

VÝZKUMNÝ ÚSTAV RYBÁŘSKÝ A HYDROBIOLOGICKÝ  
VODŇANY

**DIAGNOSTIKA A PREVENCE  
INFEKČNÍ NEKRÓZY PANKREATU  
LOSOSOVITÝCH RYB**

EDICE

METODIK



47

VÝZKUMNÝ ÚSTAV RYBÁŘSKÝ A HYDROBIOLOGICKÝ  
JIHOČESKÉ UNIVERZITY SE SÍDLEM VE VODŇANECH

Z. POSPÍŠIL, J. TOMÁNEK a kol.

DIAGNOSTIKA A PREVENCE  
INFEKČNÍ NEKRÓZY PANKREATU  
LOSOSOVITÝCH RYB

2. přepracované vydání

č. 47

Vodňany

1996

ISBN 80-85887-07-X

# O b s a h :

	<i>strana</i>
1. Úvod .....	3
2. Vnímavost k infekci .....	3
3. Etiologie .....	4
4. Vznik onemocnění a jeho průběh .....	4
5. Klinické příznaky a patologické změny .....	5
6. Laboratorní diagnostika IPN .....	7
6.1 Odběr vzorků .....	7
6.2 Zpracování vzorků .....	7
6.3 Buněčné kultury .....	7
6.4 Identifikace viru .....	8
6.4.1 ELISA test .....	8
6.4.2 Imunofluorescenční test .....	8
6.4.3 Neutralizační test .....	8
6.4.4 Elektronová mikroskopie .....	9
7. Stanovení diagnózy a diferenciální diagnostika .....	9
7.1 Hydrochemické příčiny .....	9
7.2 Otravy .....	9
7.3 Alimentární příčiny intoxikace .....	9
7.4 Parazitární onemocnění .....	10
7.5 Bakteriální onemocnění .....	10
7.6 Virová onemocnění .....	11
8. Léčba IPN .....	11
9. Opatření při výskytu .....	11
10. Podmínky ke zdoání nákazy .....	12
11. Prevence .....	12
12. Dezinfekce .....	13

## 1. Úvod

Infekční nekróza pankreatu (IPN) je akutní, vysoce kontagiózní onemocnění, vyskytující se především u mladých lososovitých ryb odchovávaných ve vysokých koncentracích. Poprvé bylo toto onemocnění popsáno v 50. letech u sivena amerického v USA. Po zavedení buněčných kultur i do studia infekčních onemocnění ryb se podařilo prokázat virovou podstatu onemocnění. Infekční nekróza pankreatu byla později diagnostikována v dalších zemích. U nás bylo toto onemocnění poprvé exaktně prokázáno izolací viru IPN v roce 1983.

Diagnostika onemocnění je založena na zhodnocení klinických a patomorfologických příznaků u nemocných ryb, především však na laboratorním potvrzení výskytu viru IPN. To spočívá v přímé izolaci viru na vnímavých rybích buněčných kulturách a jeho identifikaci.

Na vypracování metod diagnostiky a prevence infekční nekrózy pankreatu se pod koordinací Prof. MVDr. Z. Pospíšila, DrSc. (VFU Brno) a MVDr. J. Tománka, CSc. podíleli MVDr. J. Zajiček (OVS Č. Budějovice), Ing. T. Veselý, CSc., MVDr. M. Hornich, CSc., MVDr. L. Rodák, DrSc., MVDr. L. Valíček, DrSc. a MVDr. T. Obr (všichni VÚVEL Brno).

## 2. Vnímavost k infekci

Virus infekční nekrózy pankreatu vyvolává typické příznaky onemocnění především u lososovitých ryb. V našem zeměpisném pásmu z nich přichází v úvahu zejména pstruh duhový, pstruh obecný, siven americký, siven alpský a další lososovité ryby. U nás byl virus IPN doposud izolován ze pstruha duhového a sivena amerického z umělého chovu a u pstruha obecného a lipana podhorního z volných vod. Jiné druhy ryb a případně i měkkýši mohou být k infekci virem IPN rovněž vnímavé, ke klinickému onemocnění u nich však nedochází. Protože u některých (např. u kapra) bylo zjištěno, že se u nich může virus i pomnožovat, mohou být tyto ryby závažným přenašečem nebo rezervoárem infekce.

Věk hostitele je zvláště u IPN jedním z rozhodujících faktorů pro vznik onemocnění. Nejvnímavější k viru IPN jsou lososovité ryby nejmladší věkové kategorie. S narůstajícím věkem vnímavost k viru IPN postupně klesá, takže po dosažení 5-6 měsíců jsou lososovité ryby k této infekci natolik rezistentní, že klinicky ne onemocní. Starší ryby mohou být sice infikovány, ale klinická forma onemocnění se u nich nevyvine ani po intraperitoneální aplikaci viru.

Dospělé ryby, které infekci prodělaly, nebo přijdou až v pozdějším věku do styku s virem, zůstávají většinou vironosiči až do konce života. Vironosičství dospělých ryb představuje jeden z hlavních epizootologických problémů infekční nekrózy pankreatu.

### 3. Etiologie

Původcem infekční nekrózy pankreatu je virus, který byl zpočátku řazen na základě morfologických vlastností mezi reoviry, později, kdy byly poznány jeho biochemické a biofyzikální vlastnosti, byl zařazen do čeledi "*birnaviridae*".

Virus IPN má v negativně barvených preparátech ikosaedrální symetrii s 92 kapsoméry a průměr od 60 do 65 nm. Virus nemá obal, což podmiňuje jeho vysokou stabilitu a odolnost vůči zevnímu prostředí. Virion obsahuje dvouvláknitou RNK, má sedimentační konstantu 430 - 440 S, molekulovou hmotnost  $55 \times 10^6$  daltonů a hustotu 1,32 - 1,33 g.ml<sup>-1</sup> v CsCl.

U viru IPN se původně rozlišovaly 3 základní subtypy: severoamerický primoizolát VR 299 a evropské izoláty Sp a Ab, nyní se u každého subtypu udávají ještě další členění.

Z epizootologického hlediska mají v Evropě největší význam 2 nejčastěji se vyskytující, sérologicky odlišné serotypy Sp a Ab. Subtyp Sp vyvolává u plůdku pstruha duhového vyšší mortalitu, zatímco po infekci subtypem Ab má infekce mírnější průběh. Pro experimentální posouzení virulence viru IPN je důležitý poznatek, že i po relativně nízkém počtu pasáží na buněčných kulturách se virus stává pro pstruží plůdek avirulentním.

Na vznik a šíření infekce má významný vliv i otázka stability viru. Virus IPN je nejstabilnějším z doposud známých rybích virů. Ve vodě 10 °C teplé zůstává aktivní více než 231 dnů. V bahně při teplotě 4 °C a pH 7,6 více než 210 dnů. Vyschnutí mu také příliš neškodí a aktivní je v rozmezí teplot od 4 do 20 °C ještě za 4 týdny. Málo účinné je také kyselé prostředí - virus IPN přežívá pH 3,0 po 3 h, avšak alkalické prostředí je pro něj nevhodné. Dvouprocentní NaOH inaktivuje virus během 5 - 10 minut.

### 4. Vznik onemocnění a jeho průběh

Virus IPN se dostává do vodního prostředí zvláště výkaly a močí z nemocných ryb anebo z ryb, které nákazu překonaly a stávají se vironosiči. Zdrojem mohou být i výkaly rybožravých ptáků, kteří ulovili nemocné ryby, dále plankton, bentos a rybolovné pomůcky.

Zvláště významným faktorem při vzniku IPN může být samotný výtěr generačních ryb - vironosičů. Cesta přenosu infekce z rodičů na potomstvo byla u ryb potvrzena teprve nedávno a detailně byla studována právě u infekční nekrózy pankreatu. Bylo prokázáno, že jak jikry a ovariální tekutina, tak sperma infikovaných pstruhů obsahují virus IPN, který může přímo infikovat potomstvo. Bylo prokázáno, že virus je lokalizován jak na povrchu tak uvnitř jikry. Proto dezinfekce jiker nezabrání možnosti přenosu infekce.

Při vyšetřování v ohnisku IPN byl prokázán virus z jiker pstruha duhového 2 dny po oplození, z živých i odumřelých jiker ve stadiu očních bodů, u vykuleného váčkového plůdku a u plůdku po rozkrmení při klinickém onemocnění. Vi-

rus IPN je tedy prokazatelně přítomen po celou dobu vývoje alespoň u části potomstva vironosičů. Pro plůdek, který je zpočátku prostý viru, mohou být zdrojem nákazy obaly z vykulených jiker, na kterých prokazatelně virus po řadu dnů přežívá.

Infekční nekróza pankreatu se klinicky projevuje u lososovitých ryb nejmladší věkové kategorie. Nejčastěji onemocní plůdek poté, co začne přijímat potravu a kritickým obdobím pro vzplanutí IPN je rozmezí mezi 2. a 3. týdnem po zahájení příkrmování.

Při šíření infekce u odchovaného plůdku ve žlabcích hrají velkou úlohu výkaly nemocného plůdku, které v důsledku postižení trávicího traktu mají vzhled bělavých až žlutavých hlenovitých válečků a obsahují velké množství viru. Vznášející se výkaly jsou požírány zvláště aktivními jedinci odchovaného plůdku.

K přenosu může dojít i při požíráni nemocného plůdku staršími ročníky (kanibalismus), protože virus IPN je značně vzdorný ke kyselému pH.

Vznik a šíření IPN může značně ovlivnit i zevní životní prostředí. Vliv prostředí je u ryb daleko významnější než u ptáků a savců, neboť tělesná teplota ryb je závislá na teplotě vody a jí jsou následně ovlivňovány všechny tělesné procesy včetně imunitní odpovědi i multiplikace viru. Bylo prokázáno, že ztráty plůdku pstruha duhového na IPN infekci byly při 6 °C podstatně nižší než při 10 °C a že téměř ustaly při 16 °C. Mechanismus rezistence při vyšších teplotách je vysvětlován produkcí interferonu a protilátek a při nízkých teplotách (4-5 °C) zase inhibicí replikace viru v organismu. Ztráty se v nemocných obsádkách pohybují v rozmezí od 10 do 90 %.

Otázky protilátkové odpovědi ve vztahu k rezistenci a vironosičství nejsou doposud jednoznačně osvětleny. Bylo sice ověřeno, že vironosiči mají buďto nízký titer protilátek, nebo jsou zcela bez protilátek, a že u pstruhů s vysokým titrem virusneutralizačních protilátek nebyl virus izolován vůbec, nebo jen v nízkém titru. Proč však stejně infikované ryby jednou reagují na virový antigen tvorbou protilátek a jiné nereagují a stávají se vironosiči, nebylo zatím osvětleno. Zdá se pravděpodobné, že je to následkem imunologické tolerance. Také dosavadní pokusy o vývoj účinné vakcíny proti IPN byly neúspěšné.

Vedle teploty hraje značnou úlohu i kvalita vody, zejména koncentrace kyslíku a amoniaku a nejrůznějších příměsí toxických látek. Také další stresující faktory, jako je nadměrná obsádka a nevhodné zacházení s rybami, mohou zvyšovat výskyt onemocnění, neboť snižují specifickou i nespecifickou rezistenci organismu. Rovněž kvalita krmiva může hrát významnou úlohu.

##### *5. Klinické příznaky a patologické změny*

Onemocnění začíná většinou náhle u rychleji rostoucích jedinců při teplotách vody do 14 °C. Jedním z prvních pří-

znaků onemocnění bývají poruchy v plavání, představované nejčastěji spirálovitým otáčením nemocného plůdku kolem podélné osy. Později leží plůdek na boku a často klesá ke dnu nebo je odtékající vodou přitlačen na mřížku u výtoků.

Při rychlém průběhu onemocnění (zvláště u malého plůdku) nemusí být zjistitelné žádné makroskopické změny. V některých případech je u subakutního průběhu pozorována různě výrazná dilatace dutiny tělní, drobné krváceniny na serózech a v oblasti pylorických přívěsků. Dilatace trávicího traktu je způsobena mléčným zkaleným hlenem. Někdy bývá u nemocných kusů dilatace žlučového měchýře. Játra a ledviny jsou v některých případech bledé, anemické, jindy překrvené, ve většině případů velmi křehké. U nemocných kusů mohou být zjišťovány i tmavší pigmentace kůže, exoftalmus nebo krváceniny v kůži a v základu ploutví. Žábry nebývají postiženy.

### *Histopatologické nálezy*

V akutní fázi onemocnění je u plůdku možno na sliznici jícnu, žaludku, přední a zadní části střeva a na pylorických přívěscích zjistit akutní až nekrotický zánět. V počátečních fázích se zánět projevuje různě výrazným zduřením epiteliálních buněk a silným vylučováním hlenu. V pokročilejším stadiu choroby dochází ke kompletní nekróze spojené s karryorexis jader a k odlupování sliznice. Histologický obraz vykazuje na povrchu sliznice eozinofilní červené nekrotické masy s bazofilními modrými pruhy jaderných zbytků. Infiltraci lamina propria zánětlivými buňkami jsme nikdy nezjistili.

V pankreatu jsou degenerativní až nekrotické změny v začátku onemocnění rozloženy ložiskově, v průběhu onemocnění se difúzně rozšiřují. Acinární struktura pankreatické tkáně se ztrácí a mění se v amorfní eozinofilní masy. Počáteční překrvení tkáně postihuje pouze ojedinělé aciny. V dalším průběhu dochází k jejich pyknóze a k nekróze celých okrsků. V pokročilejším stavu onemocnění se prostory po nekrotických acinech vyplňují fibrózním vazivem.

V preparátech fixovaných formolem je možno pozorovat v počátečním stadiu nemoci v degenerativních změnách pankreatické tkáně, nezávisle na ložiscích acinárních struktur, malé, kulaté, tmavé, silně bazofilní struktury, které mají v některých případech kolem nezbarvenou úzkou zónu. Tato tělíska jsou zjišťována i při hladovění u zdravých pstruhů a nelze je spojovat přímo s IPN.

Změny na ostatních orgánech nejsou charakteristické. Játra mohou vykazovat různé stupně tukové infiltrace, překrvení a aktivace RHS. Ledviny jsou často překrvené, cévy dilatované.

### Upozornění

Na základě klinických příznaků a patomorfologických změn nelze exaktně diagnostikovat IPN, protože mohou být doprovodným symptomem i onemocnění jiné etiologie.

## 6. Laboratorní diagnostika IPN

Diagnostika infekční nekrózy pankreatu je založena na metodách průkazu viru IPN. Sérologická stanovení nejsou v současnosti používána pro rutinní diagnostiku, stejně jako metoda plazmidových profilů (PCR), i když v budoucnosti lze očekávat rozšířené využití těchto metod.

### 6.1 Odběr vzorků

V chovech považovaných za prosté nákazy se vyšetřování provádí u plůdku ve 2.- 4. týdnu po začátku rozkrmování. Druhé vyšetření se provádí 4 - 6 týdnů po prvním vyšetření.

K laboratornímu vyšetření se odebírá nejméně 30 ks ryb, které vykazují atypické chování či se jeví jako klinicky nemocné. V případě absence takovéhoto ryb se berou k vyšetření ryby zdržující se u konce odchovného žlabu.

Pokud jsou v chovech generační ryby, do virologické testace chovu by měly být zahrnuty jikry a ovariální tekutiny od 30 ryb s tím, že od každé jikernačky se bere do vyšetření alespoň 50 jiker.

Pokud je v zařízení více druhů ryb vnímavých k viru IPN, musí být v odebraném vzorku tyto ryby zahrnuty.

Odlov ryb určených pro laboratorní virologické vyšetření se provádí bezprostředně před jejich převozem do laboratoře. Je vhodné použít plastové pytle s kyslíkovou atmosférou. Teplota během transportu nesmí překročit 15 °C. Uhybnulé ryby se pro virologické vyšetření nehodí.

Pokud je možné zajistit sterilní odběr orgánů mimo laboratoř, lze je v médiu se zvýšenou koncentrací antibiotik k vyšetření transportovat při dodržení požadavku na teplotu (0 - 5 °C).

### 6.2 Zpracování vzorků

Pro virologické vyšetření se odebírají ledviny, játra a slezina.

U ryb velikosti 40 - 60 mm se odstraní hlava a ocas a tělo s vnitřnostmi je po rozstříhání na menší kusy homogemizováno.

Z odebraných orgánů, případně částí těla se ve třech miskách připraví desetiprocentní suspenze v některém z kulturačních médií (Hanks, Earle, MEM) bez séra, do kterého se přidá nejméně 5krát více antibiotik (500 m.j. penicilinu a 500 µg.ml<sup>-1</sup> streptomycínu). Orgánová suspenze se ponechá v lednici přes noc při teplotě 4 °C a poté se odstředí při 3 000 ot.min<sup>-1</sup>. Takto získaná tekutina se použije k infekci buněčných kultur.

Ryby menší než 40 mm jsou použity pro homogenizaci celé. Orgány od 10 ryb tvoří jeden směsný vzorek.

### 6.3 Buněčné kultury

Izolace viru na buněčných liniích se provádí v případě pozitivního výsledku ELISA testu orgánových suspenzí, či v případě podezření z nákazy IPN.



K izolaci virů patogenních pro ryby jsou používány buněčné linie EPC (epithelioma papulosum cyprini), BF-2 (bluegill fibroblast), CHSE (chinook salmon embryo), FHM (fathead minnow), RTG (rainbow trout gonads) a další. Vzhledem k ostatním virologickým vyšetřením u ryb doporučujeme současně použití dvou buněčných linií, EPC a BF-2 (FHM).

Pro linie buněk EPC a BF-2 je vhodná kultivační teplota 28 a 24 °C. Buňky jsou kultivovány v MEM médiu s Earlovými solemi, 10 % bovinního fetálního séra a antibiotiky (penicilin 100 IU.ml<sup>-1</sup> a streptomycin 100 µg.ml<sup>-1</sup>).

V případě kultivace buněk v otevřeném systému (24 jamkové desky Multidish Nuclon) je médium pufrováno v systému Tris-HCl na pH 7,6.

1. Pro izolaci viru jsou použity 24hodinové kultury buněčných linií, přičemž optimální je plocha porostlá z 90 % buněčným monolayerem.
2. Inokulace buněk se provádí supernatantem orgánových suspenzí tak, aby konečné ředění v jamkách bylo 1 : 100 a 1 : 1000. Pro každé ředění jsou použity dvě paralelní jamky.
3. Infikované buněčné linie jsou inkubovány 7 dní při 15 °C a denně kontrolovány na přítomnost cytopatického efektu (CPE). Jestliže po 7 dnech není CPE patrný, infikované linie se zmrazí a rozmrazí a médium ze všech jamek jedné linie inokulovaných jedním smíšeným vzorkem je slito. Následně je slité médium použito jako inokulum pro subkultivaci ve druhé pasáži stejným způsobem jako prve.
4. Jestliže se nedostaví po dalších 7 dnech CPE, test se ukončí. Kultivační tekutiny po 1. i 2. pasáži jsou vyšetřeny ELISA testem pro případ replikace viru při absenci CPE.
5. V případě výskytu CPE se ihned přistoupí k identifikaci viru.

## 6.4 Identifikace viru

### 6.4.1 ELISA test

Jamky mikrotitrační plotny s návaznou specifickou protilátkou proti viru IPN jsou naplněny vyšetřovanými roztoky (terénní vzorky, pozitivní a negativní kontrolní antigeny). Je-li virus ve vyšetřovaném roztoku přítomen, dochází k vazbě virových antigenů na protilátku. S těmito antigeny pak při další inkubaci reagují králičí protilátky proti viru IPN. Vazba králičích protilátek je prokazována během další inkubace s roztokem konjugátu (POD-SwARIG) a vizualizována po nanesení roztoku substrátu.

#### 6.4.2 Imunofluorescenční test

Přímou i nepřímou imunofluorescenční metodu lze využít jednak k identifikaci virových izolátů, jednak k přímému průkazu viru IPN v řezech z orgánů vyšetřovaných ryb, tedy k diagnostice onemocnění.

##### a) Identifikace viru

Imunofluorescenční vyšetření k identifikaci nově izolovaných virů se provádí na sklíčkách s narostlými a infikovanými buněčnými kulturami. Preparáty se prohlíží ve fluorescenčním mikroskopu a přítomnost viru IPN se projeví jasnou žlutozelenou fluorescencí v cytoplazmě vyšetřovaných buněk.

##### b) Přímý průkaz viru v orgánech

K průkazu viru přímo v orgánech se vzorky fixují ve vychlazeném acetonu. Plůdek do velikosti 30 mm se po usmrcení vpichem do hlavy fixuje celý, u většího plůdku se před fixací ustříhne hlava a kaudální část těla. Z větších kusů se odebírají jednotlivé orgány, a to žábry, pylorické přívěsky s pankreatem, žaludek a střeva, přední a zadní ledviny. Od doby ořběru do doby fixace nesmí uplynout více než 5 min.

U nemocného plůdku se virus v akutních případech prokazuje hlavně v epitelálních buňkách střevního traktu, u Pd<sub>1-2</sub> pak v cytoplazmě epitelálních buněk primárních ledvinných tubulů a v cytoplazmě epitelálních buněk acinů pankreatu.

Specifitu fluorescence je nutno prověřovat souběžným kontrolním vyšetřením použitých ingrediencí.

#### 6.4.3 Neutralizační test

1. Médium obsahující virus je naředěno na koncentraci  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ .
2. Alikvoty jednotlivých ředění jsou smíchány s protilátkami proti IPNV (titr alespoň 2000 pro 50%-ní plakredukci) a se samotným kultivačním médiem.
3. Směsi jsou inkubovány 1 h při 15 °C a následně přeneseny na monolayeru buněčných linií (alespoň dvě kultury na jedno ředění).
4. Buněčné kultury se vzorky jsou inkubovány při 15 °C.
5. Vzorky jsou pravidelně kontrolovány. Jakmile je v protilátkami neneutralizovaných kontrolách zaznamenán výskyt CPE, výsledky jsou odečteny buď prostou mikroskopií, či po slití kultivačního média obarvením krystalovou violetí.
6. Virus je identifikován jako IPNV, jestliže CPE chybí nebo je výrazně snížen v kulturách s virem ošetřeným IPNV specifickou protilátkou, zatímco v ostatních buněčných kulturách je CPE přítomen.

#### 6.4.4 Elektronová mikroskopie

Pro elektronově mikroskopický průkaz a identifikaci virových izolátů na buněčných kulturách lze využít metod negativního barvení, imunoelektronové mikroskopie a ultratenkých řezů.

### 7. Stanovení diagnózy a diferenciatlní diagnostika

Diagnóza se stanoví na základě klinického, patologického, epizootologického a virologického vyšetření zhodnocením výše popsaných příznaků a nálezů, při současném vyloučení jiných příčin. Pro stanovení diagnózy je rozhodující izolace viru.

Z diferenciatlně diagnostického hlediska je nutno provést následující vyšetření a vyloučit další možné příčiny onemocnění, které mohou postihovat ryby mladších věkových kategorií a projevovat se zvýšenými ztrátami.

#### 7.1. Hydrochemické příčiny

Při intenzivním odchovu na žlabech s hustší obsádkou a při vyšší teplotě nutno vyšetřit koncentraci kyslíku ve vodě (nemá poklesnout pod 80 % nasycení), pH vody a koncentraci nedisociovaného amoniaku (hodnoty nemají překročit  $0,0125 \text{ mg.l}^{-1}$  u Pd  $0_{-1}$ ). V případě potřeby zajistíme vyšetření dalších hydrochemických ukazatelů užívaných v chovu ryb.

#### 7.2 Otravy

Při náhlém uhynutí většího množství obsádky nutno zajistit toxikologické vyšetření napájecí vody.

#### 7.3. Alimentární příčiny intoxikace

Nezávadnost krmiva je jedním z hlavních předpokladů úspěšného odchovu plůdku, proto jeho posouzení věnujeme pozornost již před začátkem rozkrmování i při každém zvýšeném hynutí. V indikovaných případech zajistíme rozbor používaného krmiva, zejména se zaměřením na číslo kyselosti tuku, peroxidové a 2-thiobarbiturové číslo, kyselost vodního výluhu, obsah amoniaku, případně další vyšetření (bakteriologické, obsah NaCl aj.). Protože nervové příznaky onemocnění jsou pozorovány i u některých avitaminóz, bereme při hodnocení ztrát v úvahu i tuto možnost a zajistíme příslušné vyšetření. V každém případě je však nutno při zvýšeném úhynu vyšetřit krmivo na aflatoxin B<sub>1</sub>, ke kterému je pstruh značně citlivý.

#### 7.4. Parazitární onemocnění

Mikroskopickým vyšetřením seškrabu kůže a žaber je nutno vyloučit invazi *Ichthyobodo necator*, který se může silně

pomnožit zejména ve zhuštěných obsádkách u plůdku oslabeného jinými faktory (nižší pH, nevhodná výživa apod.).

Silné invaze *Hexamita salmonis* spojené s poruchami plavání, nechutenství a změnami žaludku a střev jsou rovněž podmíněny faktory oslabujícími plůdek. Diagnózu stanovíme mikroskopickým vyšetřením obsahu zadní části střeva a žlučového měchyře.

Při výskytu nekoordinovaného, manéžovitého kroužení je nutné vyloučit i myxosomózu lososovitých (původce *Myxosoma cerebralis*; dle nejnovějších poznatků je původce označován *Myxobolus cerebralis*). Při akutním stadiu choroby nelze vegetativní stadia v nativních preparátech prokázat; je nutné histologické vyšetření. V pozdějším stadiu (asi 3 měsíce po invazi) lze mikroskopicky při zvětšení asi 450krát zjistit spóry v rozdrčené chrupavčité a kostní tkáni plůdku. Konečnou diagnózu je však nutno stanovit laboratorním vyšetřením při použití některé z metod umožňujících koncentraci spór z vyšetřovaných tkání.

### 7.5. Bakteriální onemocnění

Zejména nutno vyloučit myxobakteriíózu žaber. Provedeme orientační mikroskopické vyšetření nativních preparátů ze žaberních lístků (při velkém zvětšení) na přítomnost flexibakterií; nález typicky piliřovitě uspořádaných tyčinek, které mají specifický klouzavý pohyb. (Upozornění: při poškození žaber různými vlivy může dojít k přemnožení i jiných druhů podmíněně patogenních bakterií běžně přítomných ve vodě, které mají rovněž tvar tyčinek a ve většině případů jsou pohyblivé. Barvení dle Grama není spolehlivým rozlišovacím kritériem - všechny tyčinkovité vodní bakterie jsou Gr-.). Spolehlivá diagnóza flexibakterií je jediné možná při kultivaci na živné půdy (*Cytophaga agar*) s následnou typizací zachycených kmenů (odlišení od saprofytických myxobakterií). Klinické příznaky se projevují zejména nechutenstvím, plaváním u hladiny a příznaky dušení. Skfele bývají často široce rozevřené.

Dalším onemocněním, které probíhá ve stejném období roku, je bakteriální hemoragická septikémie (ERM), způsobovaná bakterií *Yersinia ruckeri*. Onemocnět mohou všechny lososovité ryby včetně síhů a úhoř. Jiné ryby neonemocní, ale mohou být přenašeči jeho původce. Klinicky onemocní obvykle ryby v prvním roce života za příznaků malátnosti, inapetence, ztmavnutí těla, zčervenání skřelových víček, krvácením u báze ploutví, na čelistech a horním patře. Při pitvě se zjišťují krváceniny na vnitřních orgánech, pobřišnici a tuku. Slezina je zvětšená. Diagnóza se stanoví zjištěním původce při bakteriologickém vyšetření.

### 7.6. Virová onemocnění

Z virových onemocnění je nutno vyloučit virovou hemoragickou septikémií (VHS), která postihuje různé věkové kategorie pstruha duhového a sivena amerického (experimentálně

lze infikovat i pstruha obecného). Původcem je virus zařazený do skupiny rhabdovirů. Od původce IPN se liší morfologicky a sérologicky; množí se i v buněčných kulturách FHM. Patologické změny u postižených ryb jsou charakterizovány drobnými krváceninami na serózách i na povrchu těla. Při akutním průběhu u mladších ryb je řada klinických a patologických příznaků obdobná jako u IPN. Při protražovaném onemocnění lze zjistit zduření ledvin, exoftalmus a anémii žaber. Rozhodující pro diagnózu je výsledek virologického vyšetření.

Z dalších virových onemocnění připadá v úvahu infekční hemopoetická nekróza, která postihuje pstruha duhového a další lososovité ryby. Původcem je virus ze skupiny rhabdovirů, který se liší od VHS především sérologicky, morfologické rozdíly viru nejsou při běžném vyšetření postřehnutelné. Klinické příznaky mohou být obdobné jako u IPN a VHS, patologické změny postihují zejména krvetvornou tkáň ledvin.

## 8. Léčba IPN

Přes četné pokusy nebyla zatím žádná léčebná metoda úspěšná.

## 9. Opatření při výskytu

Po zjištění původce nákazy se v chovu nařizují ochranná a zdlavací opatření, protože IPN patří podle našich veterinárních předpisů (Vyhl. č. 117/87 Sb.) mezi nebezpečné nákazy.

Tato opatření zahrnují zejména:

- a) vymezení ohniska nákazy a ochranného pásma
- b) uzávěru chovu a jeho označení výstražnou tabulkou: **Nebezpečná nákaza - vstup zakázán**
- c) zákaz přemísťování jiker, mlíčí a ryb z a do ohniska nákazy
- d) provedení epizootologického průzkumu, který je zaměřen na zjištění možnosti zavlečení nákazy do tohoto chovu a možnosti přenosu nákazy z tohoto chovu před stanovením diagnózy
- e) neškodné odstraňování uhynulých ryb v ohnisku nákazy a ochranném pásmu (přes asanační ústavy)
- f) z ohniska nákazy je možné povolit jen dodávku tržních ryb pro přímou spotřebu nebo zpracování. Ryby nevhodné pro lidskou výživu je možné zkrmit jiným zvířatům nebo neškodně odstranit. V obou případech je nutno dodržet opatření, která zabrání rozvlékání nákazy
- g) průběžnou dezinfekci objektů, technologických zařízení, dopravních prostředků a pracovních pomůcek
- h) podle nálezové situace a místních podmínek mohou být stanovena další opatření

## 10. Podmínky ke zdolání nákazy

Opatření uvedená v předchozí kapitole mohou být odvolána a nákaza prohlášena za zdolanou za těchto podmínek:

- a) byla provedena závěrečná dezinfekce
- b) po novém obsazení objektu vřímavou rybou nedošlo v pozorovací době, která je dva roky, k výskytu nákazy nebo podezření z ní. Během této doby musí být prováděna každoročně vyšetření uvedená v kapitole 6. Počty ryb zasílaných k vyšetření se musí zvýšit na 150 kusů. Odběry vzorků k těmto vyšetřením musí provádět úřední veterinární lékař
- c) v případě, že je objekt po závěrečné dezinfekci prázdný, může se pozorovací doba zkrátit na jeden rok

## 11. Prevence

Základem úspěšné prevence této nákazy je dodržování protinákazových opatření ve zdravých chovech. Za chov prostý této nákazy se považuje takový, kde byla prováděna vyšetření uvedená v kapitole 6. po dva roky s negativním výsledkem. Jikry a ryby by měly být nakupovány jen ze zdravých chovů. Všechny přesunované ryby musí být provázeny *Osvědčením o zdravotním stavu zvířat a nálezové situaci v chovu*, vystaveným soukromým veterinárním lékařem (zák. č. 112/94 Sb.). Je v zájmu chovatele, který ryby nakupuje, aby požadoval, aby v tomto *Osvědčení* bylo výslovně uvedeno, že ryby pocházejí z chovu prostého nebezpečných nákaz a jiných hromadných onemocnění ryb, protože jen tak je zaručeno, že na tyto nákazy bylo provedeno příslušné vyšetření ve stanovenou dobu.

Z protinákazového hlediska je nejvhodnější uzavřený obrot hejna ryb, případně podle provozních podmínek turnusový způsob chovu. Remontní a generační ryby je nutné chovat odděleně od jiných kategorií ryb.

Jedním z rozhodujících faktorů v ochraně zdraví ryb je kvalita a nezávadnost vody. Pokud má závod vlastní líheň, je nezbytné pro ni zajistit oddělený zdroj pramenité vody (bez ryb). Bylo prokázáno, že právě společný zdroj vody (s přítomností vironosičů) pro líheň i odchovnu byl příčinou onemocnění plůdku. Kvalita vody bývá ovlivněna nejen jejím zdrojem, okolním průmyslem, zemědělstvím apod., ale i hustotou obsádky. Proto je bezpodmínečně nutné dodržovat projektovanou kapacitu objektů.

Dále je nutno chránit ryby před zbytečnými zátěžovými vlivy - stresy. Protože onemocnění IPN velmi často začíná při rozkrmování plůdku, je nutno jej provádět postupně a uváženě a ke krmení použít jen kvalitní a zdravotně nezávadná krmiva. Při přesunu plůdku je třeba šetrné zacházení a přepravu zkrátit pokud možno na minimum.

Likvidaci uhynulých ryb provádět buďto v kafilerii nebo v případě menšího množství zakopáním. Jáma musí být dostatečně hluboká i vzdálená od objektů. Dno jámy se vysype nejdříve páleným nebo chlorovým vápnem, poté se do ní uloží uhynulé ryby, které se opět posypou stejným dezinfekčním prostředkem, jáma se zasype hlínou, která se důkladně udusá.

Nemocné nebo uhynulé ryby nelze zkrmovat starším ročníkům (virus IPN není ničen ani při pH 3,0), které se mohou stát vironosiči, aniž klinicky onemocní.

## 12. Dezinfekce

V hospodářství se provádí jednak průběžná dezinfekce (po ukončení turnusu a vyskladnění obsádky), jejímž cílem je hlavně ochrana obsádek před choroboplodnými mikroorganismy, jednak ohnisková dezinfekce, určená k ničení (devitalizaci) původců chorob ryb při likvidaci ohniska nákazy.

Vzhledem k vysoké odolnosti viru IPN k zevnímu prostředí (viz kapitola 3) i mnohým dezinfekčním prostředkům je nutný jejich pečlivý výběr. S ohledem na citlivost viru k alkalickému prostředí je vysoce účinný 2 % louh sodný. Stejně účinný je i 3-5 % formaldehyd. Používá se jich především na dezinfekci rybolovných prostředků, odchovných nádrží, krmítek pro pstruží plůdek apod.. Pro tyto účely je vhodné i chlorové vápno v dávce  $400 \text{ mg.l}^{-1}$  vody s 12hodinovým působením. Pro zemní sádky se doporučuje chlorové nebo pálené vápno, případně dusíkaté vápno v běžné používaných dávkách.

### Upozornění

Použití louhu sodného k dezinfekci je podmíněno možností jeho neutralizace před vypuštěním dezinfekčního roztoku z nádrží do vodního toku vzhledem k nebezpečí poškození volně žijících ryb! Rovněž při použití formaldehydu a chlorového vápna je zprůtočení sádky možno provést až po detoxikaci dezinfekčních roztoků.

Adresa autora:

Prof. MVDr. Zdeněk P o s p í š i l , DrSc., Veterinární  
a farmaceutická univerzita, Palackého 1-3, 612 42 Brno

Lektorovala:

MVDr. Zdeňka S v o b o d o v á , DrSc., Výzkumný ústav  
rybářský a hydrobiologický JU, 389 25 Vodňany