



# Metody hematologického vyšetřování ryb

*Z. Svobodová, D. Pravda, H. Modrá*





**FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD**  
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

# **Metody hematologického vyšetřování ryb**

---

*Z. Svobodová, D. Pravda, H. Modrá*

**Vodňany**

**2012**

**VYDÁNÍ METODIKY JE USKUTEČNĚNO ZA FINANČNÍ PODPORY PROJEKTU:  
OP RYBÁŘSTVÍ PŘÍPRAVA A VYDÁNÍ METODICKÝCH PUBLIKACÍ V ROCE 2012  
(CZ.1.25/3.1.00/11.00381)**



**EVROPSKÁ UNIE**

**EVROPSKÝ RYBÁŘSKÝ FOND**

**„Investování do udržitelného rybolovu“**

Obsahová část metodiky je výsledkem řešení projektu:

**100 % – Technologie chovu sladkovodních ryb s využitím recirkulačních systémů dánského typu se zaměřením na metody efektivního řízení prostředí a veterinární péče  
(KUS QJ1210013)**



č. 122

ISBN 978-80-87437-62-9

<b>1. CÍL METODIKY</b>	<b>6</b>
<b>2. VLASTNÍ POPIS METODIKY</b>	<b>6</b>
<b>2.1. Úvod</b>	<b>6</b>
<b>2.2. Odběr krve</b>	<b>7</b>
2.2.1. Odběr krve u plůdku ryb	7
2.2.2. Odběr krve u ryb s kusovou hmotností nad 200 g včetně ryb generačních	11
<b>2.3. Stabilizace krve</b>	<b>16</b>
<b>2.4. Stanovení ukazatelů červeného krevního obrazu</b>	<b>16</b>
2.4.1. Erytrocyty	16
2.4.2. Stanovení počtu erytrocytů (Er, RBC)	16
2.4.3. Hemoglobin	18
2.4.4. Stanovení množství hemoglobinu (Hb)	18
2.4.5. Methemoglobin	20
2.4.6. Stanovení methemoglobinu (MetHb)	20
2.4.7. Hematokritová hodnota (PCV, Hk)	22
2.4.8. Základní hodnoty erytrocytu a jejich výpočet	23
<b>2.5. Stanovení ukazatelů bílého krevního obrazu</b>	<b>24</b>
2.5.1. Počet leukocytů (Leuko)	24
2.5.2. Leukokritová hodnota (Lk, BC)	25
2.5.3. Diferenciální rozpočet leukocytů (leukogram)	26
2.5.4. Stanovení leukogramu	31
<b>2.6. Zkrácený hematologický kondiční test (ZHKT) ryb a jeho provedení</b>	<b>34</b>
<b>3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“</b>	<b>35</b>
<b>4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY</b>	<b>35</b>
<b>5. EKONOMICKÉ ASPEKTY</b>	<b>35</b>
<b>6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY</b>	<b>36</b>
<b>7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE</b>	<b>36</b>

## 1. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je předložit aktualizovaný postup hematologického vyšetření periferní krve ryb s využitím současných poznatků a zkušeností.

## 2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Metodika popisuje stanovení hodnot červeného a bílého krevního obrazu ryb a uvádí metodu zkráceného hematologického kondičního testu.

---

### 2.1. Úvod

---

V 70. a 80. letech minulého století se začal u nás velmi úspěšně rozvíjet obor ichthyohematologie. Snaha o vypracování prvních jednotných metodik pro účely ichthyohematologie byla motivována vlivem mezinárodní odborné a vědecké veřejnosti, která se s nevšedním zájmem a entusiasmem podílela na konstituování tohoto historicky mladého odvětví hematologie. Vyústěním tohoto úsilí a získaných zkušeností bylo vydání metodiky „Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb“ (Svobodová, Pravda a Paláčková, 1986). V roce 2001 byla vydána tato metodika v angličtině. Byly zde podrobně popsány metody hematologického a biochemického vyšetření krve ryb. Analýzy periferní krve ryb byly využívány pro posuzování kondice ryb, nespecifické odolnosti jednotlivých plemen a linií ryb, k posuzování vhodnosti krmiv, vlivu stresových situací a v neposlední řadě byly tyto metody hojně využívány při sledování účinků toxických látek na ryby.

V průběhu následujících 26 let byly ichthyohematologické metody intenzivně využívány, podle potřeb byly upravovány, případně modifikovány. Na základě těchto zkušeností a recentních poznatků nyní vychází aktualizovaná a revidovaná verze. V tomto vydání jsou uvedeny pouze metody hematologického vyšetření krve ryb. Metody biochemického vyšetření byly vypuštěny, protože v současné době jsou tato vyšetření prováděna pomocí plně automatizovaných biochemických analyzátorů s využitím komerčních kitů.

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 ovlivňovány endogenními a exogenními faktory, a proto není snadné stanovit jejich fyziologické rozmezí. Hematologické hodnoty uvedené v jednotlivých kapitolách je proto nutno považovat pouze za orientační.

---

## 2.2. Odběr krve

---

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

### 2.2.1. Odběr krve u plůdku ryb

---

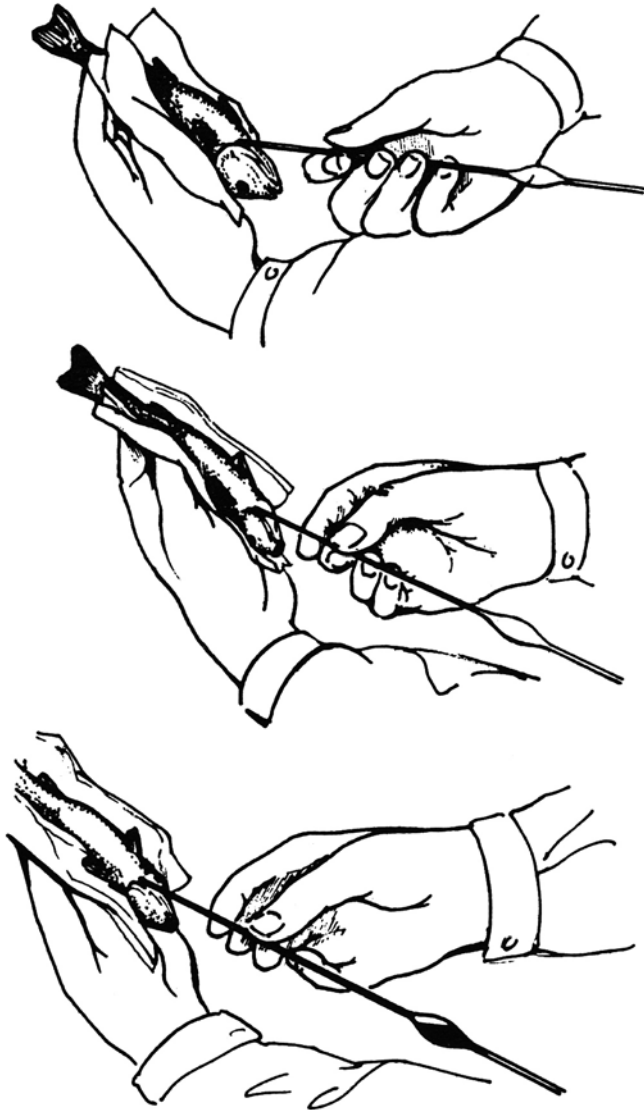
U plůdku většiny druhů ryb je v důsledku velikostních poměrů a jemného uspořádání vyvíjejícího se cévního řečiště krve objektivně tak málo (1 až 2% hmotnosti), že i minimální reprezentativní krevní objem k vyšetření lze odebrat jen v centrálním úseku cirkulačního ústrojí, tj. v srdci. Pro stanovení základních ukazatelů postačí 4 kapky nesrážlivé krve, pro vyšetření v rozsahu zkráceného hematologického kondičního testu (ZHKT) pak téměř polovina tohoto objemu. Potřebné množství krve lze spolehlivě získávat od plůdku s hmotností minimálně 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 roztoku heparinu. Při této heparinizaci je nutné dbát na to, aby heparin vytvořil pouze jemný film na vnitřních stěnách odběrové kapiláry a aby byl zbylý roztok spolehlivě vyfouknut a popřípadě i odsán filtračním papírem nebo buničitou vatou. Vlastní náběr krve se pak provádí tak, že se ryba po vylovení z vody rychle fixuje za hřbetní část čtvercem buničité vaty nebo utěrkou z netkané textilie přiměřených rozměrů. 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 buničitou vatou do sucha a uchopí se heparinovaná 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 žlutkové výživy vstupovaly do těla žlutkové cévy, přivádějící do základu srdce krev obohacenou živinami, resorbovanými ze žlutkového váčku. Poté se energickým vpichem zavede hrot heparinované 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 samovolné náplni krví hned v počáteční fázi protnutí stěny této tělní dutiny, je to zpravidla tím, že hrot odběrové kapiláry byl zaveden

přilíši hluboko do osrdečníkové dutiny, 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 zavést 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 antikoagulačním činidlem. Tím se zajistí potřebná stabilizace krevního vzorku. Rybu je nutné ihned po odběru krve usmrtit šetrným způsobem.

Další manipulace s odebraným vzorkem nesrážlivé krve ryby spočívá v tom, že se nejprve nechají 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 uzavřeny pečetním voskem. Před dalším zpracováním se uchovává v kolmé poloze a při teplotě do 4°C.

U plůdku ryb s hmotností nad 20 g lze odběrovou skleněnou kapiláru nahradit čistou a suchou heparinizovanou injekční jehlou o průsvitu do 0,9 mm (velmi vhodné jsou pro tyto účely jednorázové injekční jehly se žlutým případně zeleným konusem), 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 plastových mikrozkupek s víčkem („Eppendorf“), které jsou pro další manipulaci s krví ryb zvláště vhodné.





**Obr. 1.** Odběr krve u plůdku ryb metodou krevního náběru vnější punkcí srdce (kardiopunkce) pomocí cca 200 mm dlouhé skleněné kapiláry (Svobodová a kol., 1986).

Kardiopunkční techniku odběru lze použít také u ryb vyšších věkových kategorií v případech, kdy si můžeme dovolit usmrčení vyšetřované ryby. Taková situace se naskýtá např. při komplexním zdravotním vyšetření vzorků ryb a při současné potřebě provést rozsáhlejší hematologický výzkum, který vyžaduje větší objem krve. V těchto případech se provádí odběr krve pomocí heparinizované jednorázové injekční jehly (žlutý případně zelený konus) s nasazenou heparinizovanou injekční stříkačkou. 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. Kardiální punkci lze provádět také pomocí heparinizované kovové jehly silnějšího průměru bez nasazené injekční stříkačky. Krev necháme volně skapávat do heparinizovaných plastových mikrozku mávek s víčkem nebo skleněných lahvíček (obr. 2 a 3).



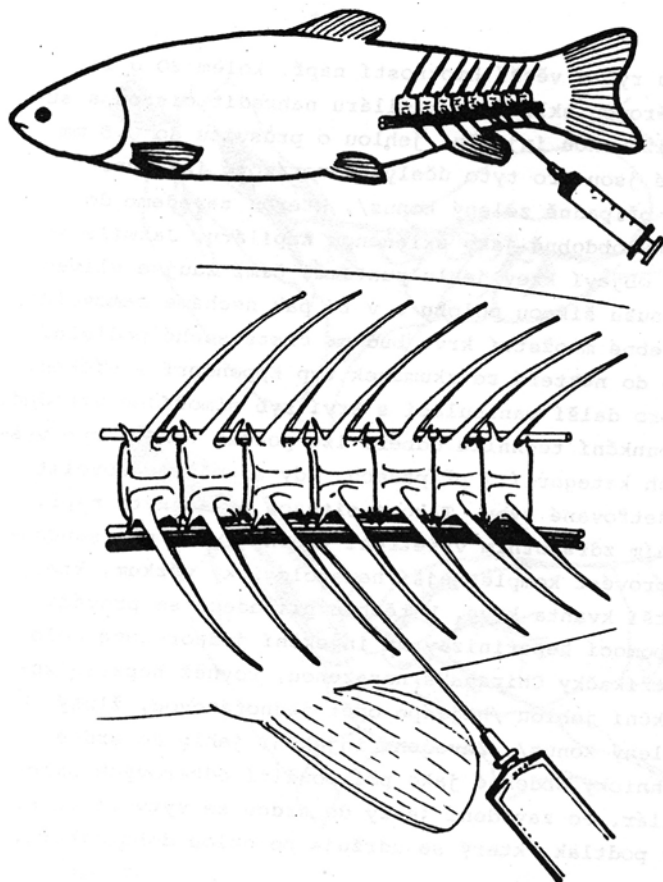
**Obr. 2.** Odběr krve kardiální punkcí u kapra (foto L. Divišová).



**Obr. 3.** Odběr krve kardiální punkcí u kapra (foto L. Divišová).

### **2.2.2. Odběr krve u ryb s kusovou hmotností nad 200 g včetně ryb generačních**

Nejvhodnější metodou odběru krve u těchto ryb je punkce ocasních cév (obr. 4). 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 se nejprve osuší místo asi 1 cm kaudálně od řitní ploutve. Po osušení místa se ve střední rovině nadzvedne pomocí jehly kožní šupina a jehla se zavede kraniodorzálním směrem pod úhlem 45° od osy páteře. Jehla musí být dostatečně dlouhá a pevně nasazená na konusu heparinizované jednorázové injekční stříkačky (obr. 5–6). Jehla se zavádí pomalu 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. Po ukončení odběru krve je nutné místo vpichu povrchově dezinfikovat běžným způsobem. Popsaná metoda je plně doporučitelná zejména při sériových krevních odběrech, neboť odběr 2 ml krve od kaprovitých ryb s kusovou hmotností nad 1 000 g nemá pro odebírané ryby významný vliv na jejich zdravotní stav a další život.



**Obr. 4.** Odběr krve u ryb s hmotností nad 200g metodou punkce ocasních cév (Svobodová a kol., 1986).



**Obr. 5.** Odběr krve kapra punkcí ocasních cév (foto L. Divišová).

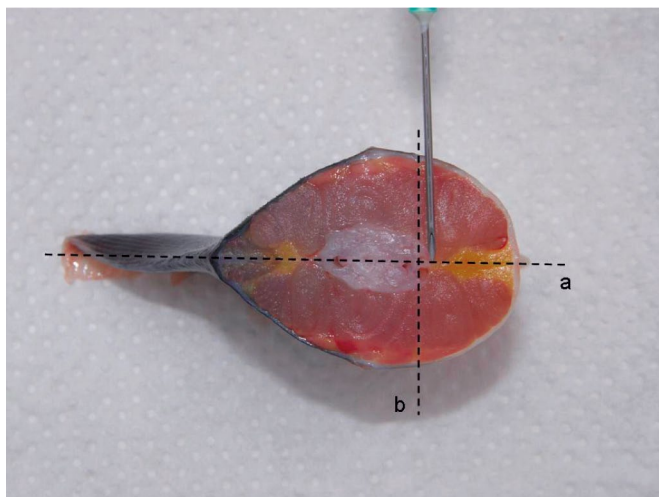


**Obr. 6.** Odběr krve sivena punkcí ocasních cév (foto L. Divišová).

Pro odběr krve u jeseterovitých ryb je nutné oproti kostnatým rybám postup modifikovat. Chrupavčitá chorda nepůsobí u jeseterů jako překážka pro orientaci správného odběru, a proto je nutné zvolit orientaci podle vnějších koordinát. Cévy, ze kterých je krev odebírána, leží v průsečíku horizontální přímkou (a) vedené napříč ocasním násadcem v rovině řitní ploutve a vertikální přímkou (b; kolmice na první přímku) spuštěné z ventrálního výběžku kostěného štítku v laterální řadě (Flajšhans, úst. sděl., 2012; obr. 7–8).

Heparinizovaná injekční stříkačka s pevně nasazenou jehlou se zavádí do ocasního násadce pod ventrální výběžek některého z dobře viditelných kostěných štítků v laterální řadě (obr. 8). Stříkačka s jehlou se zavádí kolmo, mírným tlakem k překonání slabého odporu svaloviny. Jediná tkáň, která při tomto způsobu odběru klade jehle odpor, je až stěna cévní. Její překonání je signalizováno náběrem krve do stříkačky. Častou komplikací při rychlejšímu postupu punkce bývá proniknutí jehly skrz cévu, při kterém se již krev ve stříkačce objeví, ale dále neteče. V tomto případě je nutné jehlu opět povytáhnout, dokud se nevrátí zpět do středu cévy. Po ukončení odběru krve je nutné místo vpichu povrchově dezinfikovat běžným způsobem.

Stejným způsobem je možno odebírat krev i u lososovitých ryb (obr. 9).



**Obr. 7.** Transverzální řez trupem juvenilního jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) s lokalizací ocasních cév v průsečíku horizontální přímkou (a) vedené napříč ocasním násadcem v rovině řitní ploutve a na ni kolmé přímkou (b) spuštěné z ventrálního výběžku kostěného štítku v laterální řadě (foto M. Flajšhans).



**Obr. 8.** Zavádění injekční jehly pod ventrální cíp dobře viditelného kostěného štítku v laterální řadě u adultního jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) (foto M. Flajšhans).



**Obr. 9.** Odběr krve sivena z ocasních cév z laterální strany (foto L. Divišová).

---

### 2.3. Stabilizace krve

---

Ke stabilizaci krve ryb se výhradně používá vodný roztok sodné soli heparinu v koncentraci 5 000 m.j./ml. Heparin inj. je velmi účinné protisrážecí činidlo distribuované v ampulkách o různém objemu. Jeden mililitr tohoto vodného roztoku obsahuje 5 000 m.j. sodné soli heparinu. Pro stabilizaci 1 ml krve ryb obvykle stačí 0,01 ml (zhruba 1 kapka) tohoto roztoku heparinu, který se ve zkumavce nebo baničce nechá zaschnout a poté se provede odběr krevního vzorku. Mírné předávkování heparinu nevyvolává změny na krevních buňkách ryb. Doporučené množství heparinu však nelze udávat všeobecně, neboť i zde hraje roli druhová specifická vlastnost. Výrazně větší množství heparinu je nutné použít např. pro stabilizaci krve u zástupců čeledi Percidae (okoun říční, candát obecný).

---

### 2.4. Stanovení ukazatelů červeného krevního obrazu

---

#### 2.4.1. Erytrocyty

---

Erytrocyty ryb jsou na rozdíl od erytrocytů savců plnohodnotnými buňkami s oválným jádrem, které je situováno ve středu erytrocytu. Tvar erytrocytu je oválný. Erytrocyt například u kapra obecného dosahuje velikosti 12  $\mu\text{m}$ . Eliptický a diskovitý tvar erytrocytu je významným evolučním znakem ryb.

Krevní barvivo ve zralém rybím erytrocytu je rozloženo difuzně a odpovídá izochromii s uniformním růžovým odstínem cytoplazmy erytrocytů. Anisochromie je signálem zvýšené erythropoézy.

#### 2.4.2. Stanovení počtu 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:

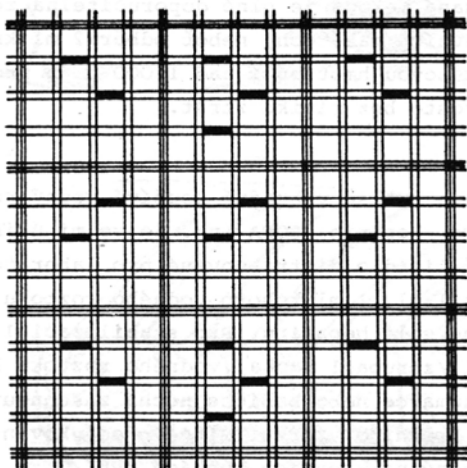
chlorid rtuťnatý $\text{HgCl}_2$ – sublimát	2,5 g
síran sodný $\text{Na}_2\text{SO}_4$	25 g
chlorid sodný $\text{NaCl}$	5 g
destilovaná voda	ad 1 000 ml.

Hayemův roztok je jedovatý, protože obsahuje jako prostředek fixujících krvinky sublimát ( $\text{HgCl}_2$ ). Před použitím se připravený Hayemův roztok filtruje přes filtrační papír.

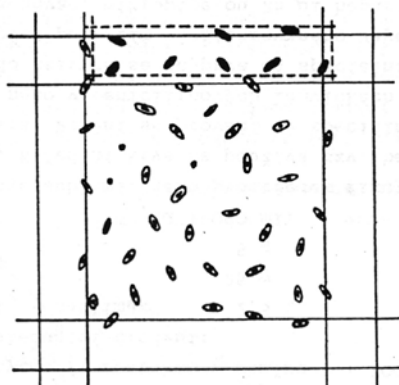
K ředění krve se používá tzv. baničkové metody podle Bürkera. Ředění se provádí ve speciálních skleněných baničkách nebo v penicilinových lahvičkách o objemu cca



15 až 25 ml, do kterých se nejprve nadávkuje automatickou pipetou přesně 4 975  $\mu\text{l}$  Hayemova roztoku a potom mikropipetou 25  $\mu\text{l}$  odebrané heparinizované krve. Špička mikropipety se opětovným nasáním roztoku několikrát propláchne, aby došlo k dokonalému vymytí krve, poté se banička uzavře gumovou zátkou a její obsah se promíchává krouživým pohybem po dobu jedné minuty. Kapátkem nebo Pasteurovou pipetou se naplní počítací Bürkerova komůrka (hemocytometr) naředěnou krví. Erytrocyty se počítají ve 20 obdélnících stejnoměrně rozmístěných po celé mřížce počítací komůrky (obr. 10). Zpravidla se počítá při zvětšení 200x. 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, a to uvnitř i vně (obr. 11). Celkové napočítané množství erytrocytů se vydělí číslem 100 a výsledný počet je množství erytrocytů v  $\text{T.l}^{-1}$  (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.



**Obr. 10.** Nárys mřížky Bürkerovy komůrky. Počet erytrocytů se stanovuje ve 20 tmavě vyznačených obdélnících stejnoměrně rozmístěných po celé mřížce (Svobodová a kol., 1986).



**Obr. 11.** Způsob počítání erytrocytů: tmavě jsou označeny erytrocyty, které se počítají (Svobodová a kol, 1986).

Stanovení počtu erytrocytů lze provádět také v heparinované krvi ředěné roztokem Natt-Herrick v poměru 1 : 200. Postup je stejný jako při použití Hayemova roztoku, složení roztoku Natt-Herrick je uvedeno v kapitole 2.5.1. Počet leukocytů.

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

### 2.4.3. Hemoglobin

Vlastním zprostředkovatelem přenosu krevních plynů je hemoglobin. Svoji základní strukturou je obdobný červenému krevnímu barvivu savců. Oproti savčímu hemoglobinu se vyznačuje větší afinitou ke kyslíku.

### 2.4.4. Stanovení množství hemoglobinu (Hb)

Ke stanovení množství hemoglobinu v krvi ryb je používána fotometrická kyano-hemoglobinová (hemiglobinkyanidová) metoda. Princip metody spočívá v tom, že pomocí transformačního roztoku se hemoglobin uvolní z erytrocytů a převede se na stálý kyanohemoglobin (hemiglobinkyanid), který se stanoví fotometricky.

Jako transformační roztok lze použít **roztok podle van Kampena a Zijlstra**:

ferrikyaniid draselný $K_3[Fe(CN)_6]$	0,20 g
kyaniid draselný KCN	0,05 g
dihydrofosforečan draselný $KH_2PO_4$	0,14 g
destilovaná voda	ad 1 000 ml

Jako transformační roztok lze použít také **roztok podle Drabkina**:

ferrikyaniid draselný $K_3[Fe(CN)_6]$	0,20 g
kyaniid draselný KCN	0,05 g
hydrogenuhličitan sodný $NaHCO_3$	1,0 g
destilovaná voda	ad 1 000 ml

Vzhledem k přítomnosti kyanidu draselného jsou oba transformační roztoky jedovaté. Uchovávají se v tmavé reagenční lahvi v chladničce a jsou stále po dobu 3–4 týdnů. Zmraznutím 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, automatickou pipetou se přidá 25  $\mu$ l (popř. 20  $\mu$ l) čerstvě odebrané nebo heparinizované krve a obsah zkumavky se ihned promíchá. Vyšetření heparinizované krve ryb na množství hemoglobinu musí být provedeno nejpozději 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 kyanohemoglobin 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 kyanohemoglobinu je stále nejméně 24 hodin. Vlastní měření extinkce vzorku se provádí fotometricky 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 kyanohemoglobinového komerčně připraveného standardu a transformačního roztoku. Standard Hb je nutno skladovat při teplotě 2 až 10 °C a chránit před zmraznutím. Koncentrace kyanohemoglobinu je vyznačena na štítku.

V některých případech není roztok po přidání krve do transformačního roztoku homogenní a dojde k vytvoření shluků jemných vláken. Tyto útvary lze odstranit sedimentací vláken nebo filtrací roztoku, případně odsátím vláken Pasteurovou pipetou.

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

### 2.4.5. Methemoglobin

---

Methemoglobin vzniká oxidací  $\text{Fe}^{2+}$  v hemoglobinu na  $\text{Fe}^{3+}$ . Obsah methemoglobinu v krvi ryb závisí značně na koncentraci dusitanů ve vodě. Při vyšších koncentracích dusitanů ve vodě může podíl methemoglobinu představovat až 80% z celkového obsahu hemoglobinu. U ryb existuje velká individuální citlivost k oxidaci hemoglobinu a variabilita aktivity methemoglobinreduktázy. Například ve skupině ryb vystavené stejné koncentraci dusitanů se může podíl methemoglobinu pohybovat v rozmezí 20–50%.

### 2.4.6. Stanovení methemoglobinu (MetHb)

---

Pro stanovení relativního obsahu methemoglobinu v krvi ryb je používána metoda, která využívá absorpčního maxima methemoglobinu při vlnové délce 630 nm. Přídavkem kyanidu draselného se methemoglobin přemění v kyanmethemoglobin, který v této oblasti nemá charakteristickou absorpci, takže pokles absorbance při 630 nm je úměrný koncentraci methemoglobinu.

V jedné části vzorku (A) se převede veškerý hemoglobin ferrikyanidem draselným na methemoglobin, který po přidavku kyanidu draselného přejde na kyanmethemoglobin.

V druhé části vzorku (B) se převede na kyanmethemoglobin pouze ten methemoglobin, který byl původně ve vzorku přítomen. Rozdíl absorbancí vzorku (A) a (B) při 630 nm je přímo úměrný koncentraci methemoglobinu.

#### **Pracovní postup:**

Do 5 ml destilované vody ve zkumavce se odměří 0,2 ml krve. Odstředí se při 1 000 G po dobu 10 minut, vodní hemolyzátní se stáhne polyethylenovou pipetou do zásobní zkumavky.

**Schéma postupu:**

Zkumavka	A	B
Vodný hemolyzáť	1,5 ml	1,5 ml
Fosfátový pufr	1,5 ml	1,5 ml
Roztok ferrikyanidu draselného	1 kapka	–
Destilovaná voda	–	1 kapka
Změřit absorbanci proti destilované vodě při 630 nm		
Naměřená absorbance:	<b>M<sub>1</sub></b>	<b>N<sub>1</sub></b>
Roztok kyanidu draselného	1 kapka	1 kapka
Po uplynutí 5 minut změřit absorbanci proti destilované vodě při 630 nm		
Naměřená absorbance:	<b>M<sub>2</sub></b>	<b>N<sub>2</sub></b>

**Výpočet:**

$$\text{Methemoglobin [ \% ]} = \frac{(N_1 - N_2) \cdot 100}{M_1 - M_2}$$

Stanovení je možno uskutečnit do 48 hodin po odběru krve. Vzorky je nutno uchovávat při teplotě 3 °C a bez přístupu vzduchu.

## Pracovní roztoky:

- 1) Fosfátový pufr:
 

Kyselý fosforečnan draselný (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	5,572 g
Fosforečnan sodný (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	3,560 g
Destilovaná voda	500 ml
  
- 2) Roztok ferrikyanidu draselného:
 

Ferrikyanid draselný (K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> )	5 g
Destilovaná voda	100 ml
  
- 3) Roztok kyanidu draselného:
 

Kyanid draselný (KCN) (Pozor, prudký jed!)	1 g
Destilovaná voda	20 ml

Stejně jako u stanovení hemoglobinu se i u vodného hemolyzátu při stanovení methemoglobinu mohou vytvořit shluky jemných vláken. Tyto útvary lze odstranit sedimentací, filtrací přes filtrační papír, případně odsátím Pasteurovou pipetou.

Orientačně lze zvýšené množství methemoglobinu zjistit podle zbarvení krve kápnuté na filtrační papír, ale pro srovnání je potřeba mít k dispozici krev od kontrolní ryby (obr. 12).

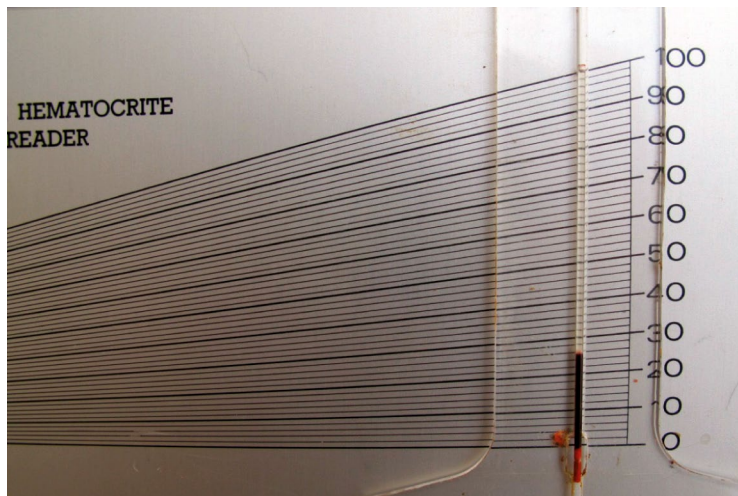


**Obr. 12.** Červenohnědá barva krve s obsahem methemoglobinu více než 50% (vpravo) na filtračním papíru v porovnání s krví kontrolní (vlevo) (foto L. Divišová).

#### 2.4.7. Hematokritová hodnota (PCV, Hk)

Hematokritová hodnota vyjadřuje poměr objemu 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 dokonalým odstředěním krve v heparinizovaných kapilárách. V ichtyohematologii se používají ke stanovení hematokritové hodnoty výlučně heparinizované kapilárky dlouhé 7,5 cm. Čerstvě odebraná nestabilizovaná nebo heparinizovaná krev (maximálně do 4 hodin po odběru při uložení v teplotě do 4 °C) se nasaje do kapilárek zhruba do 2/3 výšky a jeden konec se utěsní pomocí modelovací hmoty nebo sklenářského kitu tak, aby mezi krví a těsnicí hmotou nezůstal vzduch. Kapiláry se vloží do hematokritové odstředivky (počet otáček 14 000 za minutu) a odstřeďují se po dobu 3 minut. Po odstředění se na hematokritovém měřidle přímo odečítají procenta hematokritu (obr. 13). Zjištěná hodnota v % se vynásobí koeficientem 0,01 a výsledná hodnota PCV se udává v jednotkách l.l<sup>-1</sup>.

Stanovení hematokritové hodnoty se pro svoji jednoduchost a přesnost stalo jedním ze základních vyšetření červené krevní složky u ryb. Hodnoty hematokritu se pohybují u kaprů zhruba v rozmezí 0,28–0,40 l.l<sup>-1</sup>, u pstruhů duhových v rozmezí 0,30–0,45 l.l<sup>-1</sup>.



**Obr. 13.** Odečítání hodnoty hematokritu na hematokritovém měřidle (foto L. Divišová).

#### 2.4.8. Základní hodnoty erytrocytu a jejich výpočet

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

Hodnotu středního objemu erytrocytu je možno vypočítat z hematokritové hodnoty (PCV) udané v l.l<sup>-1</sup> a počtu erytrocytů (Er) v T.l<sup>-1</sup> 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.

##### **Hemoglobin erytrocytu (MCH)**

Hodnota hemoglobinu erytrocytu vyjadřuje průměrnou koncentraci hemoglobinu v jednotlivých erytrocytech a udává se v pikogramech – pg (10<sup>-12</sup> g). Vypočítá se z hodnoty hemoglobinu v g.l<sup>-1</sup> a z počtu erytrocytů (Er) v T.l<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> a z hematokritové hodnoty (PCV) udané v l.l<sup>-1</sup> podle následujícího vzorce:

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

Hodnota střední barevné koncentrace se pohybuje u zdravých kaprů obecných v rozmezí 0,20–0,26 l.l<sup>-1</sup>, u zdravých pstruhů duhových v rozmezí 0,17–0,20 l.l<sup>-1</sup>.

## **2.5. Stanovení ukazatelů bílého krevního obrazu**

### **2.5.1. Počet leukocytů (Leuko)**

Stanovení počtu leukocytů u ryb se provádí v heparinizované krvi ředěné roztokem Natt-Herrick v poměru 1 : 200.

Příprava a složení roztoku Natt-Herrick:

Chlorid sodný (NaCl)	3,88 g
Síran sodný (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	2,50 g
Hydrogenfosforečnan sodný (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1,74 g
Dihydrogenfosforečnan draselný (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,25 g
Formaldehyd 37%	7,5 ml
Methylová violet 2B	0,1 g

Doplnit destilovanou vodou do objemu 1 litr, nechat ustát 24 hodin a přefiltrovat přes filtrační papír.

K ředění krve se používají speciální skleněné baničky nebo penicilinové lahvičky o objemu 15–25 ml. Do ředících nádobek se napipetuje 4 975 µl roztoku Natt-Herrick a potom se přidá mikropipetou 25 µl heparinizované krve. Špička mikropipety se opětovným nasátím a vypuštěním roztoku několikrát propláchne, aby došlo k dokonalému vymytí krve. Nádobka se uzavře gumovou zátkou a její obsah se promíchává krouživým pohybem 2–3 minuty. Pro lepší rozlišení malých lymfocytů od trombocytů



je potřeba nechat barvit krvinky v roztoku 10–15 minut. Poté se opatrným nasáváním a vypouštěním Pasteurovou pipetou roztok znovu promíchá a Bürkerova komůrka (hemocytometr) se naplní naředěnou krví. Leukocyty se počítají ve 100 velkých čtvercích. Zpravidla se počítá při zvětšení 200x. Při počítání se postupuje tak, že se počítají všechny leukocyty, které jsou uvnitř velkých čtverců. Z leukocytů, které se dotýkají stran, se počítají jen ty, které se dotýkají pravé a horní strany uvnitř nebo vně (obr. 11). Celkové napočítané množství leukocytů ve 100 velkých čtvercích se dělí dvěma a výsledkem je počet leukocytů udávaný v  $G.l^{-1}$  ( $G$ -giga =  $10^9$ ). Stanovení počtu leukocytů je vhodné provádět bezprostředně po odběru krve.

Výhodou ředění roztokem Natt-Herrick je to, že po naředění krve v tomto roztoku lze počítat červené i bílé krvinky. Je potřeba však zohlednit to, že nejprve se musí spočítat červené krvinky, které rychleji hemolyzují, následně se mohou počítat bílé krvinky.

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

### 2.5.2. 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. Leukokritová hodnota je stanovována jako podíl šedobílé vrstvy leukocytů z celkového krevního sloupce. Celý sloupec krve v mikrokapiláře se měří pravítkem nebo posuvným měřítkem. Výška vrstvy leukocytů se měří pod mikroskopem s použitím okulárového mikrometru při 60násobném zvětšení. Naměřené hodnoty musí být ve stejných jednotkách – např. mm. Výsledná hodnota je v jednotkách  $l.l^{-1}$ .

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. Hodnoty leukokritu u kaprů se pohybuji 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).

### 2.5.3. 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 granul 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 prvním 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:

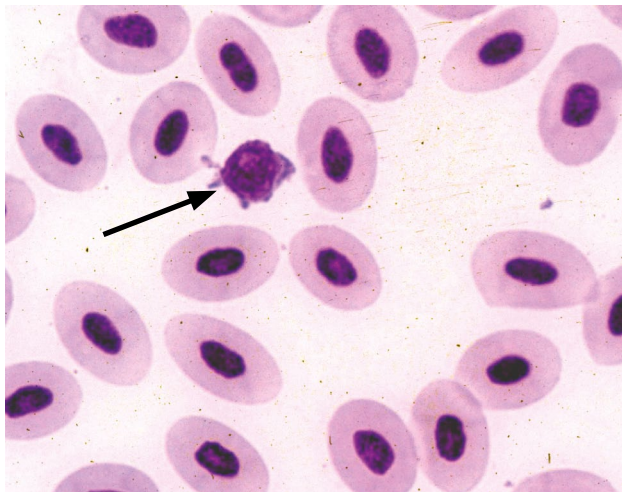
#### Lymfocyty

Jádro je vždy poměrně velké, kulovité, hutné, sytě bazofilní, má bohatý obsah chromatinu stočeného v karyoplazmě v hustou spleť vláken a uzlů způsobujících, že struktura jádra je zjevně hrudkovitá, pachychromatická. Cytoplazma je blankytně modrá, bez granulí nebo s ojedinělými azurovými zrny, obepíná buď zčásti nebo celé jádro jako souvislý lem, často jenom úzký, někdy tvořící výběžky nebo nahloučení cytoplazmy na některé části obvodu jádra (obr. 14). U části lymfocytů cytoplazmatický obal zcela chybí, takové lymfocyty označujeme jako nahojaderné (zpravidla část malých lymfocytů). Lymfocyty dělíme na malé (cca 90 % všech lymfocytů) a velké s velkými zpravidla lehce řídkými jádry a velkým souvislým cytoplazmatickým lemem. Velikost lymfocytů se pohybuje mezi 7 až 9  $\mu\text{m}$ . Počet lymfocytů kolísá u kapra mezi 76 až 97,5 % všech leukocytů.

#### Lymfocytární vývojová řada

Kmenovými buňkami této řady jsou lymfoblasty. Jsou to poměrně velké lymfocyty o průměru 10 až 15  $\mu\text{m}$ , okrouhlého tvaru. Velké je zejména bazofilně se barvící jádro

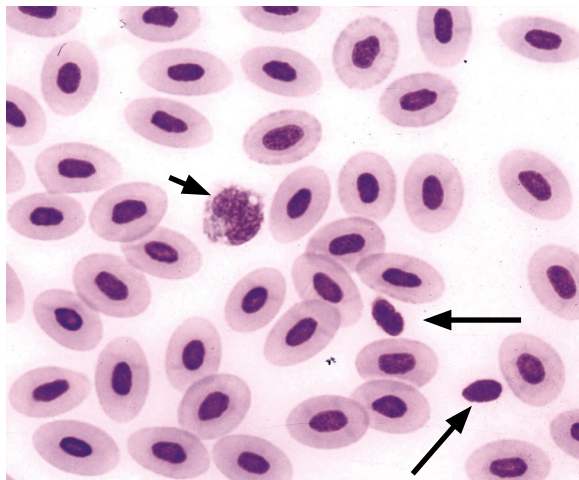
se zřetelnými hrudkami chromatinu a zřetelnými jádérky. Cytoplazma je bazofilní a má vláknitou strukturu bez jakýchkoli zrn. Prolymfocyty mají jádérka v optickém mikroskopu již neviditelná. Cytoplazma nabývá charakteristického lymfocytového vzhledu a často tvoří jenom úzký lem okolo jádra. Celá buňka se zmenšuje, přičemž ztuhnutí karyoplazmy i cytoplazmy je shodné.



**Obr. 14.** Malý lymfocyt (označen šipkou) (kapr obecný) (foto H. Modrá).

### Monocyty

Monocyty se řadí mezi největší buněčné elementy krve ryb. Dosahují velikosti 15 až 18  $\mu\text{m}$  a vzácně i více. 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 větší než u lymfocytů. Vyskytují se v ní často jemná azurofilní zrna nařalovělé barvy, která jsou rozptýlená po buňce (obr. 15). Percentické 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 poškozené erythrocyty a rozkládat jejich uvolněný hemoglobin na bilirubin. Významný podíl mají také na syntéze lipidů, proteinů a v neposlední řadě na tvorbě protilátek.



**Obr. 15.** Monocyt (označen krátkou šipkou) a trombocyty (označeny dlouhými šipkami) (kapr obecný) (foto: H. Modrá).

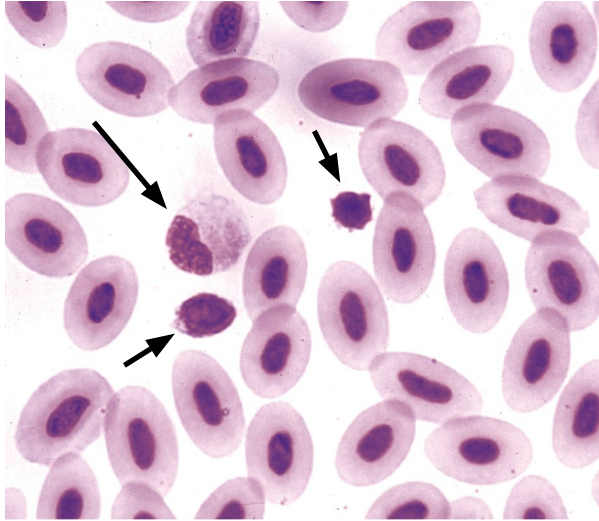
### Monocytární vývojová řada

Mateřskou buňkou této řady je monoblast, dosahující velikosti 14 až 18  $\mu\text{m}$  a mající jádro s vláknitou strukturou. Cytoplazma, jíž je poměrně málo, je výrazně bazofilní. Vyzráváním monoblastu vzniká promonocyt. Je větší a měří již kolem 20  $\mu\text{m}$ . 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 neostře a nepravidelné jako u většiny monocytů.

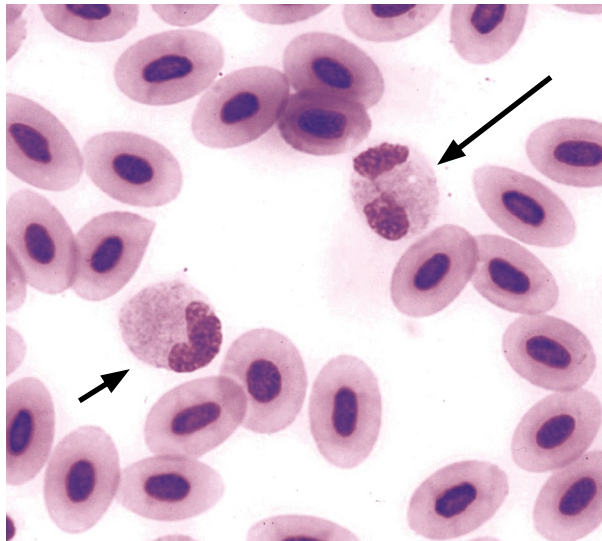
### Neutrofilní granulocyty

Do této buněčné kategorie zařazujeme celou řadu vývojových stadií těchto buněk. Jejich společným znakem je přítomnost různého množství granúl, která buď zcela, nebo jenom částečně a na různém stupni denzity vyplňují cytoplazmatický prostor kolem jádra, jehož tvarové uspořádání odpovídá vývojovému stupni těchto leukocytů. Neutrofilní granulocyty s jádrem okrouhlým, zpravidla mírně excentricky uloženým označujeme jako neutrofilní myelocyty, s jádrem ledvinovitého tvaru jako neutrofilní metamyelocyty, s tyčkovitým jádrem jako neutrofilní tyčky a konečně s jádrem členěným do dvou a více segmentů jako neutrofilní granulocyty se segmentovaným jádrem (neutrofilní segmenty) (obr. 16–17). Velikost neutrofilních granulocytů kolísá mezi 5 až 10  $\mu\text{m}$  a jejich procentické zastoupení mezi leukocyty kolísá u kostnatých ryb v rozmezí

od 2 do 10%. U chrupavčitých ryb je jejich zastoupení poněkud vyšší (20–25 %). Jejich zmnožení zpravidla úzce souvisí s reakcí krvetvorby ryb na různé patogeny.



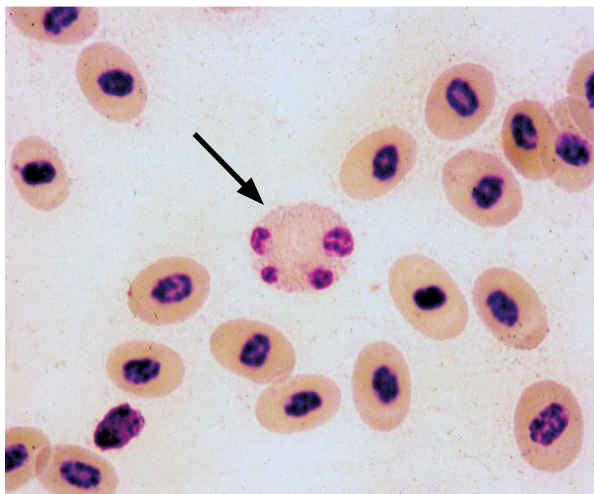
**Obr. 16.** Metamyelocyt (označen dlouhou šipkou) a lymfocyty (označeny krátkými šipkami) (kapr obecný) (foto H. Modrá).



**Obr. 17.** Neutrofilní granulocyty – tyčka (označena krátkou šipkou) a segment (označen dlouhou šipkou) (kapr obecný) (foto H. Modrá).

## Eozinofilní granulocyty

Jsou to buňky, jejichž velikost se pohybuje od 8 do 12  $\mu\text{m}$ , velikostně jsou stabilnější než předešlé granulocyty. Jejich tvar je většinou okrouhlý, jádro řídké 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 překryta 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 kostnatých ryb od 0 do 1%. U chrupavčitých ryb je, podobně jako u neutrofilních granulocytů, jejich zastoupení poněkud vyšší (3–5%) a jejich buněčná jádra vykazují rovněž větší segmentaci (až 4 seg.) (obr. 18). Tyto leukocyty mají v krvi ryb významnou detoxikační funkci nepochybně vlivem svých granul, jež obsahují histamin.



**Obr. 18.** Eozinofilní granulocyt (jeseter sibiřský) (foto M. Palíková).

## Bazofilní granulocyty

Jsou poslední buněčnou kategorií granulocytární řady. Mají zpravidla okrouhlý tvar, dosahující velikosti kolem 10  $\mu\text{m}$ . 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%.

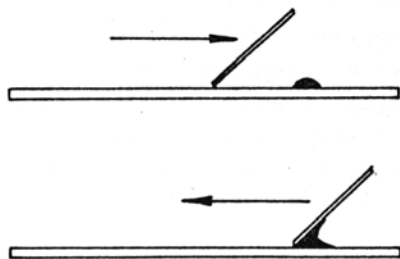
### **Granulocytární řada**

Kmenovou buňkou této řady je myeloblast. Dosahuje velikosti od 8 do 14  $\mu\text{m}$ , většinu buňky vyplňuje kruhovitě 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 prekursoru jednak nápadnou velikostí (25 až 28  $\mu\text{m}$ ), hrubší strukturou jádra, velkým lemlem cytoplazmy a zejména přítomností granul. Cytoplazma je stále ještě výrazně bazofilní, ale u myelocytů se již projasňuje zónami acidofilního charakteru. Tato acidofilie cytoplazmy se zpravidla šíří z perinukleárních okrásků 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 vyzáváním myelocytů vznikají metamyelocyty, „tyčky“ a „segmenty“.

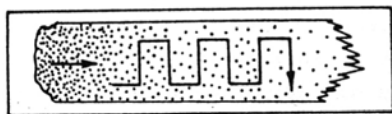
#### **2.5.4. Stanovení leukogramu**

---

Postup při stanovení leukogramu krve ryb je následující: základem je zhotovení krevního nátěru, který je připravován z nativní krve bezprostředně po jejím odběru. Vlastní krevní nátěr se provádí tak, že kapka krve velikosti barevné špendlíkové hlavičky se přenese na jeden okraj suchého, čistého a buničitou vatou očištěného podložního sklíčka, které je určeno pro krevní nátěry. Kapku lze vytvořit pomocí skleněné tyčinky nebo mikropipety. 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. 19). 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, přičemž utvoří obvykle několik cípů (obr. 20).



**Obr. 19.** Zhotovení krevního nátěru (Svobodová a kol., 1986).



**Obr. 20.** Schéma správného krevního nátěru a způsob jeho prohlížení (Svobodová a kol., 1986).

Použitě roztěrové sklíčko musí mít rovné, zabroušené hrany, aby se v nátěru nevytvořily nerovnoměrné plochy a rýhy a aby nedošlo k poškození krvinek. Roztěrové sklíčko má seříznuté rohy, aby zhotovený krevní nátěr nedosahoval okrajů podložního sklíčka.

Zhotovené krevní nátěry se po zaschnutí na vzduchu označí obyčejnou tužkou, a to přímo do krevního nátěru na jeho pravé a zpravidla densitnější straně. Výhodnější je použití podložních sklíčků s matovaným okrajem, na kterém se nátěr označuje. Při zasychání nátěrů je potřeba je chránit před prachem a dalším znečištěním (pozor na hmyz, pro který jsou krevní nátěry velmi lákavé). Barvení krevních nátěrů krve ryb je nutno, na rozdíl od krve savců, provádět s ohledem na značně aktivní povrch buněk co nejdříve po zhotovení.

Pro panoptické barvení krevních nátěrů za účelem stanovení leukogramu se používá **Pappenheimova barvicí metoda**, jejíž postup je následující:

- 1) Krevní nátěr se převrství zředěným roztokem barviva May-Grünwald. Barvivo se nanáší skleněnou pipetou určenou pouze pro tento účel. Barvivo se nechá působit 3 minuty. (V této fázi dochází k fixaci buněk alkoholem barvicí směsí).
- 2) Na May-Grünwaldovo barvivo se nakape cca 25 kapek pufrované destilované vody (pH by mělo být v rozmezí 6,8–7,0). Voda se za vzniku vírů smísí s alkoholem, a tím se vytvoří vodný roztok, který má barvicí schopnost. Doba barvicí fáze je 2 minuty.



- 3) Roztok z nátěrů se slije a sklíčka s nátěry se ihned převrství zředěným roztokem barviva Giemsa-Romanowski. Roztok barviva Giemsa-Romanowski se ředí pufovanou destilovanou vodou v poměru 1 : 9 – 1 : 40. Ředění a dobu barvení je nutno předem odzkoušet. Doba této fáze barvení je obvykle 20 minut. Tímto barvivem se barví především jádra buněk.
- 4) Barvivo z nátěrů se slije, nátěry se opláchnou proudem vody a nechají se uschnout v kolmé nebo šikmé poloze na vzduchu.

Pro barvení krevních nátěrů se může využít i zjednodušená metoda:

- 1) Nátěry se fixují metanolem po dobu 5 minut. (Před další manipulací musí nátěry uschnout. Po této fixaci lze provést barvení i s časovým odstupem.)
- 2) Nátěry se překryjí zředěným roztokem barviva May-Grünwald (v poměru 1 : 1) na dobu 4 minut.
- 3) Barvivo se slije a nátěry se převrství barvivem Giemsa-Romanowski (naředěným 1 : 9 pufovanou vodou) na dobu 15 minut.
- 4) Barvivo z nátěrů se slije, nátěry se opláchnou proudem vody a nechají se uschnout v kolmé nebo šikmé poloze na vzduchu.

Pro pufování destilované vody se používají dva pufrы:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (9,078 g v 1 litru destilované vody) a  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (23,876 v 1 litru destilované vody). Pufrы se smíchají v poměru 2 : 3 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ). Výsledné pH by mělo být v rozmezí 6,8–7,0, ke snížení pH se může použít 0,2 M roztok HCl (0,2M HCl: 17,6 ml 35% HCl do 1 litru destil. vody).

Pro každou sadu vzorků krve je potřeba odzkoušet poměr ředění barviva Giemsa-Romanowski a dobu barvení. Pokud jsou obarvená jádra nebo cytoplazma příliš tmavá, je potřeba zkrátit dobu barvení.

K barvení lze použít také komerční barvicí sady. Tyto metody jsou jednodušší a rychlejší, jsou ale finančně náročnější a při jejich využití nelze nikdy dosáhnout úplně optimálního obarvení buněk, protože je nelze příliš modifikovat.

Po zaschnutí panopticky obarvených krevních nátěrů se provádí jejich mikroskopická analýza. Prohlíží se v olejové imerzi při zvětšení nejlépe 1 000x až 1 500x 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 stolem se posouvá meandrovitým postupem pod objektiv mikroskopu (obr. 20) 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.

---

## **2.6. 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, 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 spočívá v tom, že ze dvou kapek krve na hodinovém sklíčku se nasaje krev do heparinizované mikrokapiláry pro stanovení hematokritu a leukokritu. Po odečtení hematokritu a leukokritu se odlomí kapilára nad sloupcem krevních buněk a z kapiláry se odkápnou krevní plazma pro refraktometrické stanovení celkových proteinů založené na měření indexu lomu. Pro toto stanovení se osvědčilo použití Abbeova refraktometru. Z krve na hodinovém sklíčku se dále napipetuje krev pro stanovení hemoglobinu. Stanovení shora uvedených hematologických ukazatelů je popsáno v příslušných předcházejících kapitolách. Při odběru krve a stabilizaci krevního vzorku, jakož i po odstředění mikrohematokritových kapilár je nutno si také pečlivě všimnout případných vizuálních abnormalit 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 +++). Koncentrace celkových proteinů se u kapra pohybuje v rozmezí 20–40 g.l<sup>-1</sup>. Současně s tímto hematologickým vyšetřením se provádí také potřebná biometrická stanovení u ryb a poté i obvyklá veterinární prohlídka. Pokud to množství odebrané krve dovolí, je vhodné ZHKT doplnit krevním nátěrem pro následné odečtení leukogramu.

### 3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

Od vydání první metodiky hematologického vyšetřování ryb uplynulo již 26 let, v průběhu kterých autoři nashromáždili řadu nových zkušeností, o které je nová metodika obohacena. Nová metodika je rovněž rozšířena o významné množství názorné fotodokumentace metod odběrů krve, k lepšímu určení jednotlivých typů leukocytů poslouží fotografie krevních nátěrů.

### 4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena pro veterinární lékaře pracující v oblasti rybářství a akvakultury, pro rybářské specialisty hodnotící kondiční stav ryb a pro vědecké pracovníky, kteří sledují vliv různých faktorů na zdravotní stav ryb.

Metodika rozšiřuje možnosti vyšetření zdravotního stavu ryb také na recirkulačních systémech, zejména pokud jde o kontrolu stavu účinnosti biologických filtrů, na kterých dochází k odbourávání odpadních látek dusíkatého metabolismu ryb.

### 5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Zkvalitnění přístrojového vybavení laboratoří umožňuje oproti dřívějšímu mnohem širší využití hematologického vyšetření krve ryb. Ekonomický přínos metodiky vychází z předpokladu včasné diagnostiky poškození ryb dusitany. Využívání předloženého metodického postupu, zejména preventivního stanovování methemoglobinu v krvi ryb, může významně přispět k zefektivnění a zkvalitnění diagnostiky příčin poškození a úhynu ryb na recirkulačních systémech. Předpokládáme, že zavedením těchto preventivních opatření dojde ke snížení ztrát o 2–3 %, což bude představovat například pro podnik s produkcí 30 tun lososovitých ryb finanční částku ve výši 60 000 až 90 000 Kč ročně.

## 6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Campbell, T.W., 2006. Hematology of Fish. In: Thrall, M.A. et al., Veterinary Hematology and Clinical Chemistry, Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom, pp. 277–289.
- Campbell, T.W., Ellis, Ch.K., 2007. Avian & Exotic Animal Hematology & Cytology. 3rd Edition, Blackwell Publishing, Ames, USA, 287 pp.
- Doubek, J. a kol., 2003. Veterinární hematologie. Noviko a.s., Brno, 464 s.
- Hrubec, T.C., Smith, S.A., 2010. Hematology of Fishes. In: Weiss, D.J., Wardrop, K.J. (Eds), Schalm's Veterinary Hematology, 6th Edition, Blackwell Publishing Ltd, Ames, USA, pp. 994–1003.
- Palíková, M., Mareš, J., Jirásek, J., 1999. Characteristics of leukocytes and thrombocytes of selected sturgeon species from intensive breeding. Acta Veterinaria Brno 68: 259–264.

## 7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Pravda, D. (Ed.), 1985. Prvá celostátní ichthyohematologická konference, sborník přednášek a dokumentů. ČSVTS JmK Brno, 165 s. (bez dedikace)
- Pravda, D., Svobodová, Z., 2003. Hematologie ryb. In: Doubek, J. a kol. (Eds), Veterinární hematologie, Noviko a.s., Brno, 381–405. (bez dedikace)
- Pravda, D., Svobodová, Z., Paláčková, J., Ondra, P. (Eds), 1989. Druhá celostátní ichthyohematologická konference ČSVTS se zahraniční účastí, Sborník přednášek a dokladů s anglicko-českými souhrny, ČSVTS Praha, 350 s. (bez dedikace)
- Svobodová, Z., Kroupová, H., Modrá, H., Flajšhans, M., Randák, T., Savina, L.V., Gela, D., 2008. Haematological profile of common carp spawners of variol breeds. Journal of Applied Ichthyology 24 (1): 55–59. (dedikace: MSM 6007665809, MSM 6215712402, LC06073)
- Svobodová, Z., Pravda, D., Paláčková, J., 1986. Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb. Edice Metodik, VÚRH, Vodňany, č. 22, 36 s. (bez dedikace)
- Vykusová, B., Svobodová, Z., Máchová, J. (Eds), 1993. Proceedings of the 3rd Ichthyohaematological Conference Litomyšl, VÚRH, Vodňany, 166 pp. (bez dedikace)
- Vykusová, B., Kolářová, J., Svobodová, Z. (Eds), 1995. Proceedings of the 4th Ichthyohaematological Conference Hluboká n/Vlt., VÚRH, Vodňany, 127 pp. (bez dedikace)
- Vykusová, B. (Ed.), 1998. Vth International Ichthyohaematology Conference. Abstract Book. RIFCH, Vodňany, 26 pp. (bez dedikace)



**Externí odborný oponent***Doc. MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D.**Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Palackého třída 1-3, 612 42 Brno***Interní odborný oponent***MVDr. Eliška Zusková, Ph.D.**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany***Oponent za státní správu***Ing. Vladimír Gall**MZe Praha**Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství (16230)**Těšnov 17, 117 05 Praha 1**Osvědčení o uplatněné certifikované metodice č. 122/2012 – 16230 / Nmet – certifikovaná metodika ze dne 21. 12. 2012**Vydalo: Ministerstvo zemědělství, úsek lesního hospodářství, Sekce lesního hospodářství, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství, Těšnov 17, 117 05 Praha 1.***Adresa autorského kolektivu***Prof. MVDr. Zdeňka Svobodová, DrSc. (40 %)**Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, Palackého třída 1-3, 612 42 Brno, [www.vfu.cz](http://www.vfu.cz)**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany, [www.frov.jcu.cz](http://www.frov.jcu.cz)**Prof. MVDr. Drahošlav Pravda, CSc. (40 %)**Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Palackého třída 1-3, 612 42 Brno, [www.vfu.cz](http://www.vfu.cz)**Doc. MVDr. Helena Modrá, Ph.D. (20 %)**Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, Palackého třída 1-3, 612 42 Brno, [www.vfu.cz](http://www.vfu.cz)**V edici Metodik (Technologická řada) vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,**Fakulta rybářství a ochrany vod.**Zátiší 728, 389 25 Vodňany**Redakce: MVDr. Jitka Kolářová, Ing. Blanka Vykusová, CSc., Zuzana Dvořáková**Náklad: 200 ks, vtištěno v roce 2012, 1. vydání**Grafický design a technická realizace: Jesenické nakladatelství JENA Šumperk*





**EVROPSKÁ UNIE**

**EVROPSKÝ RYBÁŘSKÝ FOND**

„Investování do udržitelného rybolovu“

