VÝZKUMNÝ ÚSTAV RYBÁŘSKÝ A HYDROBIOLOGICKÝ,
VODŇANY

JEDNOTNÉ METODY HEMATOLOGICKÉHO VYŠETŘOVÁNÍ RYB

EDICE METODIK

22

VÝZKUMNÝ ÚSTAV RYBÁŘSKÝ A HYDROBIOLOGICKÝ

Z. SVOBODOVÁ, D. PRAVDA,
J. PALÁČKOVÁ

JEDNOTNÉ METODY HEMATOLOGICKÉHO VYŠETŘOVÁNÍ RYB

Akademická knihovna JU
3291019401

JIHOČESKÉ UNIVERZITY V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
AKADEMICKÁ KNIHOVNA
6

č. 22

VODŇANY
1986

VÝZKUMNÝ ÚSTAV
RYBÁŘSKÝ A HYDROBIOLOGICKÝ
VODŇANY
Přírůstkové číslo
Značka
Datum zařazení 30. IX. 1986

O b s a h :

strana

1. Úvod 3
2. Odběr krve 4
   2.1 Odběr krve u plůdku ryb 4
   2.2 Odběr krve u ryb s kusovou hmotností nad 200 g včetně ryb generačních 7
   2.3 Stabilizace krve 9
3. Stanovení ukazatelů červeného krevního obrazu 9
   3.1 Počet erytrocytů 9
   3.2 Množství hemoglobinu 12
   3.3 Hematokritová hodnota 14
   3.4 Základní hodnoty erytrocytu a jejich výpočet 14
   3.5 Rychlost sedimentace erytrocytů 15
4. Stanovení ukazatelů bílého krevního obrazu 17
   4.1 Počet leukocytů 17
   4.2 Leukokritová hodnota 18
   4.3 Diferenciální rozpočet leukocytů 19
5. Stanovení hodnot vybraných biochemických ukazatelů v krevní plazmě 26
   5.1 Celkové bílkoviny 27
   5.2 Glukóza 28
   5.3 Celkové lipidy 28
   5.4 Triacylglyceroly 28
   5.5 Cholesterol 29
   5.6 Močovina 29
   5.7 Amoniak 29
   5.8 Kyselina mléčná 31
   5.9 Aminotransferázy 31
   5.10 Laktátdehydrogenáza 32
   5.11 Glutamátdehydrogenáza 32
   5.12 Methemoglobin 33
6. Zkrácený hematologický kondiční test /ZHKT/ ryb a jeho provedení 34
7. Přílohy 35
   7.1 Mezinárodní soustava jednotek SI v ichtyohematologii na příkladu normálních hodnot v krvi a v krevní plazmě /pl./ kapra 35
   7.2 Přepočtové faktory starého a nového vyjádření ichtyohematologických hodnot 36

1. Úvod

Ichtyohematologie se úspěšně rozvíjí ve dvou vzájemně souvisejících a doplňujících se směrech, tj. morfologii a fyziologii krve ryb. Morfologické studie jsou prostředkem k poznání normální a patologické funkce krve ryb. Při ichtyohematologickém sledování není možné analyzovat pouze periferní krev, ale podobně jako u vyšších obratlovců i orgány krvetvorby a likvidace krevních elementů /ledvina, slezina, endotel cév, subepiteliální tělíska ve střevě, thymus, žábry, srdce/. Rovněž je důležité sledovat složité systémy neurohumorální regulace.

V předkládané metodice byla pozornost zaměřena na morfologické a fyziologické vyšetření periferní krve ryb. Vedle nejdůležitější diagnostické funkce tohoto vyšetření je analýza periferní krve ryb v současné době využívána při sledování vlivu toxických látek na ryby, při posuzování kondice ryb, nespecifické odolnosti jednotlivých plemen a linií ryb, generačních ryb, k posuzování vhodnosti krmiv a krmných směsí, vlivu stresových situací apod. Ke stanovení hodnot jednotlivých hematologických ukazatelů jsou v předkládané metodice uvedeny pouze vyzkoušené a ověřené postupy, které je možno použít ve veterinární a rybářské praxi k vyšetření periferní krve ryb. Hodnoty jednotlivých hematologických ukazatelů jsou silně ovlivněny endogenními a exogenními faktory, a proto není snadné stanovit jejich fyziologické rozmezí. Hematologické a biochemické hodnoty uvedené v jednotlivých kapitolách je proto nutno považovat pouze za orientační.

Autoři metodiky vzali v úvahu předchozí metodické pokyny k hematologickému vyšetřování ryb publikované Luckým /1976/ a Kočišem a kol./1985/. Předkládaná metodika zpracovává tuto problematiku především z hlediska rutinních možností veterinární a rybářské praxe a doporučuje pouze zcela ověřené a sjednocené vyšetřovací postupy.

2. Odběr krve

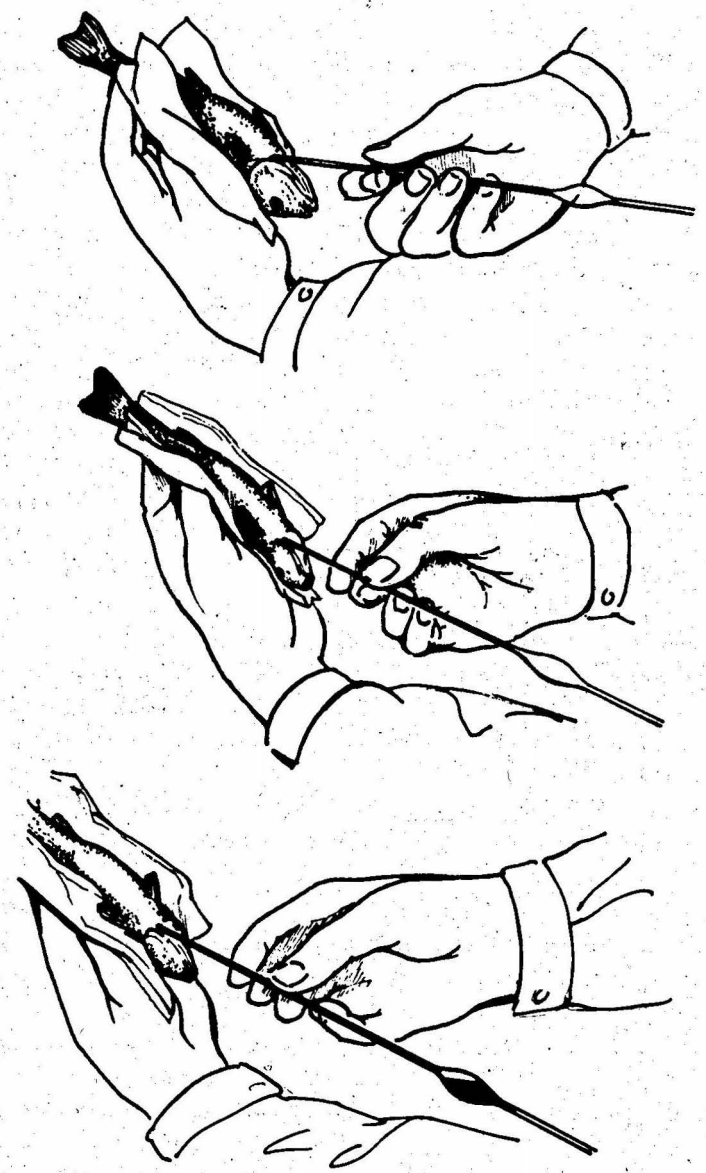
Odběr krve u ryb pro ichtyohematologická šetření se provádí zásadně bezprostředně po vylovení ryb z prostředí, ve kterém jsou chovány. Základním kriteriem pro volbu odběrové metody jsou velikostní poměry ryb, nároky na množství krve a v neposlední řadě i další osud ryb, odlovovaných pro různá vyšetření.

2.1 Odběr krve u plůdku ryb

U většiny plůdku je v důsledku velikostních poměrů a jemného uspořádání vyvíjejícího se cévního řečiště krve objektivně tak málo /1 až 2 % hmotnosti/, že i minimální reprezentativní krevní volumen k vyšetření lze hledat jen v centrálním úseku cirkulačního ústrojí, tj. v srdci. Pro stanovení základních ukazatelů postačí 4 kapky nesrážlivé krve, pro vyšetření v rozsahu zkráceného hematologického kondičního testu /ZHKT/ pak téměř polovina tohoto objemu. Taková krevní kvanta lze spolehlivě získávat od plůdku s hmotnostním minimem od 8 gramů. Získání tohoto množství krve umožňuje metoda krevního náběru vnější punkcí srdce /kardiopunkce/ pomocí cca 200 mm dlouhé skleněné kapiláry, jejíž vnitřní povrch je před použitím potažen jemným filmem heparinu. Při této heparinizaci je nutné dbát na to, aby heparin vytvořil pouze jemný film na vnitřních stěnách odběrové kapiláry a aby zbylý roztok byl spolehlivě vyfouknut a popřípadě i odsát filtračním papírem nebo papírovou vatou. Vlatní náběr krve se pak provádí tak, že se ryba po vylovení z vody rychle fixuje čtvercem papírové vaty o rozměrech cca 10 x 10 cm za její hřbetní část. Ventrální část trupu musí být volně přístupná. V této poloze se pak prsty jedné ruky fixuje po celou dobu odběrového zákroku. Poté se druhou rukou otře krajina srdeční smotkem papírové vaty do sucha a uchopí se heparinizovaná odběrová kapilára, z níž se bezprostředně před zákrokem odlomí konec zašpičatělého hrotu. Ryba fixovaná v poloze hlavou dolů se pozvedne do úrovně očí a druhou rukou se nasadí hrot odběrové kapiláry pod úhlem asi 60° k podélné ose těla cca 1 - 2 mm kraniálně

od středového místa, jež je průsečíkem podélné roviny těla a spojnicí kraniálních okrajů báze obou prsních ploutví. U kapřího plůdku je v tomto bodu patrné tzv. "stigma" v podobě mělké a zpravidla pigmentované prohlubně kůže o průměru do 1 mm. Je to v podstatě pozůstatek po otvoru, jímž v období žloutkové výživy vstupovala do těla žloutková žíla, přivádějící do základu srdce krev obohacenou živinami, rezorbovanými ze žloutkového váčku. Poté se energickým vpichem zavede hrot heparinizované odběrové kapiláry přes tělní stěnu do osrdečníku a dále do srdce /obr. 1/. Spolehlivým dokladem nabodnutí některé ze srdečních dutin je, že se v kapiláře objeví krev, jež pulzovými pohyby časově souběžně s tepem srdečním "napulzuje" pod mírným hydrostatickým tlakem do šikmo dolů držené kapiláry. Nedojde-li k samovoné náplni krví hned v počáteční fázi protnutí stěny této tělní dutiny, je to zpravidla tím, že hrot odběrové kapiláry byl zaveden příliš hluboko do osrdečníkové dutiny a popřípadě až do její protější stěny. V takovém případě je nutno hrot odběrové kapiláry lehce povytáhnout zpět a případným mírným pootočením zajistit volný průchod krve do kapiláry, a tím i její samovolnou náplň nesrážlivou žilnou krví. Pro dosažení některé ze srdečních dutin stačí obvykle zavésti hrot odběrové kapiláry 3 až 4 mm hluboko pod kůži v místě vpichu. Po skončení odběru se hrot odběrové kapiláry vyjme z rány, ryba s fixačním obalem se odloží a kapilára s krví se převede do vodorovné polohy a poté několikerým převrácením se zajistí dokonalé smísení krve s antikoagulantem. Tím se zajistí potřebná stabilizace krevního vzorku.

Další postup manipulace s odebraným vzorkem nesrážlivé krve ryby spočívá v tom, že se nejprve nechá z kapiláry odkápnout 3 až 4 kapky krve na připravené čisté a suché podložní sklíčko, z něhož se odsají příslušná množství krve pro vlastní vyšetření. Případná zbývající část krve se ponechá v odběrové kapiláře, jejíž oba protilehlé konce jsou přiměřeně zkráceny odlomením a pečetním voskem zataveny. Před dalším zpracováním se uchovává v kolmé poloze a při teplotě do 4 °C.



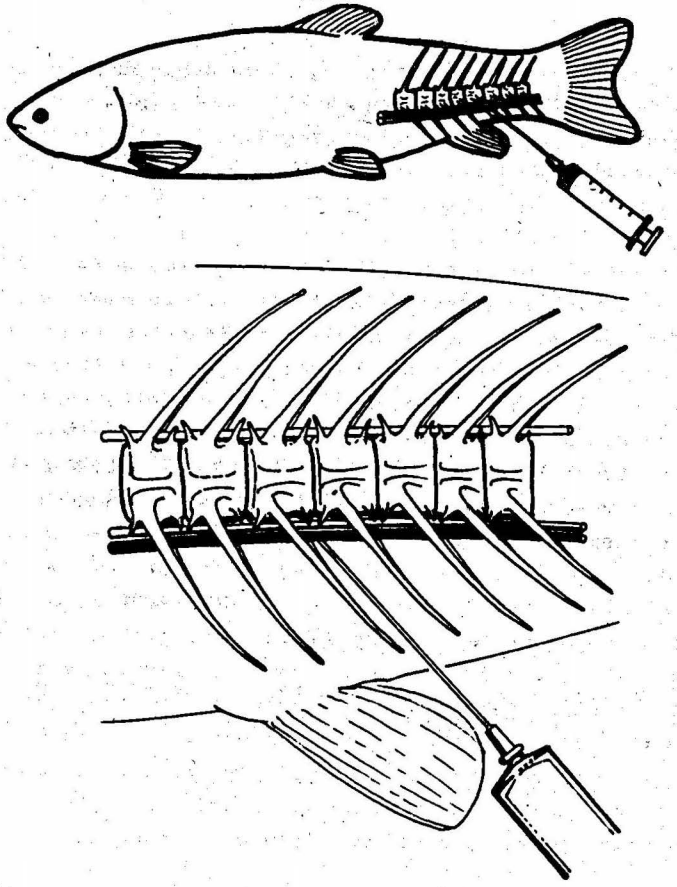
Obr. 1: Odběr krve u plůdku ryb metodou krevního náběru vnější punkcí srdce /kardiopunkce/ pomocí cca 200 mm dlouhé skleněné kapiláry.

U plůdku ryb s větší hmotností např. kolem 20 g lze případně odběrovou skleněnou kapiláru nahradit čistou a suchou heparinizovanou injekční jehlou o průsvitu do 0,5 mm /velmi vhodné jsou pro tyto účely jednorázové injekční jehly, žlutý případně zelený konus/, kterou zavedeme do srdeční dutiny obdobně jako skleněnou kapiláru. Jakmile se v ústí jehly objeví krev jehlu pustíme, čímž zaujme vlivem převážení konusu šikmou polohu a v té pak necháme samovolně odkapat potřebné množství krve buď na čisté suché podložní sklíčko nebo do některé ze zkumavek typ Eppendorf s víčkem, které jsou pro další manipulaci s krví ryb mimořádně výhodné.

Kardiopunkční techniku odběru lze použít také u ryb vyšších věkových kategorií v případech, kdy si můžeme dovolit usmrcení vyšetřované ryby. Taková situace se naskýtá např. při komplexním zdravotním vyšetření vzorků ryb a při současné potřebě provést komplexnější hematologický výzkum, který vyžaduje větší kvanta krve. V těchto případech se provádí odběr krve pomocí heparinizované injekční jednorázové celoplastické stříkačky Chirana s nasazenou, rovněž heparinizovanou, injekční jehlou /nejlépe opět jednorázovou, žlutý případně zelený konus/. Zavedení injekční jehly do srdce ryby je technicky obdobné jako při použití odběrových skleněných kapilár. Po zavedení jehly do srdce se vytvoří ve stříkačce mírný podtlak, který se udržuje po celou dobu náběru.

2.2 Odběr krve u ryb s kusovou hmotností nad 200 g včetně ryb generačních

Nejvhodnější u těchto ryb je metoda odběru krve punkcí ocasních cév /obr. 2/. S ohledem na příznivé anatomicko-topografické poměry, jež jsou u všech druhů našich ryb velmi obdobné, je postup náběru krve touto metodou následující: na ventrální straně ocasního násadce, kaudálně od báze řitní ploutve se nejprve strhne nepárová kožní šupina. Po osušení místa se zavede ve střední rovině, asi 1 cm kaudálně od řitní ploutve, kraniodorzálním směrem pod úhlem 45° dostatečně dlouhá injekční jehla, pevně nasazená na konusu heparinizované jednorázové injekční stříkačky. Jehla se zavádí pomalu



Obr. 2: Odběr krve u ryb s kusovou hmotností nad 200 g metodou punkce ocasních cév.

a mírným tlakem, jímž se překonává jen odpor okolní svaloviny. Takto při šetrném postupu dojde nejprve k nabodnutí ocasní žíly, což se pozná podle úniku krve z konusu jehly do stříkačky. Při rychlejším postupu hrot jehly projede zpravidla žílou, ale i tepnou a narazí na tvrdou překážku obratlového těla. V takovém případě se jehla mírně povytáhne a odebírá se krev z tepny nebo žíly, což není snadné vždy rozlišit. Při zavádění jehly kolmo na podélnou osu těla je vzhledem k šikmému postavení cévních výběžků větší pravděpodobnost, že se narazí právě na některý z nich a pak je nutno vpich opakovat, což při výše popsaném postupu

prakticky odpadá. Popsaná metoda je plně doporučitelná zejména při sériových krevních náběrech, neboť odběr 2 ml krve od kaprovitých ryb s kusovou hmotností nad 1 000 g je pro šetřené exempláře naprosto bez rizika ztrát.

2.3 Stabilizace krve

Ke stabilizaci krve ryb se výhradně používá vodný roztok sodné soli heparinu. Heparin SPOFA inj. je velmi účinné přirozené protisrážecí činidlo distribuované pro laboratorní účely v 5 ampulkách po 1 ml. 1 ml tohoto vodného roztoku obsahuje 5 000 m.j. sodné soli heparinu. Pro stabilizaci 1 ml krve ryb stačí 0,01 ml /zhruba 1 kapka/ vodného roztoku heparinu, který se ve zkumavce nebo baničce nechá zaschnout a poté se provede náběr krevního vzorku. Mírné předávkování heparinu nevyvolává změny na krevních buňkách ryb.

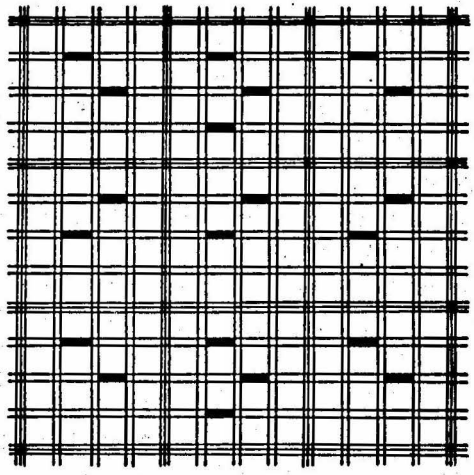
3. Stanovení ukazatelů červeného krevního obrazu

3.1 Počet erytrocytů /Er, RBC/

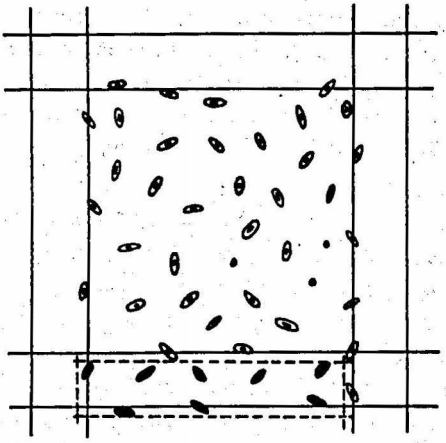
Stanovení počtu erytrocytů u ryb se provádí v heparinizované krvi ředěné Hayemovým roztokem v poměru 1 : 200. Hayemův roztok má následující složení:

chlorid rtuťnatý $HgCl_2$ - sublimát	2,5 g
síran sodný Na_2SO_4	25 g
chlorid sodný NaCl	5 g
destilovaná voda	ad 1 000 ml.

Tím, že roztok obsahuje sublimát jako prostředek fixující krvinky, je jedovatý. K ředění krve se používá tzv. baničkové metody podle Bürkera. Ředění se provádí ve speciálních skleněných baničkách nebo v penicilinových lahvičkách o objemu cca 15 až 25 ml, do kterých se nejprve dá speciální pipetou přesně 4 975 µl před použitím přefiltrovaného Hayemova roztoku a potom vyplachovací mikropipetou 25 µl heparinizované krve. Mikropipeta se opětovným nasáním roztoku několikrát propláchne, banička se uzavře gumovou zátkou a její obsah se promíchává krouživým pohybem 2 až 3 minuty. Kapátkem nebo Pasteurovou pipetou se naplní počítací Bürkerova komůrka naředěnou krví. Erytrocyty se počítají ve 20 obdélnících stejnoměrně rozmístěných po celé mřížce počítací komůrky /obr.3/. Zpravidla se počítá při



Obr. 3: Nárys mřížky Bürkerovy počítací komůrky. Počet erytrocytů se stanovuje ve 20 tmavě vyznačených obdélnících stejnoměrně rozmístěných po celé mřížce.



Obr. 4: Způsob počítání erytrocytů.

- erytrocyty, které se počítají
- erytrocyty, které se nepočítají
- leukocyty

200násobném zvětšení. Při vlastním stanovení se postupuje tak, že se počítají všechny erytrocyty, které jsou uvnitř obdélníků, aniž se dotýkají některé z jejich stran. Z erytrocytů, které se dotýkají stran, se počítají jen ty, které se dotýkají pravé a horní strany buď uvnitř nebo vně /obr. 4/. Celkové napočítané množství erytrocytů se násobí číslem 10 000 a výsledný počet je množství erytrocytů v $T.l^{-1}$ /T-tera = 10^{12}/. Stanovení počtu erytrocytů klasickou počítací metodou je možno provádět ještě i po 24hodinovém uložení heparinizované krve při teplotě do 4 °C.

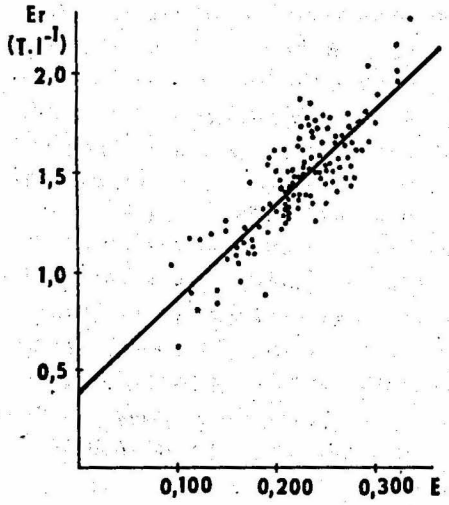
V současné době se u ryb začínají zavádět kolorimetrické metody na stanovení počtu erytrocytů. Kolorimetrická metoda stanovení počtu erytrocytů podle Pawinského je ve srovnání s klasickou počítací metodou jednodušší, rychlejší, méně pracná, není zatížena subjektivní chybou, má větší reprodukovatelnost a je vhodná pro sériové stanovení. Omezené použití má tato kolorimetrická metoda v ichtyotoxikologii, zejména při sledování účinku látek vyvolávajících zvětšení středního objemu erytrocytů. V těchto případech zvětšený střední objem erytrocytů způsobuje při měření vyšší extinkci a při běžně použitém přepočtu dochází ke stanovení vyššího počtu erytrocytů, a tím k zastření patologického účinku cizorodé látky na červený krevní obraz ryb. Z těchto důvodů je nutno v ichtyotoxikologii používat ke stanovení počtu erytrocytů nadále klasickou počítací metodu.

Při kolorimetrické metodě stanovení počtu erytrocytů u ryb je používán Pawinského roztok o následujícím složení:

bezvodý síran sodný Na_2SO_4	26,7 g nebo
dekahydrát síranu sodného $Na_2SO_4.10\ H_2O$	67,9 g
kyselina sulfosalicylová	2,0 g
destilovaná voda	ad 1 000 ml.

Odběr krve se provádí pomocí heparinizované jehly na hodinové sklíčko a odtud se ihned odebere vyplachovací mikropipetou 20 µl krve do 10 ml Pawinského roztoku, důkladně se promíchá, bez třepání. Extinkce vzorku se měří v 1 cm kyvetě na fotokolorimetru proti destilované vodě s použitím filtru o vlnové délce 600 nm. Počet erytrocytů se odečte z kalibrační křivky sestrojené z paralelních měření počtu erytrocytů, a to kolorimetrickou metodou podle Pawinského

a klasickou metodou v počítací Bürkerově komůrce v krvi několika desítek kusů ryb /dostačuje 30 - 40 kusů/ pokud možno v celém variačním rozpětí hodnot počtu erytrocytů. Příklad kalibrační křivky je uveden na obr. 5. Při použití kolorimetrické metody stanovení počtu erytrocytů je nutno ředění vzorku krve Pawinského roztokem provádět ihned po odběru krve na místě terénního vyšetření. Vlastní stanovení extinkce je nutno provést v období 20 minut až 4 hodiny po odběru krve.



Obr. 5: Vztah mezi extinkcí /E/ získanou při použití kolorimetrické metody podle Pawinského a počtem erytrocytů /Er/ zjištěných v počítací Bürkerově komůrce.

Počet erytrocytů u zdravého kapra se pohybuje v rozmezí 1,1 - 1,8 $T.l^{-1}$, u pstruha duhového v rozmezí 0,80 - 1,50 $T.l^{-1}$ krve.

3.2 Množství hemoglobinu /Hb/

Ke stanovení množství hemoglobinu v krvi ryb je používána fotometrická kyanohemiglobinová metoda. Princip metody spočívá v tom, že pomocí transformačního roztoku se hemoglobin uvolní z erytrocytů a převede se na stálý kyanohemiglobin, který se stanoví fotometricky. Jako transformačního roztoku lze použít roztok podle van Kampena a Zijlstra:

ferrikyanid draselný $K_3[Fe/CN/_6]$	0,20 g
kyanid draselný KCN	0,05 g
dihydrofosforečnan draselný KH_2PO_4	0,14 g
destilovaná voda	ad 1 000 ml

popřípadě roztok podle Drabkina:

ferrikyanid draselný $K_3[Fe(CN)_6]$	0,20 g
kyanid draselný KCN	0,05 g
hydrouhličitan sodný $NaHCO_3$	1,0 g
destilovaná voda	ad 1 000 ml.

Přítomností kyanidu draselného jsou oba transformační roztoky jedovaté. Uchovávají se v tmavé reagenční lahvi v chladničce, obměňují se po 3 - 4 týdnech. Zmrznutím se transformační roztoky znehodnotí.

Při vlastní analýze krve na stanovení množství hemoglobinu se do zkumavky odměří 7 ml /popřípadě 5 ml/ jednoho z transformačních roztoků, vyplachovací pipetou se přidá 25 µl /popř. 20 µl/ čerstvě odebrané nebo heparinizované krve a obsah zkumavky se ihned promíchá. Vyšetření heparinizované krve ryb na množství hemoglobinu musí být provedeno maximálně do 24 hodin po odběru při uložení v teplotě do 4 °C. Při používání transformačního roztoku podle van Kampena a Zijlstra je přeměna hemoglobinu na kyanohemiglobin rychlá, odečítání na fotokolorimetru je možno provést již po 3 minutách. Roztok podle Drabkina mění hemoglobin pomaleji, reakci je možno odečítat až po 15 - 20 minutách. Zbarvení kyanohemiglobinů je nejméně 24 hodin stálé. Vlastní měření extinkce vzorku se provádí v 1 cm kyvetě při vlnové délce 540 - 546 nm proti transformačnímu roztoku. Množství hemoglobinu se určí z kalibrační křivky. Kalibrační křivka se připraví běžným způsobem za použití kyanohemiglobinového standardu a transformačního roztoku. Kyanohemiglobinový standard /Sevatest Štandard Hb/ lze získat v národním podniku IMUNA, Šarišské Michalany, okres Prešov. Standard Hb je nutno skladovat při teplotě +2 až 10 °C a chránit před zmrznutím. Koncentrace kyanohemiglobinu je vyznačena na štítku. Ke stanovení množství hemoglobinu v krvi jako kyanohemiglobinu připravila Lachema Brno soupravu pod názvem Hemoglobin /Hb/; tato souprava se však zatím pro stanovení množství hemoglobinu v krvi ryb neosvědčila.

Obsah hemoglobinu v krvi ryb se udává v $g.l^{-1}$ a u zdravých kaprů a pstruhů duhových se pohybuje přibližně v rozmezí 60 - 100 $g.l^{-1}$.

3.3 Hematokritová hodnota /Hk, PCV/

Hematokritová hodnota vyjadřuje objem erytrocytů k celkovému objemu krve. Aby se tento objem mohl stanovit, je třeba v příslušném vzorku krve oddělit erytrocyty od plazmy tak, aby jako celek zaujaly svůj skutečný objem. Toho lze dosáhnout jen dokonalým odstředěním krve, provedeným ve speciálních zkumavkách, trubičkách nebo kapilárách. V ichtyohematologii se používá ke stanovení hematokritové hodnoty výlučně heparinizovaných kapilárek 7,5 cm délky /osvědčené jsou kapilárky polské výroby/. Čerstvě odebraná nestabilizovaná nebo heparinizovaná krev /maximálně do 4 hodin po odběru při uložení v teplotě do 4 ^{o}C/ se nasaje do kapilárek zhruba do 2/3 výšky a čistý konec se zataví nad kahanem. Utěsnění kapilárek je možno provést rovněž pomocí speciální modelovací hmoty, kterou vyrábí firma Janetzki v NDR. Kapiláry se vloží do hematokritové odstředivky /typ 316, počet otáček 14 000 za minutu/ a odstředí se 3 minuty. Po odstředění se na hematokritovém měřiči, který je součástí vybavení hematokritové odstředivky, přímo odečítají procenta hematokritu. Zjištěná hodnota v % se vynásobí koeficientem 0,01 a výsledná hodnota je PCV v $1.l^{-1}$. Délku celého sloupce krve a délku sloupce erytrocytů s následným výpočtem hematokritové hodnoty lze rovněž stanovit pomocí posuvného měřítka s noniem /např. zn. SOMET/.

Stanovení hematokritové hodnoty se pro svoji jednoduchost a přesnost stalo jedním ze základních vyšetření červené krevní složky u ryb. Fyziologické hematokritové hodnoty se pohybují u kaprů zhruba v rozmezí 0,28 - 0,40 $1.l^{-1}$, u pstruhů duhových v rozmezí 0,30 - 0,45 $1.l^{-1}$.

3.4 Základní hodnoty erytrocytu a jejich výpočet

Střední objem erytrocytu /MCV/

Hodnotu středního objemu erytrocytu možno vypočítat z hematokritové hodnoty /PCV/ udané v $1.l^{-1}$ a počtu erytrocytů /Er/ v $T.l^{-1}$ podle následujícího vzorce:

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

Hodnota středního objemu erytrocytu, udávaná ve fentolitrech /fl/ se pohybuje u zdravých kaprů v rozmezí 200 - 300 fl, u zdravých pstruhů duhových v rozmezí 350 - 400 fl.

Hemoglogin erytrocytu /MCH/

Hodnota hemoglobinu erytrocytu vyjadřuje průměrnou koncentraci hemoglobinu v jednotlivých erytrocytech a udává se v pikogramech - pg /10^{-12} g/. Vypočítá se z hodnoty hemoglobinu v $g.l^{-1}$ a z počtu erytrocytů /Er/ v $T.l^{-1}$ podle následujícího vzorce:

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

Hodnota hemoglobinu erytrocytu se pohybuje u zdravých kaprů v rozmezí 50 - 60 pg, u zdravých pstruhů duhových v rozmezí 65 - 75 pg.

Střední barevná koncentrace /MCHC/

Střední barevná koncentrace vyjadřuje koncentraci hemoglobinu v objemové jednotce erytrocytů. Vypočítá se z hodnoty hemoglobinu /Hb/ v $g.l^{-1}$ a z hematokritové hodnoty /PCV/ udané v $l.l^{-1}$ podle následujícího vzorce:

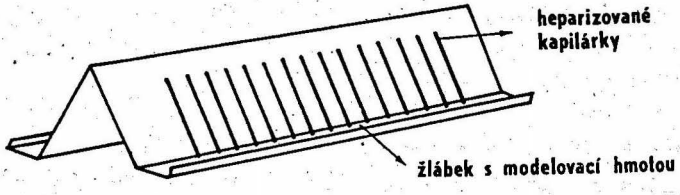
$$MCHC = \frac{Hb}{PCV \cdot 1\,000}$$

Hodnota střední barevné koncentrace se pohybuje u zdravých kaprů v rozmezí 0,20 - 0,26 $l.l^{-1}$, u zdravých pstruhů duhových v rozmezí 0,17 - 0,20 $l.l^{-1}$.

3.5 Rychlost sedimentace erytrocytů

Rychlost, jakou samovolně sedimentují erytrocyty v nesrážlivé krvi, je u zdravých organismů poměrně velmi stálá. Za různých chorobných stavů však bývá změněna, buď zrychlená nebo zpomalená. Rychlost sedimentace erytrocytů je možno měřit různými metodami. Velmi vhodná pro vyšetření krve ryb se ukázala metoda mikrosedimentace erytrocytů v šikmé poloze. Při vlastním vyšetření se heparinizovaná krev naplní do heparinizovaných kapilárek, které se používají ke stanovení hematokritové hodnoty. Kapilárky naplněné krví /několik mm pod horní

okraj/ se postaví do speciálního kovového stojanu se dvěma deskami skloněnými pod úhlem 45 ^{o} /obr. 6/. Utěsnění kapilárek zajišťuje modelovací hmota natlačená do podélného žlábku stojánku. Hodnoty poklesu erytrocytů jsou odečítány po 20 a 40 minutách /tyto časové limity odpovídají stanovení rychlosti sedimentace erytrocytů v kolmé poloze po 2 a 4 hodinách/. Hodnota sedimentační rychlosti erytrocytů je zjišťována pomocí hematokritového měřiče. Na tomto měřiči je odečítán sloupec erytrocytů v % z celého sloupce krve a hodnota vlastní sedimentační rychlosti erytrocytů v daném časovém limitu je pak rozdílem mezi 100 % a procentem sloupce krvinek. Pro zjednodušení práce se doporučuje v časovém limitu 20 minut neprovádět měření rychlosti sedimentace, pouze tenkou tužkou na sklo označit na kapilárce hladinu poklesu erytrocytů. Změření rychlosti sedimentace erytrocytů na hematokritovém měřiči se provede za oba doporučené časové limity po 40 minutách. Stanovení sedimentační rychlosti erytrocytů je nutno zahájit do 6 hodin po odběru a uložení heparinizované krve při teplotě do 4 ^{o}C.



Obr. 6: Stojánek na kapilárky pro stanovení sedimentační rychlosti erytrocytů metodou mikrosedimentace v šikmé poloze /podle MUDr. B. Chalupy z Okresní transfúzní stanice Strakonice/.

V posledním období došlo k prudkému rozvoji specifických diagnostických metod. Přesto je metoda stanovení sedimentační rychlosti erytrocytů jako jedna z pomocných nespecifických diagnostických metod nadále doporučována. Je významná nejen z hlediska vlastní diagnostiky, ale především z hlediska sledování stavu a normalizace onemocnění. Předností je její

nenáročnost a rychlost. Rychlost sedimentace erytrocytů u kaprů při použití výše doporučované metody je po 20 minutách 10 - 14 % poklesu, po 40 minutách 20 - 24 % poklesu, u pstruhů duhových po 20 minutách 10 - 13 %, po 40 minutách 18 - 21 % poklesu.

4. Stanovení ukazatelů bílého krevního obrazu

4.1 Počet leukocytů /Leuko/

Stanovení počtu leukocytů u ryb se provádí v heparinizované krvi ředěné roztokem podle Procházky a Škrobáka v poměru 1 : 200. Roztok podle Procházky a Škrobáka má následující složení:

chlorid sodný NaCl	3,88 g
síran sodný Na_2SO_4	2,50 g
dodekahydrát monohydrofosforečňanu sodného $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	2,91 g
dihydrofosforečnan draselný KH_2PO_4	0,25 g
formaldehyd 37 %	7,5 ml
brilantkresilová modř	0,10 g
destilovaná voda	ad 1 000 ml.

K vlastnímu stanovení nelze použít čerstvě připravený roztok, ale roztok cca 2 týdny odstátý, který je nutno před použitím přefiltrovat.

K ředění krve se používá tzv. baničkové metody podle Bürkera. Ředění se provádí ve speciálních skleněných baničkách nebo v penicilinových lahvičkách o objemu 15 - 25 ml, do kterých se nejprve dá speciální pipetou 4 975 µl roztoku podle Procházky a Škrobáka a potom vyplachovací mikropipetou 25 µl heparinizované krve. Mikropipeta se opětovným nasáním roztoku několikrát propláchne, banička se uzavře gumovou zátkou a její obsah se promíchává krouživým pohybem 2 - 3 minuty. Kapátkem nebo Pasteurovou pipetou se naplní počítací Bürkerova komůrka naředěnou krví. Leukocyty se počítají ve 100 velkých čtvercích. Zpravidla se počítá při 200násobném zvětšení. Při počítání se postupuje tak, že se počítají všechny leukocyty, které jsou uvnitř čtverců, aniž se dotýkají některé z jejich stran. Z leukocytů, které se dotýkají stran se

počítají jen ty, které se dotýkají pravé a horní strany buď uvnitř nebo vně /obr. 4/. Celkové napočítané množství leukocytů ve 100 velkých čtvercích je počet leukocytů udávaný v $G.l^{-1}$ /G-giga = 10^9/. Stanovení počtu leukocytů je možno provádět ještě i po 24 hodinovém uložení heparinizované krve při teplotě do 4 °C.

Počet leukocytů u ryb je důležitým diagnostickým ukazatelem zejména při infekčních onemocněních. Variační rozpětí fyziologických hodnot je velmi široké, u kapra se pohybuje v rozmezí 10 - 80 $G.l^{-1}$ a u pstruha duhového v rozmezí 10 - 60 $G.l^{-1}$.

4.2 Leukokritová hodnota /Lk, BC/

Leukokritová hodnota vyjadřuje objem leukocytů k celkovému objemu krve. Stanovení leukokritové hodnoty se provádí v heparinizovaných mikrokapilárách současně se stanovením hematokritu. S úspěchem se osvědčily heparinizované mikrokapilárky dovezené z Polska. Mikrokapilárky vyráběné u nás mají větší sílu skla a větší vnitřní průměr a pro stanovení leukokritu jsou nevhodné. Leukokritová hodnota je stanovována jako podíl šedobílé vrstvy leukocytů z celého krevního sloupce. Výška vrstvy leukocytů se měří pod mikroskopem s použitím okulárového mikrometru při 60ti násobném zvětšení. Podobně jako stanovení hematokritu, tak i stanovení leukokritu je nutno provést do 4 hodin po odběru a uložení heparinizované krve při teplotě do 4 °C.

Metodika stanovení leukokritové hodnoty byla zatím rozpracována pouze u kaprů, u kterých byl zjištěn statisticky vysoce významný vztah mezi počtem leukocytů a leukokritovou hodnotou /r = 0,91, r = 0,93/. Fyziologické hodnoty leukokritu u kaprů se pohybují v rozmezí 0,002 - 0,01 $l.l^{-1}$. Metoda stanovení leukokritové hodnoty je velmi jednoduchá, rychlá, není zatížena subjektivní chybou a je vhodná pro sériová vyšetření. Při posuzování leukocytární složky krve pomocí leukokritové hodnoty je vhodné, aby tato hodnota byla doplněna diferenciálním rozpočtem leukocytů /leukogramem/.

4.3 Diferenciální rozpočet leukocytů /leukogram/

Leukocyty se rozdělují na agranulocyty a granulocyty. Základním rozlišovacím znakem je absence nebo přítomnost různě se barvících granul v cytoplazmě těchto buněk. Mezi agranulocyty patří lymfocyty a monocyty, jejichž cytoplazma neobsahuje žádnou granulaci, vyjma ojedinělých azurových zrn, jež se mohou vyskytovat u části těchto leukocytů. Do skupiny granulocytů patří leukocyty, v jejichž cytoplazmě se vyskytuje zpravidla značné množství jemných nebo hrubších granul, která se vzájemně rozlišují barvitelností, tj. schopností přijímat buď bazická, kyselá nebo obojí barviva. Podle barvitelnosti těchto granulí se rozlišují granulocyty na bazofilní, eozinofilní a neutrofilní. Kromě cytoplazmy je dalším diferenciačním znakem jádro těchto buněk. Základním rozlišovacím znakem je tvar jádra, jeho velikost a vnitřní struktura. Velká a celistvá jádra jsou typická pro agranulocyty, jádra granulocytů jsou všeobecně menší, mají zpravidla protáhlý tvar a nejednou jsou členěna na úseky, segmenty spojené tenkým proužkem jaderného chromatinu. Z hlediska vnitřní struktury a hutnosti jádra jsou na prvém místě lymfocyty, které obsahují hustou, jemnou síť jaderné hmoty, jádra jsou kompaktní a hutná, čemuž odpovídá i silný stupeň modrofialového bazického odstínu. Naproti tomu jádra granulocytů se zpravidla vyznačují slabším bazickým odstínem.

Vztáhneme-li shora uvedené diferenciační znaky cytoplazmatické, jádrové, velikostní i strukturální na poměry v krvi ryb, můžeme charakterizovat většinu leukocytů ryb následujícími parametry:

Lymfocyty

Jádro je kulovité, hutné, sytě bazofilní, cytoplazma blankytně modrá, bez granulí nebo s ojedinělými azurovými zrny obepíná buď zčásti nebo celé jádro jako souvislý lem někdy tvořící výběžky nebo nahloučení cytoplazmy na některé části obvodu jádra. Lymfocyty dělíme na malé /cca 90 % všech lymfocytů/ a velké s velkými zpravidla lehce řidšími jádry a velkým souvislým cytoplazmatickým lemem. Prekurzory lymfocytů jsou lymfoblasty /velké výrazné bazofilní jádro s jadérkem a bazofilní cytoplazma/. Velikost lymfocytů se pohybuje mezi 7 až 9 µ. Jádro

je vždy poměrně velké, často obstoupené jenom úzkým lemem cytoplazmy. Vyznačuje se zpravidla výraznou bazofilií a bohatým obsahem chromatinu stočeného v karyoplazmě v hustou spleť vláken a uzlů způsobujících, že struktura jádra je zjevně hrudkovitá, pachychromatická. U části lymfocytů cytoplazmatický obal zcela chybí, takové lymfocyty označujeme jako nahojaderné /zpravidla část malých lymfocytů/. Počet lymfocytů kolísá u kapra mezi 76 až 97,5 % všech leukocytů. Z celkového počtu lymfocytů bylo např. u plůdku kapra zjištěno v průměru 86 % malých lymfocytů a 6 % velkých lymfocytů.

Lymfocytární vývojová řada

Kmenovými buňkami této řady jsou lymfoblasty. Jsou to poměrně velké lymfocyty o průměru 10 až 15 µ, okrouhlého tvaru. Velké je zejména jádro se zřetelnými hrudkami chromatinu a zřetelnými jadérky. Cytoplazma je bazofilní a má vláknitou strukturu bez jakýchkoli zrn. Prolymfocyty mají již jadérka v optickém mikroskopu neviditelná. Cytoplazma nabývá charakteristického lymfocytového vzhledu a často tvoří jenom úzký lem okolo jádra. Celá buňka se zmenšuje, přičemž zhutnění karyoplazmy i cytoplazmy je shodné.

Monocyty

Velikostí 15 až 18 µ a vzácně i více se řadí monocyty mezi největší buněčné elementy krve ryb. Jsou nejčastěji kulovitého až oválného tvaru. Jádro, jehož chromatinová struktura je obvykle řidší než u lymfocytů, je utvářeno ve formě sítě s výraznými uzly a bývá umístěno excentricky. Cytoplazma je břidlicově šedé barvy, často vakuolizovaná s nepravidelnými okraji. Její množství je zpravidla vyšší než u lymfocytů. Vyskytují se v ní často jemná azurofilní zrna nafialovělé barvy, která jsou rozptýlená po buňce. Procentické zastoupení monocytů např. v leukogramu kapra se pohybuje mezi 3 až 5 %. Přesto, že tyto buňky jsou poměrně značně tvarově variabilní, jejich spolehlivé rozpoznání nečiní ani začátečníku žádné zvláštní potíže. Zmíněná tvarová variabilita monocytů bezpochyby souvisí s jejich funkčními vlastnostmi, tj. pohyblivostí a makrofagií, specializovanou na intracelulární trávení hrubších

částic cizorodé hmoty a odstraňování vysokomolekulárních koloidních částic z krevního oběhu. Monocyty jsou schopny pohlcovat přestárlé nebo alterované erytrocyty a rozkládat jejich uvolněný hemoglobin na bilirubin. Významný podíl mají také na syntéze lipidů, proteinů a v neposlední řadě na tvorbě protilátek. Nověji se vyskytly i názory, že funkci monocytů přebírají v krvi ryb buňky retikulární.

Monocytární vývojová řada

Mateřskou buňkou této řady je monoblast, dosahující velikosti 14 až 18 µ a mající jádro s vláknitou strukturou. Cytoplazma, jíž je poměrně málo, je výrazně bazofilní. Vyzráváním monoblastu vzniká promocyt. Je větší a měří již kolem 20 µ. Jádro nabývá tvaru ledvinovitého a má jemně vláknitou strukturu chromatinu. V šedomodré cytoplazmě se objevují jemná azurofilní zrna, jemnější než u lymfocytů. Jejich typická lokalizace je v místech, kde se na jádru nachází prohlubeň. Obrysy cytoplazmy jsou neostré a nepravidelné jako u většiny monocytů.

Neutrofilní granulocyty

Do této buněčné kategorie zařazujeme celou řadu vývojových stadií těchto buněk. Jejich společným znakem je přítomnost různého množství granul, která buď zcela nebo jenom částečně a na různém stupni denzity vyplňují cytoplazmatický prostor kolem jádra, jehož tvarové uspořádání odpovídá vývojovému stupni těchto leukocytů. Tak neutrofilní granulocyty s jádrem okrouhlým, zpravidla mírně excentricky uloženým označujeme jako neutrofilní myelocyty, s jádrem ledvinovitého tvaru jako neutrofilní metamyelocyty, s jádrem pentlicovitého tvaru jako neutrofilní granulocyty, s tyčkovitým jádrem neutrofilní tyčky a konečně s jádrem členěným do dvou a více segmentů jako neutrofilní granulocyty se segmentovaným jádrem /neutrofilní segmenty/. Velikost neutrofilních granulocytů kolísá mezi 5 až 10 µ a jejich procentické zastoupení mezi leukocyty kolísá u ryb v rozmezí od 2 do 10 %. Jejich zmnožení je zpravidla v úzké souvislosti s reakcí krvetvorby ryb na různé patogény.

Eozinofilní granulocyty

Jsou to buňky, jejichž velikostní distribuce se pohybuje od 8 do 12 µ, velikostně jsou stabilnější než předešlé granulocyty. Jejich tvar je většinou okrouhlý, jádro řidší a méně barvitelné, zpravidla nevýrazně bazofilní, cytoplazma je většinou acidofilní, barví se slabě růžově, ale zpravidla není v optickém mikroskopu téměř vůbec vidět, neboť je přikryta velkým množstvím hrubých kulovitých eozinofilních, tedy cihlově červeně se barvících granul, která nejednou překrývají i části málo segmentovaného /2 seg./ jádra. Tato granula spolu s chudým a excentricky vytlačeným jádrem jsou charakteristickým znakem této buněčné kategorie a pro výrazné barevné odlišení správné zatřídění těchto buněk nedělá ani začátečníkům žádné problémy. Procentické zastoupení eozinofilních granulocytů kolísá v krvi ryb od 0 do 1 %. Tyto leukocyty mají v krvi ryb významnou detoxikační funkci nepochybně vlivem svých granul, jež obsahují histamin. Tato funkce objasňuje do jisté míry jejich zvýšenou přítomnost při různých alergických procesech, provázených zvýšenou tvorbou histaminu.

Bazofilní granulocyty

Jsou poslední buněčnou kategorií granulocytární řady. Mají zpravidla okrouhlý tvar, dosahují velikosti kolem 10 µ. Bazofilní řídké excentricky uložené jádro i cytoplazma jsou zčásti nebo zcela překryty četnými, poměrně nestejně velkými granuly purpurové až modročerné barvy. Jejich procentické zastoupení v krvi ryb se pohybuje od 0 do 0,5 %. Obsahují histamin a hrají jistou úlohu při alergických procesech, o jejich bližší funkci není dosud mnoho známo.

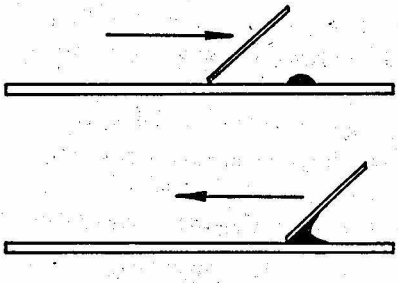
Granulocytární řada

Kmenovou buňkou této řady je myeloblast. Dosahuje velikosti od 8 do 14 µ, většinu buňky vyplňuje kruhovité jádro s jemnou a hustě síťovitou strukturou. Cytoplazma, zatím ještě bez granul, tvoří zpravidla souvislý úzký lem kolem jádra a je silně bazofilní. Dalším vývojovým stupněm je promyelocyt a myelocyt lišící se od svého prekurzoru jednak nápadnou velikostí /25 až 28 µ/, hrubší strukturou jádra, velkým lemem cytoplazmy a zejména přítomností granul. Cytoplazma je stále ještě výrazně

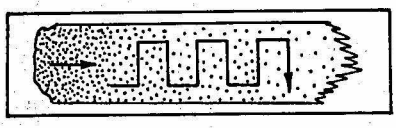
bazofilní, ale u myelocytů již se projasňuje zonami acidofilního charakteru. Tato acidofilie cytoplazmy se zpravidla šíří z perinukleárních okrsků do periferie buňky, proto nevyzrálý myelocyt má periferní část cytoplazmy ještě bazofilní. Dalším projevem zrání myelocytů je postupné zmenšování, hutnění jádra, které zaujímá postupně excentrickou polohu v buňce. Postupným vyzráváním myelocytů vznikají metamyelocyty, "tyčky" a "segmenty".

Technický postup při stanovení leukogramu krve ryb je následující: základem je zhotovení krevního nátěru, který je připravován z nativní krve bezprostředně po jejím náběru. Vlastní krevní nátěr se provádí tak, že kapka krve velikosti barevné špendlíkové hlavičky se přenese na jeden okraj suchého, čistého a odmaštěného podložního sklíčka pomocí skleněné tyčinky. Druhé, roztěrové sklíčko, se položí do 45° úhlu před kapku krve tak, že se po dotyku s kapkou krev rozlije po celé délce hrany přiloženého roztěrového sklíčka. Takto přiloženým sklíčkem se zhotoví nátěr rovnoměrným a lehkým pohybem směrem k opačnému konci podložního sklíčka /obr. 7/. Síla /denzita/ krevního nátěru se řídí rychlostí tohoto úkonu. Pro účely stanovení leukogramu je potřeba připravit krevní nátěr nízké denzity, který po zaschnutí ve velké ploše opaleskuje /"zlatá zóna"/. Takový krevní nátěr se připraví pomalým souvislým roztažením krevní kapky na podložním sklíčku. Zhotovený krevní nátěr musí mít rovné okraje a přecházet do "ztracena" alespoň 1 - 2 cm před druhým koncem podložního sklíčka, přičem utvoří obvykle několik cípů. K rozetření nátěru se má vždy použít nejméně o 6 mm užší sklíčko než je podložní, aby měl zhotovený krevní nátěr ostré okraje a nedosahoval krajů podložního sklíčka /obr. 8/.

Použité roztěrové sklíčko musí mít rovné, zabroušené hrany, aby se v nátěru nevytvořily nerovnoměrné plochy a rýhy a aby nedošlo k poškození krvinek. Jako roztěrového sklíčka lze použít zabroušené krycí sklíčko počítací Bürkerovy komůrky. Podložní sklíčka pro zhotovení krevních nátěrů musí být před použitím nejprve omyta mýdlovou vodou a po opláchnutí uložena na 24 hodin do chromsírové lázně /příprava - dvojchroman



Obr. 7: Zhotovení krevního nátěru



Obr. 8: Schéma správného krevního nátěru a způsob jeho prohlížení

draselný se rozpustí do nasycení v kyselině sírové/. Z ní se podložní sklíčka vyjmou kleštěmi a po opláchnutí pod tekoucí vodou se přenesou do alkoholové lázně /benzinový alkohol/ po dobu minimálně 12 hodin. Z této lázně se vyjmou a osuší čistou sepranou utěrkou. Při tomto čištění již uchopíme podložní sklíčka jenom za jejich hrany a po individuálním osušení je ukládáme do jejich původní krabice, jejíž dno i krátké okraje vysteleme pásem čisté gázy. Tímto balením jsou podložní sklíčka označena jako "hematologicky použitelná".

Zhotovené krevní nátěry se po zaschnutí na vzduchu označí obyčejnou tužkou, a to přímo do krevního nátěru na jeho pravé a zpravidla denzitnější straně. Před znečištěním se chrání zakrytím filtračním papírem. Barvení krevních nátěrů krve ryb je nutno na rozdíl od krve savců provádět s ohledem na značně aktivní povrch buněk co nejdříve po zhotovení, alespoň do čtyř hodin. Pro panoptické barvení krevních nátěrů se za účelem stanovení leukogramu používá Pappenheimova barvící metoda, jejíž postup je následující: krevní nátěr se nejprve převrství cca 30 kapkami May-Grünwaldova barviva. Toto barvivo se nanáší zásadně čistou a suchou pipetou, užívanou jenom pro tyto účely. Barvivo se nechá působit 3 min. /v této fázi dochází jen k fixaci buněk absolutním alkoholem

barvicí směsi/. Po 3 minutách se nakape na May-Grünwaldovo barvivo cca 25 kapek neutrální destilované vody /pH musí být přesně 7/, která se za vzniku vírů smísí s alkoholem směsi a tím se vytvoří vodný roztok, který má vlastní barvící schopnost. Doba této barvící fáze je 2 minuty. Poté se barvící roztok z nátěrů slije a ještě mokrý nátěr se rychle převrství připraveným vodným roztokem barviva Giemsa-Romanowski v ředění 1 : 40 /1 díl barviva + 40 dílů neutrální destilované vody/. Doba této fáze barvení /nyní se barví především jádra buněk/ je 20 až 30 minut. Po 20 minutách se jeden libovolný nátěr slije, opláchne proudem vody a za mokra zkontroluje barvící efekt pod mikroskopem při malém zvětšení. Je-li cytoplazma buněk růžová a jádra modrá, je barvení skončeno. Všechny ostatní nátěry se slijí, důkladně opláchnou pod proudem vody a nechají zaschnout v kolmé nebo šikmé poloze na vzduchu /nutno chránit před prachem/. Po zaschnutí panopticky obarvených krevních nátěrů se provádí jejich mikroskopická analýza. Prohlíží se v olejové imerzi při zvětšení nejlépe 1 000 až 1 500krát při silnějším osvětlení. Nejprve je nutno posoudit celkový charakter buněk jak červené tak bílé řady, včetně destiček, tj. jejich velikost, barvitelnost, případné příměsi jako parazité, buněčný rozpad a další. Poté se přistoupí k zhotovení leukogramu. Preparát se zastaví buď na horním nebo dolním okraji v rozsahu opaleskující zóny a křížovým stolkem se posouvá meandrovitým postupem pod objektiv mikroskopu /obr. 8/ a při tom se třídí nalezené leukocyty a evidují se jejich nálezy do vhodné tabulky nebo pomocí digitálního počítače. Po zatřídění 200. buňky se stanoví procentické zastoupení jednotlivých druhů leukocytů. Disponujeme-li i přesnými údaji o celkovém počtu leukocytů, můžeme pomocí údajů leukogramu snadno získat cenné informace také o absolutních počtech jednotlivých druhů leukocytů.

Jako příklad jsou uvedeny průměrné hodnoty leukogramu kapra a pstruha duhového /uvedeno v %/:

	kapr obecný	pstruh duhový
lymfocyty celkem	92	93
monocyty	3	3
neutrofilní granulocyty	4	4
eozinofilní granulocyty	1	0
bazofilní granulocyty	0	0

5. Stanovení hodnot vybraných biochemických ukazatelů v krevní plazmě

Při stanovení hodnot biochemických ukazatelů v plazmě ryb je nutno dodržovat určité zásady. Veškeré používané sklo musí být řádně umyté, bez zbytků saponátů a před sušením opláchnuté destilovanou vodou. Krev pro biochemickou analýzu je nutno odebrat bezprostředně po odlovu ryby. U plůdku ryb se osvědčila metoda odběru krve kardiopunkcí, u dospělých ryb pak metoda náběru z ocasní cévy. Jako antikoagulant je nejvhodnější neředěný roztok Heparinu SPOFA inj. Odebranou krev je potřeba za chladu co nejdříve odstředit. Pokud není k dispozici chlazená odstředivka, je vhodné použít odstředivku s vyměnitelným rotorem, který lze před použitím vychladit v chladničce. Po centrifugaci nesrážlivé krve /10 min., 100 G/ a následné separaci plazmy je nutno separovou plazmu co nejdříve analyzovat, popř. krátkodobě uchovávat /do 24 hod./ před analýzou při 4 °C nebo v zamraženém stavu v mikrozkumavkách s uzávěrem /Eppendorf/.

Normální hodnoty, uváděné různými autory, se u biochemických ukazatelů v plazmě ryb dosti liší. Neshoda je způsobena především použitím různých metod stanovení, včetně metody odběru krve, dále fyziologickým stavem ryb a mnoha endogenními a exogenními faktory. Tyto vlivy jsou také příčinou vysoké variability některých ukazatelů.

5.1 Celkové bílkoviny /TP/

Pro stanovení koncentrace celkových bílkovin v plazmě ryb je možno použít dvě metody, jejichž výsledky jsou srovnatelné.

a/ Fotometrická metoda je založena na tvorbě fialově zbarvených chelátů mědi s bílkovinou v alkalickém prostředí. Při stanovení se postupuje podle návodu Bio-La-Testu CELKOVÉ BÍLKOVINY /TP/. Kromě lyofilizovaného standardu, který je obsažen v soupravě, je možno použít ke stanovení i jiné bílkovinné standardy, např. Preciset Eiweiss /Protein, výrobce Boehringer Mannheim GmbH/. Stanovení koncentrace celkových bílkovin v plazmě ryb je nutno provést v den odběru krve, plazmu nelze přechovávat do druhého dne.

b/ Refraktometrická metoda je založena na měření indexu lomu. Je vhodná zejména v případě, kdy máme k dispozici malé množství plazmy, především však při hematologickém vyšetření metodou zkráceného hematologického kondičního testu. Pro refraktometrické stanovení koncentrace celkových bílkovin v plazmě ryb se osvědčil Abbeův refraktometr. Před vlastním stanovením je nutno hranol refraktometru vytemperovat na 20 °C proudící temperovanou vodou z ultratermostatu a tuto teplotu během měření série vzorků průběžně kontrolovat. Při 20 °C ukazuje destilovaná voda hodnotu indexu lomu 1,3329. Při hematologickém vyšetření metodou zkráceného hematologického kondičního testu se postupuje prakticky tak, že po stanovení hematokritové hodnoty se přelomí mikrohematokritová kapilára v místě, kde začíná sloupec plazmy a pomocí jemné hadičky, nasazené na jeden konec vzniklého fragmentu se vyfoukne vzorek plazmy na měřící část hranolu refraktometru. Po přiložení druhé části hranolu se vyhledá a kompenzací zaostří v okuláru světelné rozhraní a na stupnici odečteme výsledek měření.

Z naměřené hodnoty indexu lomu při teplotě 20 °C se vypočítá koncentrace celkových bílkovin v $g.l^{-1}$ podle vztahu:

$$x\ (g.l^{-1}) = \left[(510 \cdot D) - 1{,}81\right] \cdot 10,$$

kde D = /index lomu plazmy - index lomu destilované vody/.

Postup výpočtu konečného výsledku lze s výhodou urychlit použitím příslušných přepočítávacích tabulek.

Koncentrace celkových bílkovin v plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 20 - 40 $g.l^{-1}$.

5.2 Glukóza

Pro stanovení koncentrace glukózy v plazmě ryb se nejčastěji používala /za využití Bio-La-Testu GLUKOSA/ fotometrická metoda, založená na reakci glukózy s o-toluidinem v kyselém prostředí za zvýšené teploty. Tyto testovací soupravy se však pro škodlivé účinky o-toluidinu přestaly vyrábět. Lachema Brno nabízí soupravu Oxochrom GLUKOSE /Glu GP/, která umožňuje stanovit koncentraci glukózy v plazmě metodou, založenou na oxidaci glukózy kyslíkem za katalýzy enzymem glukózaoxidázou na peroxid vodíku a glukonát. Vzniklý peroxid vodíku se stanovuje oxidační kopulací se substituovaným fenolem a 4-aminofenazonem katalyzovanou enzymem peroxidázou. Tato souprava nebyla dosud pro stanovení koncentrace glukózy v plazmě ryb otestována.

Koncentrace glukózy v plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 2 - 5 $mmol.l^{-1}$.

5.3 Celkové lipidy /TL/

Pro stanovení koncentrace celkových lipidů v plazmě ryb se používá fotometrická metoda, založená na reakci nenasycených lipidů a mastných kyselin, fosfolipidů a cholesterolu s fosfovanilinovým činidlem po předchozí hydrolýze kyselinou sírovou. Postupuje se podle návodu Bio-La-Testu CELKOVÉ LIPIDY /TL/ bez modifikace.

Koncentrace celkových lipidů v plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 2 - 8 $g.l^{-1}$.

5.4 Triacylglyceroly

Koncentrace triacylglycerolů v plazmě ryb se stanovuje enzymatickou metodou za použití Bio-La-Testu TRIACYLGLYCEROLY enzymaticky - TG - Enz 60. Metoda je založena na štěpení triacylglycerolů lipázami na glycerol a volné mastné kyseliny. Glycerol se převádí glycerolkinázou za přítomnosti ATP na glycerol-3-fosfát a ADP. Glycerol-3-fosfát se v přítomnosti NAD^+ a glycerol-3-fosfátdehydrogenázy mění na dihydroxyaceton-

fosfát a vzniká NADH, který redukuje INT za přítomnosti diaforázy na barevný formazan. Při stanovení koncentrace triacylglycerolů v plazmě ryb se postupuje podle návodu testu. V případě nedostupnosti enzymatického testu lze použít neenzymatickou metodu za použití Bio-La-Testu TRIGLYCERIDY /TG/, která je však časově náročnější a vyžaduje desetinásobné množství vzorku plazmy.

Koncentrace triacylglycerolů v plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 1 - 4 $mmol.l^{-1}$.

5.5 Cholesterol

Koncentrace cholesterolu v plazmě ryb se stanoví fotometrickou metodou za použití Bio-La-Testu CHOLESTEROL /Chol./. Princip metody je založen na reakci cholesterolu s činidlem, obsahujícím kyselinu 2,5-dimethylbenzensulfonovou za vzniku modrozeleného zbarvení, vhodného pro fotometrické stanovení. Stanovení se provádí podle pracovního postupu, uvedeného v testu, bez modifikace.

Koncentrace cholesterolu v plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 1,5 - 12 $mmol.l^{-1}$.

5.6 Močovina

Ke stanovení koncentrace močoviny v plazmě ryb se používá enzymatická fotometrická metoda, která využívá hydrolýzy močoviny ureázou na amoniak a oxid uhličitý. Vzniklý amoniak se stanovuje barevnou reakcí salicylanu s alkalickým roztokem chlornanu. Při stanovení koncentrace močoviny v plazmě se postupuje podle návodu Bio-La-Testu MOČOVINA enzymaticky. V případě nedostupnosti tohoto testu se může postupovat dle návodu Bio-La-Testu MOČOVINA /Urea/.

Koncentrace močoviny v plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 1 - 3 $mmol.l^{-1}$.

5.7 Amoniak

Hladina amoniaku v krevní plazmě ryb je velmi variabilní, je silně ovlivněna působením různých endogenních a exogenních faktorů. Navíc v důsledku vysoké aktivity proteolytických enzymů u ryb dochází k rychlému postmortálnímu uvolňování

amoniaku v krvi. Z těchto důvodu je nezbytně nutné při přípravě krevní plazmy k analyze dodržet následující zásady. Odběr krve od ryb je nutno provést ihned po jejich odlovení na plné vodě do zchlazených zkumavek. Odebraný vzorek krve a následně získanou krevní plazmu je nutno přechovávat při teplotě maximálně 2 - 4 °C, oddělení krevní plazmy od krevních buněk je potřeba provést do 30 minut po odběru. Vlastní analyzu je nutno provést při uložení krevní plazmy při teplotě 2 - 4 °C do 60 minut, při teplotě - 20 °C do 2 dnů.

Ke stanovení koncentrace amoniaku v plazmě ryb je možno použití enzymatický UV - monotest AMMONIAK výrobce Boehringer Mannheim a nebo BLOOD AMMONIA test firmy Hyland. Metoda UV - monotestu je založena na specifické reakci glutamátdehydrogenázy s amoniakem. Mírou reakce je úbytek NADPH, měřený změnou absorbance při vlnové délce 340 nm. Při použití testu firmy Hyland se plazmatický amoniak isoluje selektivní adsorpcí na silně kyselé katexové přiskyřici. Z pryskyřice je následně eluován a reaguje s fenolem a chlornanem sodným v přítomnosti nitroferrikyanidu sodného. Amoniak tvoří stabilní tmavě modrý indofenolový komplex, který se měří fotometricky při vlnové délce 630 nm. Zabarvení je přímo uměrné koncentraci N-amoniaku v plazmě.

Při stanovení koncentrace amoniaku v plazmě ryb metodou enzymatického UV - monotestu se postupuje podle mírně modifikovaného návodu testu. Modifikace spočívá v ředění plazmy /dle koncentrace amoniaku v plazmě, nejčastěji 5x/, v pětinásobném snížení objemu vzorku plazmy /na 0,1 ml/ i ostatních reagencií a v použití mikrokyvet k vlastnímu měření. K ředění plazmy je nutno používat redestilovanou, amoniaku prostou vodu, výsledek měření se násobí ředěním. Také při použití testu firmy Hyland se snižuje objem plazmy k analýze 4krát, tj. na 0,25 ml, popřípadě se plazma dále ředí redestilovanou vodou. Zkumavky s plazmou a všechny roztoky musí být stále dobře uzavřeny, aby nedošlo ke kontaminaci amoniakem ze vzduchu.

Koncentrace amoniaku v plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 200 - 800 $\mu mol.l^{-1}$.

5.8 Kyselina mléčná /laktát/

Koncentrace mléčné kyseliny v plazmě ryb se stanovuje pomocí enzymatického UV-monotestu LACTAT vollenenzymatisch výrobce Boehringer Mannheim. Spektrofotometrická enzymatická metoda využívá spojení reakce LDH, která katalyzuje oxidaci laktátu na pyruvát /za současné redukce NAD^+ na NADH/, s transaminační reakcí ALT. Přírůstek NADH, měřený změnou absorbance při vlnové délce 340 nm je ekvivalentní koncentraci laktátu.

Stanovení koncentrace laktátu v plazmě ryb se provádí dle návodu uvedeného v testu, plazma před vlastním stanovením se ředí redestilovanou vodou /podle koncentrace laktátu, nejčastěji 5krát/ a výsledek se násobí číslem ředění. Při práci je nutno dbát na to, aby špičky plastických míchadel a pipet, které přichází do styku se vzorkem, nebyly brány prsty, protože pot může obsahovat značné množství laktátu.

Koncentrace laktátu v plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 0,7 - 2,2 $mmol.l^{-1}$.

5.9 Aminotransferázy /AST, ALT/

Aktivita aminotransferáz v plazmě ryb se stanoví kolorimetricky. Stanovení je v obou případech založeno na reakci vznikající kyseliny pyrohroznové /v případě AST po spontánní dekarboxylaci kyseliny oxaloctové/ s 2,4-dinitrofenylhydrazinem. Žlutý 2,4-dinitrofenylhydrazon kyseliny pyrohroznové dává v alkalickém prostředí červenohnědé zbarvení, jehož intenzita je závislá na koncentraci.

Pro stanovení aktivity aminotransferáz AST a ALT v plazmě ryb se používá Bio-La-Test AMINOTRANSFERASA /AST, ALT/, jehož metoda byla mírně modifikována. Modifikace spočívá ve změně inkubační teploty - vzorky se inkubují při teplotě 25 °C, pracovní postup zůstává zachován. Stanovení aktivity AST a ALT v plazmě ryb je nutno provést v den odběru krve, plazmu nelze přechovávat do druhého dne.

Aktivita aminotransferáz AST a ALT se v plazmě kapra pohybuje v rozsahu 0,25 - 3,50 $\mu kat.l^{-1}$ u AST a 0,05 - 0,32 $\mu kat.l^{-1}$ u ALT.

Lachema Brno připravuje nový test na stanovení katalytické aktivity aminotransferázy AST a ALT v plazmě v UV - oblasti. Z předběžného orientačního srovnání výsledků vyplynulo, že aktivita AST u ryb stanovená nově připravovaným testem je zhruba 3 - 4krát vyšší ve srovnání s hodnotami získanými při použití dosavadního testu. Výsledky aktivity ALT získané oběma testy jsou srovnatelné.

5.10 Laktátdehydrogenáza /LDH/

Pro stanovení aktivity laktátdehydrogenázy v plazmě ryb se používá UV-monotest LDH optimierte standard methode výrobce Boehringer Mannheim. Spektrofotometrická metoda testu je založena na měření úbytku koenzymu NADH podle jeho absorbance při 340 nm.

Při stanovení aktivity laktátdehydrogenázy v plazmě ryb se postupuje podle návodu testu, plazmu ryb je však nutno ředit redestilovanou vodou /5x i více/ a výsledek násobit číslem ředění. Plazma s vysokou aktivitou LDH může ukázat zdánlivě nízkou aktivitu, protože NADH může být z největší části spotřebován ještě před měřením. Pro vlastní měření se použijí kyvety o větším objemu /4 ml/.

Aktivita laktátdehydrogenázy v plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 2,25 - 4,50 μkat.l^{-1}.

5.11 Glutamátdehydrogenáza /GDH/

Aktivita GDH v plazmě ryb je stanovována spektrofotometrickou metodou, která je založena na určení úbytku NADH, měřeného podle změny absorbance při vlnové délce 340 nm. Pro stanovení se používá UV-monotest GLDH aktiviert výrobce Boehringer Mannheim.

Při stanovení aktivity GDH v plazmě ryb se postupuje podle návodu testu s mírnou modifikací, která spočívá v ředění plazmy redestilovanou vodou /nejčastěji 5x/, v pětinásobném snížené objemu vzorku plazmy /na 0,1 ml/ a reakční směsi /na 0,5 ml/ a v použití mikrokyvet k měření. Výsledek měření se násobí číslem ředění.

Aktivita glutamátdehydrogenázy v plazmě kapra se pohybuje v rozsahu 0,35 - 0,75 μkat.l^{-1}.

5.12 Methemoglobin /MetHb/

Pro stanovení relativního obsahu methemoglobinu v krvi ryb je používána metoda, která využívá absorpčního maxima methemoglobinu při vlnové délce 633 nm. Přídavkem kyanidu se methemoglobin přemění v kyanmethemoglobin, který v této oblasti nemá charakteristickou absorpci, takže pokles absorbance při 633 nm je úměrný koncentraci methemoglobinu.

Při stanovení obsahu methemoglobinu se postupuje následovně: k 2,5 ml destilované vody v centrifugační zkumavce se přidá 5 kapek rybí krve, promíchá a nechá se hemolyzovat minimálně 15 minut. Po provedené hemolýze může zůstat vzorek i několik hodin, proto je možno provést odběr krve a hemolýzu rovněž v terénu a ostatní stanovení následně v laboratoři. K hemolyzátu se přidá 1,5 ml roztoku saponinu, promíchá a odstředí /10 min., 3 000 G/. Absorbance supernatantu E se měří v 1 cm kyvetě proti vodě při 633 nm. Přidá se 1 kapka KCN /kapátkem/ a po 1 min. se změří absorbance A_1. Dále se přidá 1 kapka ferrikyanidu draselného a po 1 min. se změří absorbance A_2. Kyveta se vypláchne a naplní původním roztokem hemolyzátu se saponinem. Do tohoto roztoku se přidá 1 kapka roztoku ferrikyanidu draselného /hemolyzát + ferrikyanid draselný = methemoglobin/ a po 1 min. se změří absorbance A_3.

Relativní obsah methemoglobinu v % se vypočte podle vztahu:

$$\% \text{ MetHb} = \frac{E - A_1}{A_3 - A_2} \cdot 100$$

Pracovní roztoky:

1. Fosfátový pufr M/15 /9,0 g $Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$ + 5,7 g KH_2PO_4 rozpustit a doplnit do 1 000 ml/, pH 6,6 /upravit H_3PO_4 nebo NaOH/
2. 1 % saponin ve fosfátovém pufru - připravuje se vždy čerstvý.
3. 1 % vodný roztok kyanidu draselného. Pozor, prudký jed!
4. 5 % vodný roztok ferrikyanidu draselného.

Metoda byla modifikována podle metody Holeček V. a kol.: Prakt. Lék. 42: 1962, s. 847.

Při stanovení methemoglobinu v krvi ryb se stanovuje rovněž koncentrace hemoglobinu a relativní obsah methemoglobinu se přepočítává na % obsahu methemoglobinu z celkového hemoglobinu. Obsah methemoglobinu v krvi ryb závisí značně na koncentraci dusitanů ve vodě. Při vyšších koncentracích dusitanů ve vodě může obsah methemoglobinu představovat až 80 % z celkového obsahu hemoglobinu.

6. Zkrácený hematologický kondiční test /ZHKT/ ryb a jeho provedení

Podstatou ZHKT jsou exaktně stanovené údaje o vybraných základních hematologických ukazatelích, tj. množství hemoglobinu /Hb/, hematokritová a leukokritová hodnota krve /Hk, PVC, Lk/, střední barevná koncentrace /MCHC/ a celkové množství plazmatických proteinů /TP/. Tyto ukazatele vzájemně kladně korelují a jejich vyhodnocením lze získat objektivní obraz o hlavních metabolických faktorech a tím i funkčních vlastnostech vyšetřované ryby. Vlastní pracovní postup při stanovení shora uvedených hematologických ukazatelů je popsán v příslušných předcházejících kapitolách. Správná interpretace výsledků ZHKT je do značné míry závislá i na komplexu organizačních, souhrnně metodických a výše uvedených standardizačních podmínek, které je třeba při tomto typu hematologických šetření ryb plně respektovat. Při náběru krve a stabilizaci krevního vzorku, jakož i po odstředění mikrohematokritových kapilár je nutno si také pečlivě všímat případných vizuálních abnormit v zabarvení krevního vzorku /anemie/, jeho viskozitě /hydremie/, nápadně zrychlené hemostáze, jakož i změn v odstínu krevní plazmy po odstředění, zvláště případné hemolýzy a jejího stupně /+ až +++/. Současně s tímto hematologickým vyšetřením se provádí také potřebná biometrická stanovení u ryb a poté i obvyklá veterinární prohlídka včetně pitvy a parazitologického šetření.

7. Přílohy

7.1 Mezinárodní soustava jednotek SI v ichtyohematologii na příkladu normálních hodnot v krvi a v krevní plazmě /pl./ kapra

Hematologický ukazatel	variační rozpětí	SI jednotky
Aminotransferáza /AST/-pl.	0,25 - 3,50	$\mu kat.l^{-1}$
Aminotransferáza /ALT/-pl.	0,05 - 0,32	$\mu kat.l^{-1}$
Amoniak - pl.	200 - 800	$\mu mol.l^{-1}$
Bílkoviny celkové /TP/-pl.	20 - 40	$g.l^{-1}$
Erytrocyty /Er, RBC/	1,1 - 1,8	$T.l^{-1}$
Glukóza - pl.	2 - 5	$mmol.l^{-1}$
Glutamátdehydrogenáza /GDH/-pl.	0,35 - 0,75	$\mu kat.l^{-1}$
Hematokritová hodnota /Hk,PCV/	0,28 - 0,40	$l.l^{-1}$
Hemoglobin /Hb/	60 - 100	$g.l^{-1}$
Hemoglobin erytrocytu /MCH/	50 - 60	pg
Cholesterol - pl.	1,5 - 12	$mmol.l^{-1}$
Kyselina mléčná /laktát/ - pl.	0,7 - 2,2	$mmol.l^{-1}$
Laktátdehydrogenáza /LDH/- pl.	2,25 - 4,50	$\mu kat.l^{-1}$
Leukocyty /Leuko/	10 - 80	$G.l^{-1}$
Leukogram:		
- lymfocyty	76 - 97,5	%
- monocyty	3 - 5	%
- neutrofilní granulocyty	2 - 10	%
- eozinofilní granulocyty	0 - 1	%
- bazofilní granulocyty	0 - 0,5	%
Leukokritová hodnota /Lk, BC/	0,002- 0,01	$l.l^{-1}$
Lipidy celkové /T_L/ - pl.	2 - 8	$g.l^{-1}$
Močovina - pl.	1 - 3	$mmol.l^{-1}$
Střední objem erytrocytu /MCV/	200 - 300	fl
Střední barevná koncentrace /MCHC/	0,20 - 0,26	$l.l^{-1}$
Triacylglyceroly - pl.	1 - 4	$mmol.l^{-1}$

7.2 Přepočtové faktory starého a nového vyjádření ichtyohematologických hodnot

Hematologický ukazatel	Staré vyjádření	Přepočtový faktor	Nové vyjádření
Aminotransferáza /AST/	$U.l^{-1}$	0,0167	$\mu kat.l^{-1}$
Aminotransferáza /ALT/	$U.l^{-1}$	0,0167	$\mu kat.l^{-1}$
Amoniak	mg%	587	$\mu mol.l^{-1}$
Bílkoviny celkové /TP/	g%	10	$g.l^{-1}$
Erytrocyty /Er, RBC/	mil. v mm^3	1	$T.l^{-1}$
Glukóza	mg%	0,0556	$mmol.l^{-1}$
Glutamátdehydrogenáza /GDH/	$U.l^{-1}$	0,0167	$\mu kat.l^{-1}$
Hematokritová hodnota /Hk, PCV/	%	0,01	$l.l^{-1}$
Hemoglobin	g%	10	$g.l^{-1}$
Hemoglobin erytrocytu /MCH/	pg	-	pg
Cholesterol	mg%	0,0258	$mmol.l^{-1}$
Kyselina mléčná /laktát/	mg%	0,111	$mmol.l^{-1}$
Laktátdehydrogenáza /LDH/	$U.l^{-1}$	0,0167	$\mu kat.l^{-1}$
Leukocyty /Leuko/	tis. v mm^3	0,001	$G.l^{-1}$
Leukogram:			
- lymfocyty	%	-	%
- monocyty	%	-	%
- neutrofilní granulocyty	%	-	%
- eozinofilní granulocyty	%	-	%
- bazofilní granulocyty	%	-	%
Leukokritová hodnota /Lk, BC/	%	0,01	$l.l^{-1}$
Lipidy celkové /TL/	mg%	0,01	$g.l^{-1}$
Močovina	mg%	0,167	$mmol.l^{-1}$
Střední objem erytrocytu /MCV/	μm^3	1	fl
Střední barevná koncentrace /MCHC/	%	0,01	$l.l^{-1}$
Triacylglyceroly	mg%	0,0113	$mmol.l^{-1}$

Adresa autorů:

MVDr. Zdeňka Svobodová, CSc., Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, 389 25 Vodňany

Doc. MVDr. Drahoslav Pravda, CSc., RNDr. Jana Paláčková, Vysoká škola zemědělská, katedra rybářství a ochrany vod, Zemědělská 1, 662 65 Brno

Lektoroval:

MVDr. Juraj Příhoda, CSc., Slovenský rybársky zväz, Žilina

JIHOČESKÉ UNIVERZITY V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
AKADEMICKÁ KNIHOVNA
6

V edici Metodik vydal Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech — Redakce: R. Berka — Náklad: 800 výtisků — Povolení k tisku: JČKNV, odb. kultury, čj. 4273/85 — Tisk: Jihočeské tiskárny, n. p., provoz 8 Strakonice — Předáno do tisku: květen 1986