Studies on mass mortality of juvenile carp: about mass mortality showing edema. Bulletin of Hiroshima Fresh Water Fish Experimental Station, 19-33.

- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A., 2021. Medical Microbiology, ninth edition. 9. USA: Elsevier, 856 s. ISBN 978-0-323-67322-8.
- Nakajima, T., Hudson, M.J., Uchiyama, J., Makibayashi, K., Zhang, J., 2019. Common carp aquaculture in Neolithic China dates back 8,000 years. *Nat Ecol Evol* 3, 1415-1418. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0974-3>
- Noga, E. J., 2010. Fish disease: Diagnosis and Treatment. 2. edition. USA, Iowa: A John Wiley & Sons, Inc., Publication, pp. 519. ISBN 978-0-8138-0697-6.
- Novotný, E., Böhm, R., Geissel, V., Holman, J., 1966. Veterinární histologie. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 637 s.
- Ono, S., Nagai, A., Sugai, N., 1986. A histopathological study on juvenile colorcarp, *Cyprinus carpio*, showing edema. *Fish Pathology* 21 (3), 167-175. Dostupné z: <https://doi.org/10.3147/jsfp.21.167>
- Oyamatsu, T., Hata, N., Yamada, K., Sano, T., Fukuda, H., 1997. An etiological study on mass mortality of cultured colorcarp juveniles showing edema. *Fish pathology*, 32 (2), 81-88. Dostupné z: <https://doi.org/10.3147/jsfp.32.81>
- Palíková, M., Mareš, J., Jirásek, J., 1999. Characteristics of leucocytes and thrombocytes of selected sturgeon species from intensive breeding. *Acta Veterinaria Brno* 68, 259-264.
- Pečená, M., Svobodová, Z., 1989. Změny v diferenciálním rozpočtu leukocytů u kapra po akutní intoxikaci pesticidy na bázi triazinů a diazinů. Odd. 46. In: Pravda, D. (ed.), 1989. Druhá celostátní ichtyohematologická konference ČSVTS se zahraniční účastí, sborník přednášek a dokladů s anglicko-českými souhrny: Litomyšl, 28. - 29. 11. 1989. Praha: ČSVTS. 350 s.
- Piačková, V., Čížek, A., Veselý, T., Pokorová, D., 2014a. Odběr vzorků pro bakteriologické a virologické vyšetření ryb. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 26 s. ISBN 978-80-87437-82-7.
- Piačková, V., Palíková, M., Zusková, E., Flajšhans, M., 2014b. Stanovení diferenciálního počtu leukocytů ryb. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, (160), 65 s. ISBN 978-80-7514-024-1.
- Piačková, V., Pojezdal, L., Veselý, T., 2019a. Virová onemocnění. In: Palíková, M.(ed), 2019. Nemoci a chorobné stavy ryb. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 21-76 s. ISBN 978-80-7514-085-2.
- Piačková, V., Zusková, E., Kocour Kroupová, H., Máchová, J., Veselý, T., Matějčíková, K., Pojezdal, L., Papežíková, I., Syrová, E., Palíková, M. 2019b. Diagnostika jarních úhynů kaprů. *Edice Metodik, FROV JU*, č. 181, 49 s.
- Pokorný, J., Adámek, Z., Dvořák, J., Šrámek, V., 1998. Pstruhařství. 2., přeprac. vyd. Praha: Informatorium, 242 s. ISBN 80-86073-24-6.
- Pravda, D., Paláček, J., 1988. Vybrané hematologicko-biochemické parametry pstruha duhového (*Salmo gairdneri* Richardson) v průmyslových odchovech ryb. In: Sborník konference Chov lososovitých ryb. Mariánské lázně, 264-267.
- Pravda, D., Svobodová, Z., 2003. Hematologie ryb. In: Doubek, J., Bouda, J., Doubek, M., Füll, M., Knotková, Z., Pejřilová, S., Pravda, D., Scheer, P., Svobodová, Z., Vodička, R., 2003. Veterinární hematologie. Brno: Noviko, 382-405 s. ISBN 80-86542-02-5.

- Rieger, A. M., Bareda, D. R., 2011. Antimicrobial mechanisms of fish leucocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 35 (12), 1238-1245. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.009>
- Rybářské sdružení České republiky, 2018. Produkce a trh ryb. Rybářské sdružení České republiky | Sdružení [online]. Copyright © 2018, Rybářské sdružení ČR [cit. 08.03.2021]. Dostupné z: <http://www.cz-ryby.cz/produkce-ryb/produkce-a-trh-ryb>
- Sari, R.P., Windarti, W., Riauwaty, M., 2020. Blood Description of Patin Fish (*Pangasius hypophthalmus*) Maintained by Photoperiod Manipulation and Turmeric-enriched Feeding. *Berkala Perikanan Terubuk*, 48.3, 501-507. ISSN 0126-4265.
- Seno, R., Hata, N., Oyamatsu, T., Fukuda, H., 2003. Curative effect of 0.5% salt water treatment on carp, *Cyprinus carpio*, infected with Carp Edema Virus results mainly from reviving the physiological condition of the host. *Fish Pathology* 51 (2), 123-124. Dostupné z: <https://doi.org/10.11233/aquaculturesci1953.51.123>
- Setiyowati, I., Suprpto, H., Mahasri, G., 2019. The Effects of Mercury Chloride (HgCl<sub>2</sub>) on the Changes in Hematology and Blood Sugar Level in Carps (*Cyprinus carpio*). In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, 2019 (236), 1-11. Dostupné z: doi: 10.1177/0748233715572561
- Spangenberg, R., Schreckenbach, K., Meese, J., 1989. Main values for defining the state of health and productiveness of carp fingerlings (C1-2). Odd. 2. In: Pravda, D. (ed.), 1989. Druhá celostátní ichtyohematologická konference ČSVTS se zahraniční účastí, sborník přednášek a dokladů s anglicko-českými souhrny: Litomyšl, 28. - 29. 11. 1989. Praha: ČSVTS. 350 s.
- Steinhagen, D., Oesterreich, B., & Körting, W., 1997. Carp coccidiosis: clinical and hematological observations of carp infected with *Goussia carpelli*. *Diseases of aquatic organisms*, 30 (2), 137-143. Dostupné z: doi: 10.3354/dao030137
- Suzuki, Y., 1986. Cytochemistry of basophil granulocyte in carp and puffer. *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries* 52 (11), 1895-1899. Dostupné z: <https://doi.org/10.2331/suisan.52.1895>
- Svoboda, M., Lusková, V., Drastichová, J., Žlábek, V., 2001. The Effect of Diazinon on Haematological Indices of Common Carp (*Cyprinus carpio* L). *Acta Vet. Brno* 2001, 70, 457-465. Dostupné z: <https://doi.org/10.2754/avb200170040457>
- Svobodová, Z., Kolářová, J., Navrátil, S., Veselý, T., Chloupek, P., Tesarčík, J., Čítek, J., 2007. Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb. 4., přeprac. vyd. Praha: Informatorium, 264 s. ISBN 978-80-7333-051-4.
- Svobodová, Z., Kouřil, J., Hamáčková, J., 1978. The values of some haematological indices in parent tench (*Tinca tinca*). *Živočišná výroba* 23, 825-833.
- Svobodová, Z., Máchová, J., 1985. Příčiny, diagnostika a prevence otrav ryb. Pardubice: Ústav veterinární osvěty. Veterinární péče v chovech ryb, 136 s.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Modrá, H., 2012. Metody hematologického vyšetřování ryb. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 38 s. ISBN 978-80-87437-62-9.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Paláčková, J., 1986. Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb. *Edice Metodik, VÚRH, Vodňany*, (20), 31 s.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Paláčková, J., 1991. Unified methods of haematological examination of fish. Vodňany: Research Institute of fish culture and hydrobiology, pp. 31.

- Svobodová, Z., Sudová, E., Nepejchalová, L., Červinka, S., Vykusová, B., Modrá, H., Kolářová, J., 2006. Effects of oxytetracycline containing feed on pond ecosystem and health of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Veterinaria Brno*, 75 (4), 571-577.
- Svobodová, Z., Vykusová, B., Máchová, J., Müller, R., Lloyd, R., 1994. Sublethal chronic effects of pollutants on freshwater fish. *R. Muller ir R. Lloyd. Lugano*, 39-52.
- Swaminathan, T. R., Kumar, R., Dharmaratnam, A., Basheer, V. S., Sood, N., Pradhan, P. K., Sanil, N.K., Vijayagopal, P., Jena, J. K., 2016. Emergence of carp edema virus in cultured ornamental koi carp, *Cyprinus carpio* koi, in India. *Journal of General Virology*, 97 (12), 3392-3399. Dostupné z: doi:10.1099/jgv.0.000649
- Trebichavský, I., Ondráčková, P., Faldyna, M., 2009. Vznik a diferenciacie buněk imunitního systému, primární lymfatické orgány. In: Toman, M., Bárta, O., Dostál, J., Faldyna, M., Holář, V., Hořín, P., Hruban, V., Jeklová, E., Knotek, Z., Kopecký, J., Koudela, B., Krejčí, J., Nechvátalová, K., Ondráčková, P., Plachý, J., Pospíšil, R., Pospíšil, Z., Rybníkář, A., Ryšánek, D., Smola, J., Šíma, P., Tlaskalová, H., Trebichavský, I., Veselký, L., 2009. *Veterinární imunologie-2., doplněné a aktualizované vydání*. Praha: Grada Publishing, a.s., 392 s. ISBN 978-80-247-2464-5.
- Vali, S., Mohammadi, G., Tvabe, K.R., Moghadas, F., Naserabad, S.S., 2020. The effects of silver nanoparticles (Ag-NPs) sublethal concentrations on common carp (*Cyprinus carpio*): Bioaccumulation, hematology, serum biochemistry and immunology, antioxidant enzymes, and skin mucosal responses. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2020, 194 (110353), 1-12. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110353>
- Vuren, J.H.J., Hattingh, J., 1978. A seasonal study of the haematology of wild freshwater fish. Great Britain: The Fisheries Society of the British Isles. *Journal of Fish Biology*, 13, 305-313. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1978.tb03438.x>
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Bláhová, J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šírká, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Maršálek, P., Kocour Kroupová, H., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2014. *Vodní toxikologie pro rybáře*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 600 s. ISBN 978-80-87437-89-6.
- Volf, F., a Havelka, J., 1958. *Rybářská zdravotní věda*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 206 s.
- Wada, S., Atami, H., Kurata, O., Hatai, K., Kasuya, K., Watanabe, Y., 2008. Proliferative branchitis associated with pathognomonic, atypical gill epithelial cells in cultured ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathology* 43, 89-91. Dostupné z: <https://doi.org/10.3147/jspf.43.89>
- Watanuki, N., Takahashi, A., Yasuda, A., Sakai, M., 1999. Kidney leucocytes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, are activated by intraperitoneal injection of b-endorphin. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 71, 89-97. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(99\)00089-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00089-6)

- Way, K., Haenen, O., Stone, D., Adamek, M., Bergmann, S.M., Bigarré, L., Diserens, N., El-Matbouli, M., Gjessing, M.C., Jung-Schroers, V., Leguay, E., Matras, M., Olesen, N. J., Panzarin, V., Piačková, V., Toffan, A., Vendramin, N., Veselý, T., Waltzek, T., 2017. Emergence of carp edema virus (CEV) and its significance to European common carp and koi *Cyprinus carpio*. *Diseases of Aquatic Organisms* 126: 155-166. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3354/dao03164>
- Way, K., Stone, D., 2013. Emergence of carp edema virus-like (CEV-like) disease in the UK. *CEFAS Finfish News*, 15, 32-34.
- Witeska, M., 2005. Stress in fish-hematological and immunological effects of heavy metals. *Electronic journal of ichthyology*, 1 (1), 35-41.
- Witeska, M., Kondera, E., Lipionoga, J., Jastrzebska, A., 2010a. Changes in oxygen consumption rate and red blood parameters in common carp *Cyprinus carpio* L. after acute copper and cadmium exposures. *Fresenius Environ Bull*, 19, 115-122.
- Witeska, M., Kondera, E., Szymanska, M., Ostrysz, M., 2010b. Hematological Changes in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) after Short-Term Lead (Pb) Exposure. *Polish Journal of Environmental Studies* 19 (4), 825-831.
- Witeska, M., Kościuk, B., 2003. Changes in common carp blood after short-term zinc exposure. *Environ. Sci. Pollut. Res*, 3, 15-24. Dostupné z: <https://doi.org/10.1065/espr2003.07.161>
- Woo, P.T.K., Bower, S.M., Bureson, E.M., Choudhury, A., Cone, D.K., Dawe, D.L., Disk, T.A., Dickerson, H.W., Dyková, I., Ko, R.C., Lester, R.J.G., Levy, M.G., Lom, J., Molnár, K., Nickol, B.B., Noga, E.J., Paperna, I., Poynton, S.L., Roubal, F.R., Thomas, P.T., van Muiswinkel, W.H., 1995. *Fish Diseases and Disorders*. 1. University of Guelph, Canada: CAB INTERNATIONAL, pp. 808. ISBN 085198 823 7.
- Zhang, X., Ni, Y., Ye, J., Xu, H., Hou, Y., Luo, W., & Shen, W., 2017. Carp edema virus, an emerging threat to the carp (*Cyprinus carpio*) industry in China. *Aquaculture*, 474, 34-39. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.033>
- Zusková, E., Papežiková, I., Palíková, M., Scholz, T., Gelnar, M., Dyková, I., Piačková, V., Řehulková, E., Navrátil, S., Blažek, R., 2019. Onemocnění působená eukaryotickými organismy. In: Palíková, M. (ed), 2019. *Nemoci a chorobné stavy ryb*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany vod, 133-334. ISBN 978-80-7514-085-2.

## 8. Seznam tabulek

<b>Tabulka č. 1</b>	Diferenciální rozpočet leukocytů kapra obecného.	Str.: 33
<b>Tabulka č. 2</b>	Výsledky zevního ohledání a patologicko-anatomického vyšetření ryb v jarním období.	Str.: 45 – 46
<b>Tabulka č. 3</b>	Výsledné hodnoty hematologických parametrů při vlivu CEV.	Str.: 48
<b>Tabulka č. 4</b>	Výsledné hodnoty jednotlivých typů leukocytů při vlivu CEV.	Str.: 48
<b>Tabulka č. 5</b>	Výsledné hodnoty hematologických parametrů z jarního a podzimního období pro jednotlivé lokality.	Str.: 50
<b>Tabulka č. 6</b>	Výsledné hodnoty leukogramu jarního a podzimního období pro jednotlivé lokality.	Str.: 51
<b>Tabulka č. 7</b>	Výsledné hodnoty hematologických parametrů ze všech sledovaných lokalit pro jednotlivá období.	Str.: 52
<b>Tabulka č. 8</b>	Výsledné hodnoty leukogramu ze všech sledovaných lokalit pro jednotlivá období.	Str.: 52
<b>Tabulka č. 9</b>	Porovnání hodnot hematologických ukazatelů ryb z jednotlivých lokalit a období s fyziologickými hodnotami.	Str.: 54
<b>Tabulka č. 10</b>	Porovnání hodnot leukogramu ryb z jednotlivých lokalit a období s fyziologickými hodnotami.	Str.: 55
<b>Tabulka č. 11</b>	Porovnání hodnot leukogramu CEV pozitivních ryb s fyziologickými hodnotami.	Str.: 55

## 9. Seznam obrázků

<b>Obrázek č. 1</b>	Erytrocyty kapra obecného.	Str.: 16
<b>Obrázek č. 2</b>	Lymfocyty kapra obecného.	Str.: 18
<b>Obrázek č. 3</b>	Monocyt kapra obecného.	Str.: 19
<b>Obrázek č. 4</b>	Neutrofilní segment a neutrofilní tyčka kapra obecného.	Str.: 20
<b>Obrázek č. 5</b>	Trombocyt kapra obecného.	Str.: 22
<b>Obrázek č. 6</b>	Odběr krve metodou punkce ocasní cévy.	Str.: 25
<b>Obrázek č. 7</b>	Edém žaber a nekrotické konce žaberních lístků.	Str.: 37
<b>Obrázek č. 8</b>	Výrazné zahlnění a nekróza žaber.	Str.: 37
<b>Obrázek č. 9</b>	Zhotovení krevního nátěru.	Str.: 42
<b>Obrázek č. 10</b>	Komerční barvicí kit Hemacolor®.	Str.: 43
<b>Obrázek č. 11</b>	Barvicí řada Hemacolor® v 50ml kádinkách.	Str.: 43
<b>Obrázek č. 12</b>	Obarvené krevní nátěry.	Str.: 43
<b>Obrázek č. 13</b>	Způsob prohlížení krevního nátěru.	Str.: 44

## 10. Seznam grafů

<b>Graf č. 1</b>	Procentuální zastoupení CEV+ a CEV- ryb v jednotlivých lokalitách.	Str.: 47
<b>Graf č. 2</b>	Porovnání procentuálního zastoupení typů leukocytů mezi CEV+/- rybami.	Str.: 49

## 11. Seznam použitých zkratek

<b>CEV</b>	Kapří Edema virus (Carp Edema Virus)
<b>CEVD</b>	Edémová nemoc kaprů (Carp Edema Virus Disease)
<b>fl</b>	Femtolitr - $1 \cdot 10^{-15}$ litru
<b>Hb</b>	Množství hemoglobinu
<b>KSD</b>	Spavá nemoc koi kaprů (Koi Sleepy Disease)
<b>LC50</b>	Koncentrace látky potřebná k vyvolání úhynu 50 % testovaných organismů
<b>Lk</b>	Leukokritová hodnota
<b>MCH</b>	Hemoglobin erytrocytu - Mean Cell Hemoglobin
<b>MCHC</b>	Střední barevná koncentrace - Mean Cell Hemoglobin Concentration
<b>MCV</b>	Střední objem erytrocytu - Mean Cell Volume
<b>PCR</b>	Polymerázová řetězová reakce
<b>PCV</b>	Hematokritová hodnota - Packed Cell Volume
<b>RBC</b>	Počet erytrocytů
<b>RBCs</b>	Erytrocyty - červené krvinky
<b>TP</b>	Total Protein - celkové bílkoviny
<b>WBC</b>	Počet leukocytů
<b>WBCs</b>	Leukocyty - bílé krvinky

## 12. Abstrakt

Cílem bakalářské práce bylo posoudit vliv edémové nemoci kaprů, způsobované kapřím edema virem, na vybrané hematologické ukazatele krve nakažených jedinců kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a následně porovnat výsledné hodnoty hematologických faktorů nakažených ryb oproti rybám neinfikovaným kapřím edema virem.

Dvacet osm jedinců kapra obecného bylo odloveno v jarním období roku 2019 ze tří různých lokalit na základě podezření na výskyt edémové nemoci kaprů. V průběhu podzimu bylo odebráno z totožných lokalit dalších 30 jedinců. Ti byli určeni pro otestování přetrvávajícího výskytu virové DNA v žaberní tkáni. Každé testované rybě byly odebrány vzorky krve a žaberní tkáně. Z odebrané žaberní tkáně bylo provedeno stanovení přítomnosti DNA kapřího edema viru metodou PCR. Ze získané krve bylo stanoveno celkové množství erytrocytů (RBC), počet leukocytů (WBC), hematokritová hodnota (PCV), množství hemoglobinu (Hb), střední objem erytrocytu (MCV), hemoglobin erytrocytu (MCH), střední barevná koncentrace (MCHC) a diferenciální rozpočet leukocytů.

Ze zjištěných výsledků je patrné, že u CEV pozitivních ryb došlo ke statisticky významnému rozdílu hematologických ukazatelů u celkového počtu erytrocytů (RBC), hematokritové hodnoty (PCV) a množství hemoglobinu (Hb). U těchto parametrů došlo ke zvýšení hodnoty v porovnání s CEV negativními rybami. Jediným signifikantním rozdílem diferenciálního počtu bílých krvinek je nárůst procentuálního zastoupení tyčků u CEV pozitivních ryb. Je však důležité zmínit, že ke změně hodnoty některého z hematologických faktorů může dojít nejen vlivem nákazy CEVD. To dokládají i statisticky významné rozdíly mezi jedinci kaprů z jarního, či podzimního období a z jednotlivých odběrových lokalit. U těchto rozdílů se lze domnívat, že byly způsobené působením dalších vlivů, jakými například jsou rozdílná kvalita vody, teplota, hustota obsádky, reprodukční cyklus, toxické látky a patogenní organismy.

**Klíčová slova:** edémová nemoc kaprů, hematologické faktory, hematologie ryb, kapr obecný, kapří edema virus, leukocyty, leukogram



## **Abstract**

The aim of the bachelor thesis was to describe the effect of carp edema virus disease caused by carp edema virus on selected hematological factors of blood of infected common carp (*Cyprinus carpio*). Subsequently, the results of infected and uninfected fish were compared with each other.

Twenty-eight carp were caught in the spring of 2019 from three different locations on suspicion of carp edema virus. During the autumn, another 30 carp were taken from identical localities. Fish from the autumn period were caught to test the persistence of viral DNA in gill tissue. Blood and gill tissue samples were taken from each tested fish. Total erythrocyte count (RBC), total leukocyte count (WBC), packed cell volume (PCV), amount of hemoglobin (Hb), mean cell volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH), mean cell hemoglobin concentration (MCHC) and differential white blood cell count were determined from blood samples.

The results show that in CEV positive fish there was a statistically significant difference in total erythrocyte count (RBC), packed cell volume (PCV) and amount of hemoglobin (Hb). The values of these parameters increased compared to CEV negative fish. The only significant difference in the differential white blood cell count is an increase in the percentage of neutrophil bands in CEV-positive fish. However, it is important to note that a change in the value of haematological factors may occur not only due to CEVD infection. This is also evidenced by statistically significant difference between carp from the spring or autumn period and from individual localities. For these difference, it can be assumed that their difference was caused by influences such as different water quality, temperature, stocking density, reproductive cycle, toxic substances and pathogenic organisms.

**Keywords:** carp edema virus disease, haematological factors, fish haematology common carp, carp edema virus, leukocytes, leukogram