



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

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

Stanovení diferenciálního počtu leukocytů ryb

V. Piačková, M. Palíková, E. Zusková, M. Flajšhans





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

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

Stanovení diferenciálního počtu leukocytů ryb

V. Piačková, M. Palíková, E. Zusková, M. Flajšhans

**Vydání a tisk metodiky je uskutečněno za finanční podpory projektu
OP Rybářství 2007–2013:**

Metodiky IV (2014–2015); reg. č. CZ.1.25/3.1.00/13.00479



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ RYBÁŘSKÝ FOND
„Investování do udržitelného rybolovu“

Obsahová část publikace byla zpracována za finanční podpory následujících projektů:

MŠMT projektu CENAKVA (CZ.1.05/2.1.00/01.0024) – 20 %

a projektu CENAKVA II (LO1205 v rámci programu NPU I) – 20 %

Technologie chovu sladkovodních ryb s využitím recirkulačních systémů dánského typu
se zaměřením na metody efektivního řízení prostředí a veterinární péče
(NAZV QJ1210013) – 40 %

Prevence závažných infekčních nemocí kaprovitých ryb
(NAZV QJ1210237) – 20 %

č. 160

Vodňany

ISBN 978-80-7514-024-1



1. CÍL METODIKY	6
2. POPIS METODIKY	6
2.1. Úvod	6
2.2. Typy leukocytů popisované u ryb	9
2.2.1. Lymfocyty	9
2.2.2. Monocyty	12
2.2.3. Neutrofilní granulocyty	12
2.2.4. Eozinofilní granulocyty	14
2.2.5. Bazofilní granulocyty	15
2.2.6. Heterofilní granulocyty	15
2.2.7. Vývojová stadia krvinek	15
2.2.8. Trombocyty	17
2.3. Vlastní metodický postup	18
2.3.1. Odběr krve	18
2.3.2. Zhotovení krevního nátěru	21
2.3.3. Barvení	23
2.3.4. Mikroskopie barvených nátěrů	26
2.4. Diferenciální počet leukocytů sladkovodních ryb	27
2.4.1. Diferenciální počet leukocytů kostnatých ryb (Teleostei)	27
2.4.2. Diferenciální počet leukocytů chrupavčitých ryb (Chondrostei)	45
2.5. Změny v diferenciálním počtu leukocytů	49
2.6. Parazité, kteří mohou být identifikováni v krevním nátěru	52
2.6.1. <i>Trypanosoma</i> sp., <i>Trypanoplasma</i> sp.	52
2.6.2. <i>Haemogregarina</i> sp.	53
2.6.3. <i>Sphaerospora dykovae</i> (dříve <i>S. renicola</i>)	54
3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“	56
4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	56
5. EKONOMICKÉ ASPEKTY	56
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	57
7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	62

1. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je poskytnout specializovaným pracovištím i praktickým veterinárním lékařům metodický návod ke stanovení diferenciálního počtu leukocytů ryb. Kromě pracovního postupu metodika obsahuje rozsáhlou obrazovou přílohu krevních nátěrů různých druhů ryb, která bude uživatelům sloužit pro porovnání s jejich vlastními nálezy.

2. POPIS METODIKY

2.1. Úvod

Stanovení diferenciálního počtu leukocytů se provádí jako součást hematologického vyšetření ryb spolu se stanovením celkového počtu leukocytů a erytrocytů, hodnoty hematokritu a koncentrace hemoglobinu. Vyšetřením krve ryb je možno doplnit diagnostiku některých nemocí nebo otrav ryb, ale především se provádí při vyhodnocování vlivu různých látek a patogenů na ryby v experimentálních nebo poloprovozních podmínkách.

Na výsledky hematologického vyšetření může mít vliv pohlaví ryb (Svobodová a kol., 1978; Habekovič, 1991; Flajšhans a kol., 2004), fáze reprodukčního cyklu (Svobodová a kol., 1978; Collazos a kol., 1993; de Pedro a kol., 2005), aktuální zdravotní stav (Řehulka, 1996), stres (Pulsford a kol., 1994), zatížení vody toxickými kovy (olovo, rtuť, kadmium atd.) (Drastichová a kol., 2004; Witeska a kol., 1998; Witeska a kol., 2010) a organickými polutantů (PCB, DDT, organické pesticidy atd.) (Schweiger a kol., 1996), fyzikálně-chemické parametry vody (Jeziorska, 1993), ale též úroveň ploidie (Svobodová a kol., 1998, 2001; Flajšhans a kol., 2004, 2011) atd.

Hematologická diagnostika je u ryb mnohem náročnější než u savců. V krvi ryb jsou kromě zralých buněčných elementů přítomna také vývojová stadia krvinek a jejich třídění a nomenklatura se u jednotlivých autorů liší. Další nevýhoda spočívá v tom, že počty buněk musí být stanoveny „postaru“ manuálně, neboť jaderné erytrocyty a velmi nepatrné rozdíly ve velikosti některých typů leukocytů brání využití automatizovaných metod (Hrubec a Smith, 2006). Ke stanovení diferenciálního počtu leukocytů (leukogramu) se tedy využívá ruční barvení krevních nátěrů a počítání buněk pod světelným mikroskopem. Je třeba jistě zručnosti při zhotovování a barvení krevních nátěrů a zkušené oko při odečítání leukogramů, aby výsledky bylo možno pokládat za spolehlivé.

Nomenklatura krevních buněk ryb je z velké části převzata z hematologie savců. Při studiu literatury zabývající se bílým krevním obrazem ryb je však velmi obtížné porovnat výsledky různých autorů, protože se mnohdy liší v klasifikaci

STANOVENÍ DIFERENCIÁLNÍHO POČTU LEUKOCYTŮ RYB

a názvosloví některých typů leukocytů. Kromě shodného určování lymfocytů, které jsou v některých publikacích rozděleny na malé a velké (Kumar a kol., 1999; Hrubec a kol., 2000; Witeska a kol., 2010), většina autorů shodně uvádí ještě monocyty. Ve většině publikací pak dále nacházíme neutrofilní, eozinofilní, eventuálně bazofilní granulocyty (Oluah a Mgbenka, 2004; Singh a Srivastava, 2010; Mekkavy a kol., 2011). Některé práce uvádějí pouze souhrnnou kategorii „granulocyty“ (Tierney a kol., 2004). Někdy se v rámci neutrofilních, eventuálně i eozinofilních granulocytů setkáváme i s rozlišením jednotlivých vývojových subtypů (myelocyty, metamyelocyty, granulocyty s tyčkovým jádrem – „tyčky“, granulocyty se segmentovaným jádrem – „segmenty“) (Palíková a kol., 1999). Ojedinele se vyskytuje taky označení „heterofily“ (Rey Vázquez a Guerrero, 2007; Rey Vázquez a Lo Nostro, 2014), které pravděpodobně, ale ne zcela jistě, korespondují s neutrofilními granulocyty. Zcela výjimečně jsou do diferenciálního počtu leukocytů zahrnuty i blasty (Witeska a kol., 2010) nebo dokonce trombocyty (Tierney a kol., 2004) či buňky podobné trombocytům („trombocyte-like-cells“) (Hrubec a kol., 2000).

Klasifikace typů a subtypů leukocytů podle různých autorů je pro přehlednost uvedena v tab. 1.

Při odečítání diferenciálního počtu leukocytů je vhodné si všimnout i buněk červené krevní řady a eventuálně zaznamenat zvýšenou přítomnost nezralých forem erytrocytů, dělicích se erytrocytů (dělicí se buňky mohou být zaznamenány i v případě lymfocytů a trombocytů) nebo zralých erytrocytů s přítomností mikrojadérek. Výskyt nezralých forem erytrocytů signalizuje poruchu erythropoézy. V porovnání se zralými buňkami jsou kulatější, s větším, kulatým, centrálně uloženým, méně kondenzovaným jádrem a menším množstvím cytoplazmy. Názvosloví nezralých forem není jednotné, v literatuře se můžeme setkat s několika různými názvy pro tytéž buňky (např. rubriblast = proerytroblast = pronormoblast; prorubricyt = erytroblast = normoblast) (Thrall a kol., 2006). Tyto nezralé formy erytrocytů, některými autory označované souhrnně jako polychromatocyty, představují u klinicky zdravých ryb přibližně 1 % z celkového počtu erytrocytů (Roberts a Ellis, 2001). Kromě zvýšeného výskytu nezralých forem se např. při otravách olovem objevují morfologické anomálie erytrocytů - zvýšená kondenzace chromatinu na okrajích jádra nebo jaderné malformace (Witeska a kol., 2010) a při expozici ryb některým organickým polutantům (např. 4-tert Octylphenol v koncentraci 150 a 300 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) se mohou objevit i segmentovaná amitotická jádra (Rey Vázquez a Lo Nostro, 2014). Zvýšený výskyt nezralých, dělicích se nebo degenerovaných erytrocytů bývá zjišťován v krvi ryb, které jsou vystaveny nadměrnému stresu nebo hypoxii, a bývá také doprovodným příznakem regenerativní anémie.

Tab. 1. Přehled klasifikační typů a subtypů leukocytů uváděných různými autory (V – velké, M – malé, Myb – myeloblasty, Prom – promyelocyty, My – myelocyty, Met – metamyelocyty, Tyč – tyčiky, Seg – segmenty, TLC – thrombocyte-like-cells).

	Lymfocyty		Monocyty		Granulocyty		Blasty		Trombocyty	Reference
					neutrofilní	eosinofilní	basofilní	heterofilní		
+	+	+	+	+	+	+	+	+		Rey Vázquez a Guerrero (2007)
+	+	+	+	+	+	+	+	+		Rey Vázquez a Lo Nostro (2014)
+	+	+	+	granulocyty	+			+		Timey a kol. (2004)
+	+	+	My, Met, Tyč, Seg	My, Met, Tyč, Seg	+					Palíková a kol. (1999)
V, M	+	+	+	+	+			TLC		Hrubec a kol. (2000)
V, M	+	+	My, Met, Tyč, Seg	+	+			+		Witeska a kol. (2010)
+	+	+	+	+	+					Oluah a Mgbenka (2004)
V, M	+	+	+	+	+					Kumar a kol. (1999)
+	+	+	My, Met, Tyč, Seg	+	+					Modrá a kol. (1998)
+	+	+	+	+	+					Mekkawy a kol. (2011)
+	+	+	+	+						Singh a Srivastava (2010)
+	+	+	Myb, Prom, Met, Tyč, Seg	+	+					Svobodová a kol. (2012)

2.2. Typy leukocytů popisované u ryb

2.2.1. Lymfocyty

Lymfocyty tvoří nejpočetnější skupinu bílých krvinek v krvi ryb. U některých druhů ryb, jako je například okoun říční (*Perca fluviatilis*), mohou lymfocyty představovat téměř 100 % bílých krvinek (Modrá a kol., 1998). U kapra se podíl lymfocytů pohybuje většinou v rozmezí 76–97,5 % a velikost těchto buněk v krevním nátěru je 7–9 μm (Svobodová a kol., 2012). Většinu objemu těchto kulatých buněk zaujímá jádro obklopené tenkou vrstvou bazofilní cytoplazmy (Ferguson, 1976) (obr. 1). Kromě tohoto typického vzhledu lymfocytu můžeme v krevních nátěrech najít i buňky, u nichž cytoplazma tvoří jen velmi nepatrný nebo prakticky žádný lem kolem jádra (obr. 2), nebo obklopuje jádro pouze okrskovitě (obr. 3). Velikost lymfocytů je druhově specifická, u platýse velkého (*Pleuronectes platessa*) byl naměřen průměr 4,5 μm (Ellis, 1976), u karase stříbřitého (*Carassius auratus*) 8,2 μm (Weinreb, 1963) a u některých druhů ryb až 12 μm (Ellis, 1977).



Obr. 1. Lymfocyt kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.). Úzký lem cytoplazmy zcela obklopuje jádro. (Kresba a foto: M. Palíková)



Obr. 2. Nahojaderný lymfocyt kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.). Cytoplazmatický lem kolem jádra je velmi úzký nebo zcela chybí. (Kresba a foto: M. Palíková)

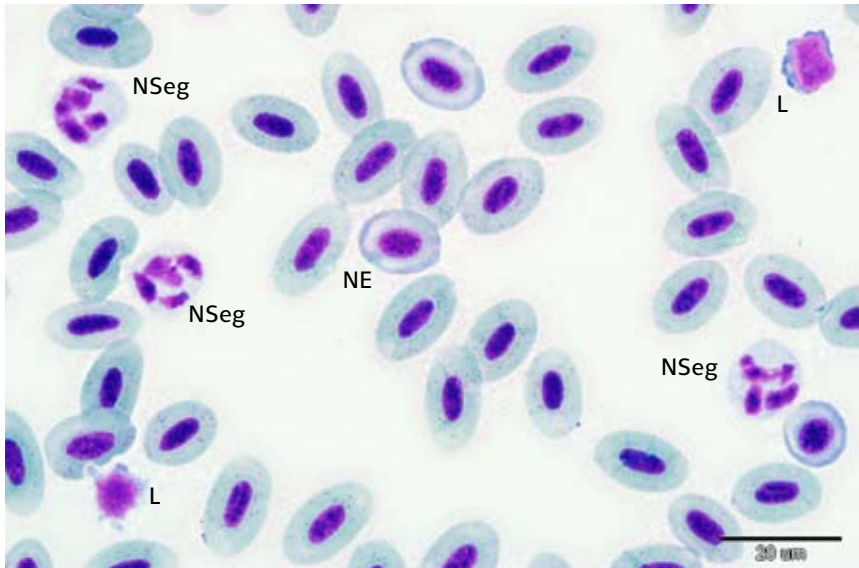


Obr. 3. Lymfocyt kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.). Cytoplazma obklopuje jádro pouze okrskovitě. (Kresba a foto: M. Palíková)

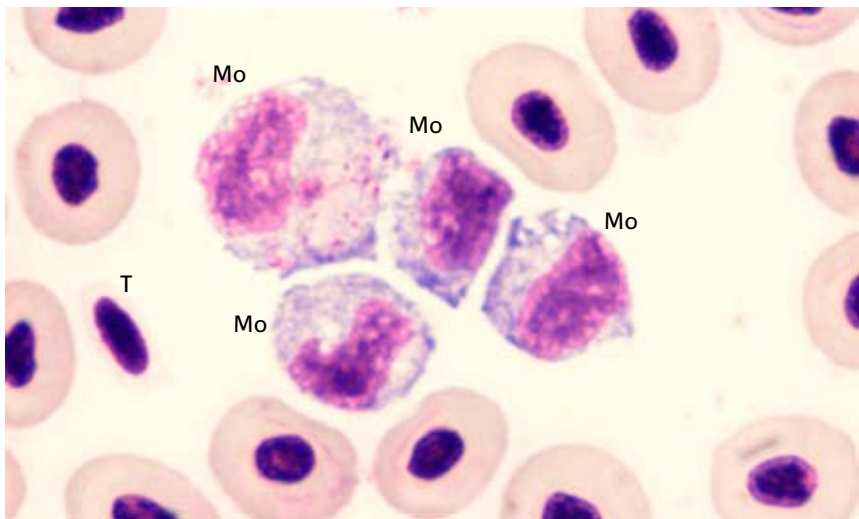
Hlavní funkcí lymfocytů je spoluúčast při imunitních reakcích. Funkčně se dělí na T-lymfocyty (účastní se na imunitě buněčné) a B-lymfocyty (účastní se na humorální imunitě tvorbou specifických protilátek) (Donner, 1985).

Při působení infekčních a toxických agens dochází ke změně poměru mezi lymfocyty a ostatními bílými krvinkami ve smyslu snížení podílu lymfocytů a vzestupu myeloidních buněk (u ryb tedy zejména neutrofilních granulocytů) a monocytů – granulocytóza a monocytóza – viz obr. 4 a 5. Tato situace v bílém krevním obrazu ryb nastává například při akutní otravě kadmíem (Drastichová a kol., 2004). Po několika týdnech chronické expozice nízkým koncentracím může naopak dojít ke zvýšení počtu lymfocytů (zejména malých), což je pravděpodobně důsledek přechodné stimulace specifické imunitní odpovědi organismu (Witeska a Baka, 2005). Setkání rybiho organismu s infekčním agens bývá doprovázeno nejdříve mírnou, ale postupně se prohlubující lymfocytózou (Ranzani-Paiva a kol., 2004).

STANOVENÍ DIFERENCIÁLNÍHO POČTU LEUKOCYTŮ RYB



Obr. 4. Zmnožení granulocytů (granulocytóza) v krevním nátěru pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*); NSeg – neutrofilní granulocyt se segmentovaným jádrem; NE – nezralý erytrocyt; L – lymfocyt. (Foto: M. Palíková)



Obr. 5. Zmnožení monocytů (monocytóza) v krevním nátěru ostroretky stěhovavé (*Chondrostoma nasus*); Mo – monocyt; T – trombocyt. (Foto: M. Palíková)

2.2.2. Monocyty

Monocyty jsou velké kulaté buňky (15–18 μm) s okrouhlým nebo podkovovitým jádrem (obr. 6). Cytoplazma se barví modře (při barvení podle Pappenheima) a je často vakuolizovaná. V periferní krvi kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) za normálních (fyziologických) podmínek tvoří asi 3–5 % leukocytů (Svobodová a kol., 2012), někdy může být jejich výskyt jen sporadický (Modrá a kol., 1998).



Obr. 6. Monocyt kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.). (Kresba a foto: M. Palíková)

Monocyty se účastní nespecifických imunitních reakcí. Zastávají funkci primárních fagocytů a jsou mnohem větší než lymfocyty (Ardelli a Woo, 2006). Doubek a kol. (2003) uvádějí, že velikost monocytů u ryb bývá 15–18 μm , vzácně i více. Po nějaké době opouštějí krevní řečiště a vstupují do tkání, kde dochází k jejich přeměně v makrofágy (Toman a kol., 2000). Při akutní otravě toxickými kovy (kadmium, olovo) se absolutní počty monocytů v periferní krvi prakticky nemění, ale někdy v důsledku poklesu počtu lymfocytů může vzrůst jejich procentuální zastoupení (Drastichová a kol., 2004; Witeska a kol., 2010). V průběhu infekčního onemocnění počet monocytů stoupá a mohou se objevit i morfologické abnormality buněk, jako např. zvýšená vakuolizace cytoplazmy (Ranzani-Paiva a kol., 2004).

2.2.3. Neutrofilní granulocyty

Neutrofilní granulocyty patří k největším buňkám v periferní krvi (Hrubec a Smith, 2006). Obvykle mají kulatý nebo mírně oválný tvar (Ainswort, 1992). U kapra dosahují velikosti 10–15 μm (Imagawa a kol., 1989). Typický rybí neutrofil barvený standardními barvicími metodami má šedou granulovanou cytoplazmu. Tvar jádra se u jednotlivých druhů liší, pro lososovité ryby je například charakteristické laločnaté jádro (obr. 9), u některých druhů se

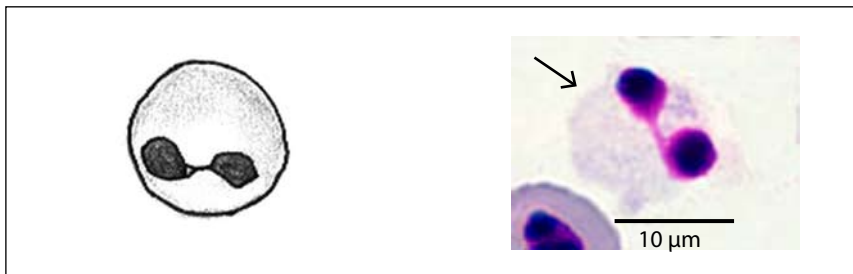
STANOVENÍ DIFERENCIÁLNÍHO POČTU LEUKOCYTŮ RYB

setkáváme spíše s oválným (Ellis, 1977). Svůj název získaly neutrofilny díky přítomnosti cytoplazmatických granul, která se výrazně nebarví ani kyselými, ani bazickými barvivy. Obsah a velikost granul se v průběhu vývoje mění (Toman a kol., 2009) a jejich barva, tvar a velikost jsou druhově specifické (Ainsworth, 1992). Zastoupení neutrofilních granulocytů v bílém krevním obrazu se liší u jednotlivých druhů ryb a může být variabilní i v rámci druhu vlivem prostředí. V krvi savců se fyziologicky vyskytují pouze zralé formy granulocytů s tyčkovitým (obr. 7) nebo segmentovaným jádrem (obr. 8 a 9). V krevních nátěrech ryb se kromě těchto dvou forem („tyčky“ a „segmenty“, viz obr. 7 a 8) běžně vyskytují i nezralé formy granulocytů (viz kap. 2.2.6.3., obr. 11 a 12).

Primární funkcí neutrofilů je fagocytóza (Ainsworth, 1992), uplatňují se v procesech nespecifické imunity. Při zánětu jsou to jedny z prvních buněk, které migrují do postižené oblasti (Rieger a Barreda, 2011). Vycestování z krevního řečiště do místa zánětu je umožněno chemotaxí. Neutrofilny mají schopnost produkovat antimikrobiální a cytotoxické látky, které jsou uloženy v neutrofilních granulích (Donner, 1985).



Obr. 7. Neutrofilní granulocyt kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) s tyčkovitým jádrem („tyčka“). (Kresba a foto: M. Palíková)



Obr. 8. Neutrofilní granulocyt kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) se segmentovaným jádrem („segment“). (Kresba a foto: M. Palíková)



Obr. 9. Neutrofilní granulocyt pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) se segmentovaným, vícelaločnatým jádrem. (Kresba a foto: M. Palíková)

Infekční onemocnění doprovázená zánětem bývají v prvních dnech charakterizována zvýšeným relativním i absolutním počtem neutrofilů. Někdy, v případech závažné infekce, může jejich množství v cirkulující krvi poklesnout (Ranzani-Paiva, 2004). Změny v počtech neutrofilních granulocytů (a v diferenciálním počtu leukocytů jako takovém) v periferní krvi ryb vystavených působení pesticidů lze jen velmi těžko zobecnit či generalizovat. Jsou závislé na citlivosti ryb, druhu látky, koncentraci a době působení (Sing a Srivastava, 2010).

2.2.4. Eozinofilní granulocyty

Eozinofilní granulocyty jsou charakteristické přítomností eozinofilně se barvicích granul v cytoplasmě (obr. 10). Velikostí se podobají neutrofilům, nebo jsou o něco menší (Hrubec a Smith, 2006). U kapra byla zaznamenána průměrná velikost eozinofilního granulocytu 13,8 μm (Imagava a kol., 1989). Výskyt eozinofilů je typický zejména po jeseterovité ryby (obr. 10), pro které je typická rovněž druhově specifická segmentace jader, např. u jesetera sibiřského (*Acipenser baerii*) bylo nalezeno až pěti-segmentové jádro (Palíková a kol., 1999).



Obr. 10. Eozinofilní granulocyt vyzy velké (*Huso huso*). (Kresba a foto: M. Palíková)

STANOVENÍ DIFERENCIÁLNÍHO POČTU LEUKOCYTŮ RYB

U kostnatých ryb je jejich výskyt sporadický (např. Modrá (1999) u lína obecného (*Tinca tinca*) uvádí $0,17 \pm 0,59$ % a u tržního kapra $0,1 \pm 0,19$ %) a vyznačují se okrouhlým, asymetricky uloženým, většinou nesegmentovaným jádrem.

2.2.5. Bazofilní granulocyty

Bazofilní granulocyty se vyskytují v krvi sladkovodních ryb velmi zřídka. Jejich cytoplazma je vyplněna a mnohdy i jádro překryto výraznými purpurovými až tmavě modrými granuly (Svobodová a kol., 1991). O jejich bližší funkci není dosud mnoho známo a někteří autoři je vůbec nepopisují (Antychowitz a Siwicki, 1992). Jejich přítomnost u ryb popisuje např. Suzuki (1986), který za možný důvod pouze ojedinělých nálezů považuje snadnou rozpustnost bazofilních granul během zpracování krevních vzorků, jak uvádí Fey (1966).

2.2.6. Heterofilní granulocyty

Někteří autoři popisují v rámci diferenciálního rozpočtu leukocytů také buňky nazvané „heterofily“ (heterofilní granulocyty) (Rey Vázquez a Guerrero, 2007; Rey Vázquez a Lo Nostro, 2014). Jsou stejné nebo o něco menší než neutrofilny a jejich cytoplazma je vyplněna světle eozinofilními nebo nafialovělými granuly. O jejich bližší funkci není dosud mnoho známo a při studiu literatury je obtížné rozlišit, jestli se skutečně jedná o heterofilní buňky, nebo jestli je toto zařazení způsobeno mylným názorem, že nesavčí druhy mají heterofily místo neutrofilů. Zajímavé ale je, že někteří autoři popisují u ryb jak neutrofilny, tak heterofily (Hrubec a Smith, 2006). Pracoviště, která se zabývají hematologií ryb v České republice, kategorii „heterofilní granulocyty“ při vyhodnocování leukogramů nepoužívají.

2.2.7. Vývojová stadia krvinek

V krevních nátěrech ryb se mohou objevovat také vývojová stadia krevních buněk. Je to způsobeno poněkud odlišnou krvetvorbou u ryb, které na rozdíl od savců postrádají diferencovanou kostní dřev a hlavními hemopoetickými orgány jsou v larválním stadiu pronefros a v dospělosti mezonefros. Diferenciace krevních buněk a jejich dozrávání odpovídá u ryb jejich evolučnímu stupni, což se projevuje přítomností nezralých krevních elementů v krevním řečišti.

2.2.7.1. Vývojová řada lymfocytů

Kromě zralých lymfocytů mohou být zaznamenána také jejich vývojová stadia, lymfoblasty a prolymfocyty. Oba typy buněk jsou větší než zralé

lymfocyty (10–15 μm) (Doubek a kol., 2003), jádro je obvykle oblé, ale může mít i nepravidelné okraje, zaujímá většinu plochy buňky a zpravidla je umístěno excentricky. U lymfoblastů je chromatin jádra méně kondenzovaný a mohou zde být viditelné hrudky chromatinu a jadérka (Schalm a kol., 1975).

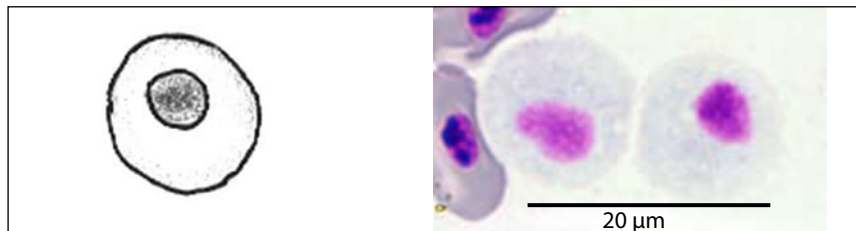
2.2.7.2 Vývojová řada monocytů

Mateřskou buňkou monocytární řady je monoblast, dosahující velikosti 14–18 μm . Kulaté jádro vyplňuje téměř celou buňku, bazofilní cytoplazma obklopuje jádro úzkým lemem. Monoblast vyzárá v promonocyt, který je ještě větší (cca 20 μm), má ledvinovité jádro s jemně vláknitým chromatinem. Na pozadí šedomodré cytoplazmy se mohou objevit azurofilní granule. Obrysy cytoplazmy jsou neostře (Doubek a kol., 2003).

2.2.7.3 Vývojová řada granulocytů

Kmenovou buňkou je myeloblast (velikost 8–14 μm , velké jádro, úzký lem silně bazofilní cytoplazmy bez granulí, dalšími vývojovými stadii jsou promyelocyt a myelocyt (velikost 25–28 μm ; obr. 11). Od myeloblastu se liší jednak nápadnou velikostí, ale také hrubší strukturou jádra a širším lemem cytoplazmy. U myelocytů se v cytoplasmě místy objevují zóny acidofilního projasnění (Doubek a kol., 2003). Následuje metamyelocyt (obr. 12), u něhož dochází ke zmenšení velikosti buňky a ke změně tvaru jádra na úzce ledvinovité, přisedlé ke stěně buňky. Další vývojová stadia, „tyčka“ a „segment“ jsou po vzoru savců pokládána za „zralá“. Většina autorů se podrobnějším určením stadií granulocytů nezabývá a spokojí se s dělením na neutrofilny, eozinofily, případně bazofily. Někteří autoři rozlišují myelocyty, metamyelocyty, „tyčky“ a „segmenty“ (Modrá a kol., 1998; Palíková a kol., 1999).

Přesné zařazení nejmladších vývojových stadií je poněkud komplikované a vyžaduje jistou zkušenost. Někdy je tedy jako součást bílého krevního obrazu zařazována obecně skupina blastů bez bližšího určení, zda se jedná o prekurzory lymfocytů, monocytů či granulocytů (Witeska a kol., 2010).



Obr. 11. Neutrofilní myelocyt tlamouna nilského (*Oreochromis niloticus*). (Kresba a foto: M. Palíková)

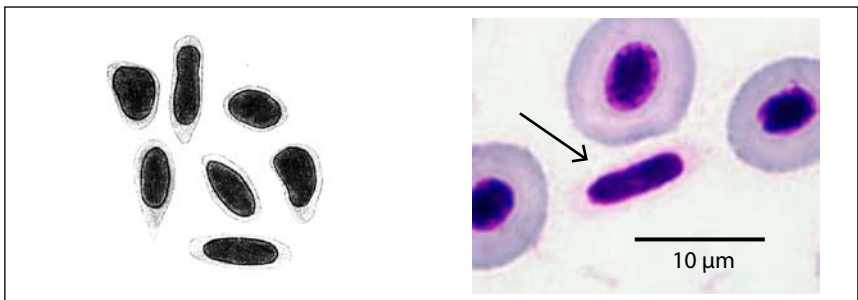


Obr. 12. Neutrofilní metamyelocyt kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.). (Kresba a foto: M. Palíková)

2.2.8. Trombocyty

Trombocyty sice nepatří mezi leukocyty, ale jsou nedílnou součástí krevních nátěrů, a proto je třeba se o nich zmínit. Jejich hlavní funkce spočívá v účasti v procesu koagulace krve. Na rozdíl od savců jsou trombocyty ryb vybaveny jádrem. Mají variabilní tvar, který závisí na stupni jejich aktivace v rámci koagulace. Mohou být špičaté, oválné, nebo zcela kulaté, vzhledem a velikostí připomínající lymfocyty (Hrubec a kol., 2006) (obr. 13). Ve starší literatuře bývají někdy označovány jako „spindlecells“ – „vřetenovité buňky“ (Ellis, 1977). Někteří autoři uvádějí u trombocytů i jistou schopnost fagocytózy (např. Thuvander a kol., 1987).

Trombocyty se v nátěrech často agregují do skupin, a jak už bylo řečeno, svým tvarem a velikostí mohou velmi připomínat lymfocyty, se kterými si je můžeme ve špatně obarvených nátěrech i splést. Při správném obarvení se odlišují barvou cytoplazmy, která je růžová (u lymfocytů modrá) a téměř vždy obklopuje celé jádro. Před vlastním odečítáním je vhodné zhruba nátěr prohlédnout, podívat se, jak je nabarvený a určit si základní buňky.



Obr. 13. Trombocyt kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.). (Kresba a foto: M. Palíková)

2.3. Vlastní metodický postup

Diferenciální počet leukocytů se odečítá z obarveného krevního nátěru za pomoci světelného mikroskopu. Metodický postup lze rozdělit do několika kroků: odběr krve, zhotovení krevního nátěru, barvení krevního nátěru a mikroskopické vyhodnocení obarveného nátěru.

2.3.1. Odběr krve

Pomůcky: utěrka, injekční jehla přiměřené velikosti, injekční stříkačka, heparin, hodinové sklíčko, papírové utěrky, jednorázové rukavice (obr. 14).



Obr. 14. Pomůcky pro odběr krve. (Foto: E. Zusková).

Při odběru krve ryb je nutné dodržovat zásady welfare dle zákona na ochranu zvířat proti týrání (č. 246/1992 Sb., ve znění pozdějších předpisů). Odběr krve se provádí bezprostředně po vylovení ryb z vody. Metoda odběru se volí podle toho, kolik krve požadujeme, jaká je velikost a další osud odebíraných ryb. Chceme-li jednotlivé ryby odebírat opakovaně, odebíráme jen nejnutnější množství krve, které je pro dané vyšetření zapotřebí. V případě krevních nátěrů stačí odebrat minimální množství (stačí 1 kapka = 0,05 ml)

STANOVENÍ DIFERENCIÁLNÍHO POČTU LEUKOCYTŮ RYB

čerstvé plné krve, anebo (pokud nemáme možnost udělat nátěr ihned po odběru) krve stabilizované antikoagulační (protisrážlivou) látkou.

Ze škály antikoagulačních látek používaných u savců se pro stabilizaci rybí krve jednoznačně nejlépe osvědčil vodný roztok sodné soli heparinu, dostupný v lékárnách na předpis humánního nebo veterinárního lékaře pod názvem **Heparin inj.** Koncentrace heparinu v tomto přípravku je 5 000 m.j. (mezinárodních jednotek)/ml. Při odběru krve sladkovodním rybám je obecně doporučeno použití 50 m.j. heparinu/ml krve (t.j. zhruba 1 kapka Heparinu inj. na 1 ml krve). Heparinem je třeba propláchnout zejména injekční jehly, které budou k odběru používány, eventuálně i stříkačky. Pokud se odebírá malé množství krve (do 1 ml), není třeba heparin odměřovat, stačí pouze propláchnout jehlu a stříkačku a přebytečný heparin vystříknout zpět do ampulky. Je vhodné nechat heparin v jehle a stříkačce před odběrem vyschnout, aby nedocházelo k naředění odebraného vzorku a v důsledku toho k hemolýze krvinek (citlivá je např. krev lína obecného (*Tinca tinca*) nebo tlamouna nilského (*Oreochromis niloticus*)).

Pro potřeby některých laboratorních analýz, jako je například stanovení oxidativního vzplanutí fagocytů, je nutno zachovat u všech odebíraných vzorků krve stejný poměr množství heparinu a krve (např. 50 m.j. na 1 ml), aby nedošlo ke zkreslení výsledků, neboť heparin fagocytární aktivitu inhibuje.

Množství heparinu, které je zapotřebí pro zabránění koagulace odebrané krve, je také vázáno na druh ryby: zatímco pro stabilizaci krve nejběžnějších druhů ryb, jako např. pstruh či kapr, stačí odběrovou stříkačku s jehlou heparinem pouze propláchnout, u okounovitých ryb (candát, okoun) je třeba použít viditelné množství heparinu (1 díl heparinu na 8–9 dílů krve).

Při odběru krve od druhu ryb, se kterým nemáme zkušenost, je vhodné si samotný odběr nejdříve vyzkoušet na několika kusech s různými dávkami heparinu a sledovat, za jakou dobu a při jak velkém množství heparinu se krev začne srážet.

2.3.1.1. Metoda odběru krve z cévy

Nejpoužívanější metodou odběru krve u ryb s hmotností vyšší než 20 g je punkce ocasních cév. Vylovená ryba se za pomoci mokré utěrky fixuje k podložce tak, aby zůstala zpřístupněna ventro-laterální (spodně-boční) strana ocasního násadce. Injekční jehla přiměřené velikosti (pro menší ryby do hmotnosti cca 100 g je ideální jehla šíře 0,8 mm – zelená, u větších ryb je možno použít jehlu o síle 1,2 mm – růžovou), pevně nasazená na kónus injekční stříkačky, se zavádí 1 cm kaudálně za řitní ploutev pod úhlem 45° od osy páteře z ventrální strany ryby nebo z mírně laterální strany ryby nad řitní ploutví. Směr vpichu je tedy kraniodorsální (hlavo-horní). Z místa vpichu se zpravidla odstraňuje šupina, nebo je také možné provést vpich pod šupinu.

Jehla se zavádí pomalu za použití mírného tlaku tak, aby byl překonán odpor svaloviny. Takto při šetrném postupu dojde nejprve k nabodnutí ocasní žíly, což se pozná podle úniku krve z kónusu jehly do stříkačky. Při rychlejším postupu hrot jehly projede zpravidla ocasní žílou i tepnou a narazí na tvrdou překážku obratlového těla. V takovém případě se jehla mírně povytáhne zpět a odebírá se krev z ocasní tepny nebo žíly, což není možné 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 (Svobodová a kol., 2012).

Při odběru z ocasních cév jeseterovitých ryb není možno se orientovat podle páteře, neboť chrupavčitou chordou injekční jehla poměrně snadno projde. Je proto nutno správný bod vpichu odběrové jehly najít podle zevních orientačních bodů. Heparinizovaná injekční stříkačka s pevně nasazenou jehlou se zavádí do ocasního násadce pod ventrální výběžek některého z dobře viditelných kostěných štítků v laterální řadě. 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 rychlejším 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 zpět, dokud se nevrátí do středu cévy.

Po ukončení odběru krve je nutné místo vpichu povrchově desinfikovat běžným způsobem. Podrobnější popis odběrů s obrazovými přílohami je přehledně uveden v publikaci Svobodová a kol. (2012).

2.3.1.2. Metoda odběru ze srdce

Tuto metodu lze použít pro odběr krve u plůdku s minimální hmotností 8 gramů. K odběru se používá cca 200 mm dlouhá skleněná kapilára, jejíž vnitřní povrch je před použitím potažen jemným filmem roztoku heparinu. U větších ryb lze k odběru použít heparinizovanou injekční jehlu. Odběr ze srdce vyžaduje značnou přesnost, neboť při razantnějším vpichu jehla snadno projede srdeční dutinou a na rozdíl od odběru z ocasní cévy není v blízkosti žádná tvrdší tkáňová struktura (páteř), podle které se lze zorientovat. Podrobný postup odběru ze srdce je popsán Svobodovou a kol. (2012).

2.3.1.3. Odběr krve u plůdku o hmotnosti méně než 8 g

Někdy je v rámci diagnostiky nebo experimentu potřeba získat krev z ryb, jejichž velikost neumožňuje žádný z výše popsaných odběrů krve. Tehdy přistupujeme k metodě odběru ustrížením ocasního násadce. Je nutno použít

STANOVENÍ DIFERENCIÁLNÍHO POČTU LEUKOCYTŮ RYB

dokonale ostré nůžky či skalpel, aby řez byl čistý. Tímto způsobem je možno získat pouze velmi malé množství krve, ale pro zhotovení krevního nátěru a následné stanovení leukogramu by mělo být dostačující.

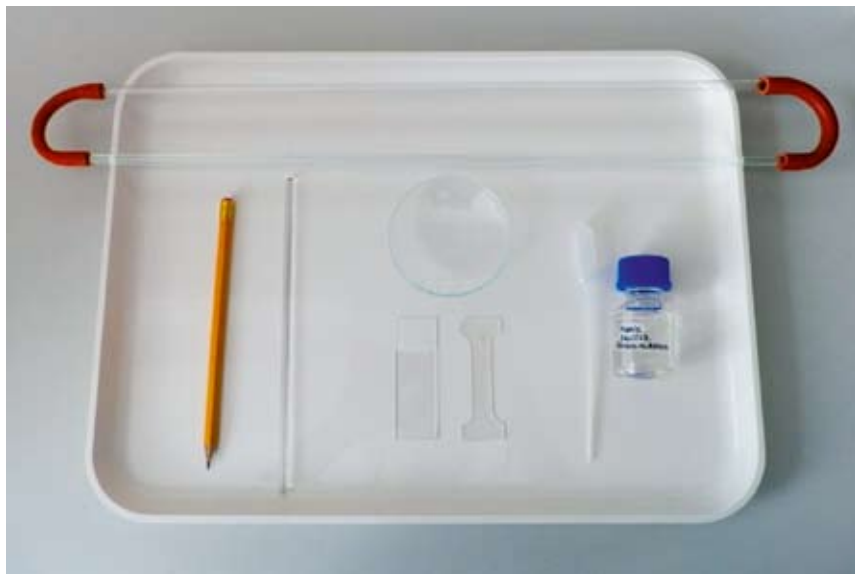
Poznámka: Všechny metody odběru krve ryb vyžadují zručnost a cvik, neboť není možno (na rozdíl od savců) cévy, eventuálně srdce, lokalizovat zrakem ani hmatem a vpich jehly se provádí v podstatě „naslepo“. Cílem je co nejrychlejší náběr potřebného množství krve v zájmu dosažení co nejlepší kvality odebraného vzorku a především v zájmu minimalizace času, kdy je nutno držet rybu mimo vodní prostředí.

2.3.2. Zhotovení krevního nátěru

Krevní nátěr lze zhotovit z čerstvě odebrané plné krve, anebo z krve s obsahem protisrážlivého prostředku (u sladkovodních ryb se používá sodná sůl heparinu).

Pomůcky (obr. 15):

- odmaštěné podložní sklo (pokud možno s jednostranným zábrusem) – k odmaštění se používají běžné detergenční prostředky, po následném opláchnutí vodou se sklíčka namočí do 96% etanolu, nebo směsi etanol + éter 1 : 1 a poté se skla nechají volně uschnout na vzduchu, popřípadě se doleští papírovou utěrkou či textilním hadříkem, který nepouští vlákna,
- skleněná tyčinka nebo automatická pipeta pro malé objemy (2–20 µl),
- tužka pro označení sklíčka (pokud používáme sklíčka bez zábrusu, budeme potřebovat k označení preparátu diamant nebo papírové nálepky),
- roztěrové sklíčko se zkosenými hranami, případně speciální roztěrovou špachtli z umělé hmoty,
- mřížka nebo skleněné „sáňky“ (dvě skleněné trubičky spojené na obou koncích gumovou hadičkou),
- hranatá miska nebo hlubší táč (vhodná je např. fotomiska),
- fixační prostředek (metanol) – v případě, že není možno barvit nátěry hned po odběru.

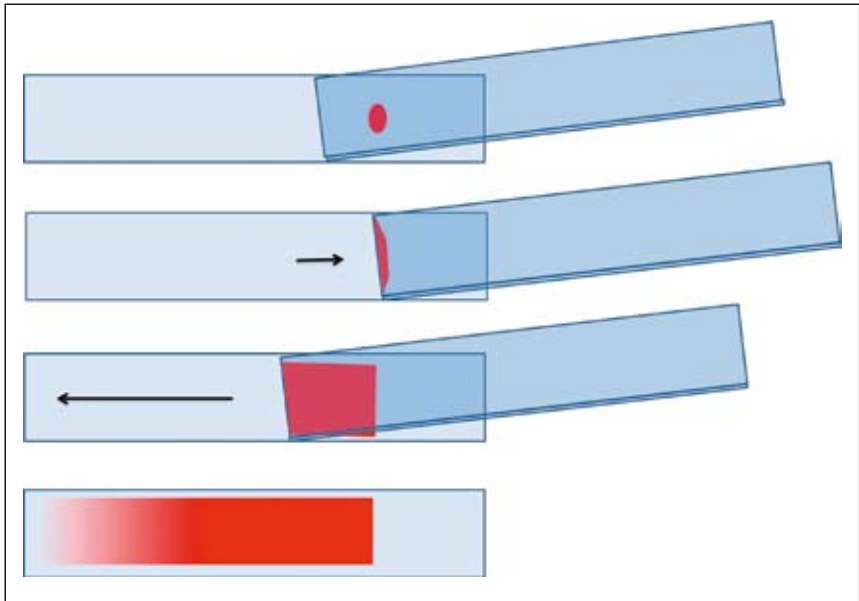


Obr. 15. Pomůcky pro zhotovení krevního nátěru. (Foto: E. Zusková)

Pracovní postup (obr. 16):

Pomocí skleněné tyčinky nebo automatické pipety nanese se kousek od okraje zábrusu podložního skla kapku krve. Používáme-li automatickou pipetu, volíme objem krve 5–7 μl . Pod úhlem 30–40° přiložíme ke kapce roztěrové sklíčko tak, aby se krev rozlila po celé délce přiložené hrany. Lehkým plynulým pohybem směrem k opačnému konci podložního sklíčka vytvoříme nátěr. Čím je doba roztěru kratší, tím je nátěr tenčí. Nátěr by měl být rovnoměrný, stejnorodý a přiměřeně tenký. Měl by mít dlouhé rovné okraje a na konci přecházet do ztracena, a to alespoň 1–2 cm před koncem sklíčka. Nikdy neroztíráme krev před sklíčkem, ale jakoby ji táhneme za roztěrovým sklíčkem. V opačném případě se ničí krevní buňky. Na zábrus sklíčka napíšeme identifikační údaje o odebrané krvi, datum a číslo vzorku. Hotový nátěr necháme na vzduchu dobře zaschnout, přičemž je nutné ho chránit před znečištěním a před hmyzem.

Nátěr by měl být obarven do 4 hodin po zaschnutí. Pokud vytvořený nátěr nebudeme bezprostředně barvit, je ještě nutné provést jeho fixaci pomocí metylalkoholu. Sklíčko s dokonale suchým nátěrem se vloží na „sáňky“ tak, že všechny jeho strany jsou volné a přebytečný metylalkohol tedy může volně stékat na podkladový táč. Vyschlý fixovaný preparát lze pak uchovávat delší dobu bez barvení.



Obr. 16. Zhotovení krevního nátěru. (Schéma: E. Zusková)

2.3.2.1. Nejčastější chyby krevních nátěrů:

- Silný nátěr po celé délce skla.
- Mastná oka v nátěru v důsledku špatně odmaštěného skla.
- Viditelné nerovnoměrné pruhy v nátěru vzniklé vyvinutím nadměrného tlaku na roztěrové sklíčko (nebo špachtli).
- Silná vrstva na konci preparátu, kdy roztěrové sklo (nebo špachtle) bylo na závěr rychle zvednuto a nátěr tak nepřechází do ztracena, což je chyba.

2.3.3. Barvení

Nejčastěji používanou „klasickou“ metodou barvení krevních nátěrů je panoptické barvení dle Pappenheima. Prostřednictvím této barvicí metody lze v obarveném preparátu kromě samotných krvinek zvýraznit i další struktury, jako jsou např. azurofilní granula, eventuálně krevní parazité.

V posledních letech jsou na trhu i různé komerčně vyráběné kity pro barvení krevních nátěrů, jejichž použití je poměrně jednoduché a v porovnání s klasickými metodami časově méně náročné. Někdy jsou nátěry obarvené pomocí komerčních kitů dokonce na pohled lepší než duplikáty barvené panopticky.

2.3.3.1. Klasické barvicí metody

Pracovní postup obecně:

Krevní nátěry můžeme barvit ponořováním sklíček s nátěry do kyvet s barvivu, nebo vrstvením barviv na nátěry rozložené ve vodorovné poloze na barvicí mřížce nebo „sáňkách“ položených přes hlubší ták.

Pomůcky:

- skleněné kyvety,
- kapátka nebo plastové pipety („pasterky“),
- barvicí stolek, mřížka nebo „sáňky“.

Panoptické barvení dle Pappenheima

Barviva:

May-Grünwald: eosin Y – metylenová modř 1 g + glycerol 50 ml + methanol 100 ml.

Giemsa-Romanowski: Azureosin II 3 g + Azur II 0,8 g + Glycerol 250 g + metylalkohol 250 g (před použitím naředit fosfátovým pufrům v poměru 1 : 9).

Základní pufrы:

0,067 mol.l⁻¹ KH₂PO₄: 9,07 g + doplnit do 1 000 ml destilovanou vodou.

0,067 mol.l⁻¹ Na₂HPO₄: 9,45 g + doplnit do 1 000 ml destilovanou vodou.

Fosfátový pufr pH 6,7 – 6,8 (rozpis pro 1 000 ml):

0,067 mol.l⁻¹ KH₂PO₄: 25,4 ml + 0,067 mol.l⁻¹ Na₂HPO₄: 24,6 ml + doplnit do 1 000 ml destilovanou vodou.

Pracovní postup:

1. Suché nativní, eventuálně fixované nátěry rozložíme na barvicí mřížku tak, aby se skla vzájemně nedotýkala.
2. Pipetou nebo kapátkem převrstvíme nátěr barvivem May-Grünwald a necháme působit 3 min.
3. Po třech minutách nařídíme barvivo na nátěr cca 25 kapkami fosfátového pufru a necháme působit 2 min.
4. Naříděné barvivo slijeme ze sklíček, neoplachujeme a ihned převrstvíme barvivem Giemsa-Romanowski. Necháme působit 15–30 min. (správnou délku barvení určíme mikroskopickou kontrolou namátkou vybraného nátěru).
5. Barvivo slijeme z nátěrů a jednotlivě je opláchneme pod tekoucí vodou.
6. Necháme nátěry uschnout volně na vzduchu v kolmé nebo šikmé poloze.

STANOVENÍ DIFERENCIÁLNÍHO POČTU LEUKOCYTŮ RYB

Výsledky barvení:

jádra – červenofialová

lymfocyty – plazma modrá,

monocyty – plazma blankytně modrá,

granulocyty – neutrofilní granula šedomodrá; eozinofilní granula medová až růžová; bazofilní granula hnědá až hnědofialová

Barvení dle Giemsy

Slouží k diferenciaci buněčných struktur, vytváří typické nachové zbarvení jader. Často se využívá i v parazitologii, je vhodné pro zvýraznění krevních protozoí. Barvivo se před použitím ředí fosfátovým pufrům o pH 6,7–6,8. Připravovaný roztok není stabilní, proto je nutné připravovat vždy čerstvý.

Barvivo: Giemsa–Romanowski: Azureosin II 3 g + Azur II 0,8 g + Glycerol 250 g + metylalkohol 250 g

Fosfátový pufr: viz barvení dle Pappenheima

Pracovní postup:

1. Suché nátěry fixujeme methanolem a necháme zaschnout volně na vzduchu ve vodorovné poloze.
2. Fixované nátěry ponoříme do květy s barvivem Giemsa-Romanovski naředěným fosfátovým pufrům 1 : 10 na 15–30 min. Lze provádět i ve vodorovné poloze navrstvením barviva na sklíčka rozložená na mřížce.
3. Opláchneme nátěry pod tekoucí vodou a necháme volně uschnout na vzduchu v kolmé nebo šikmé poloze.

Výsledky barvení:

jádra – purpurová do fialova,

lymfocyty – plasma modrá,

monocyty – plasma šedomodrá,

granulocyty – neutrofilní granula šedomodrá; eosinofilní granula červená do šedomodra,

krevní paraziti – jádra jasně červená,

2.3.3.2. Komerční barvicí kity

Hemacolor®

Je jedním z nejpoužívanějších barvicích kitů. Souprava obsahuje 3 roztoky připravené pro okamžité použití (A. fixační roztok, B. červený roztok a C. modrý roztok) a fosfátový pufr pH 7,2 v tabletách. Přesné složení jednotlivých roztoků není výrobcem uvedeno. Roztoky se dodávají ve 100 ml nebo 500 ml balení a jsou postačující pro obarvení 250, respektive 1 000 nátěrů. Barvení nátěru trvá v průměru 30 sekund a může být prováděno manuálně ve skleněných kyvetách, nebo v automatické barvicí lince. Výsledek barvení za užití Hemacoloru je srovnatelný s Pappenheimovou barvicí metodou (obr. 37, 38) a navíc šetří čas nejen samotného barvení, ale i čas nutný pro přípravu roztoků.

Diff-Quick

Tento barvicí kit byl vyvinut na bázi barvení dle Romanowského. Jeho nespornou výhodou je časová úspora při barvení krevních nátěrů a histologických řezů. Souprava obsahuje fixační roztok (lze jej nahradit methanolem), barvicí roztok I a barvicí roztok II (přesné složení roztoků výrobce neuvádí).

Pracovní postup:

1. suchý nátěr ponoříme do kyvety s Diff-Quick fixativem nebo methanolem na 30 sec., poté necháme okapat,
2. ponoříme do kyvety s roztokem „Diff-Quick II“ na 30 sec., necháme okapat,
3. ponoříme do kyvety s roztokem „Diff-Quick I“ na 30 sec., necháme okapat,
4. opláchneme pod tekoucí vodou, abychom odstranili přebytečné barvivo,
5. necháme volně uschnout, nebo pro urychlení odvodníme krátkým ponořením do absolutního alkoholu.

2.3.3.3. Nejčastější chyby vzniklé barvením

- Příliš kyselé pH oplachové vody vyvolá růžovou barvu nátěrů, zásadité pH vody vyvolá modré zbarvení nátěrů.
- Pokud se nátěr při oplachování smyje, nebyl dokonale suchý, nebo nedošlo k jeho dostatečné fixaci.
- Staré krevní nátěry bývají často přebarvené.

2.3.4. Mikroskopie barvených nátěrů

Obarvené krevní nátěry se hodnotí při tisícinásobném zvětšení (10x zvětšení okuláru x 100x zvětšení objektivu). Pokud pracujeme s imerzním objektivem, kápneme na nátěr imerzní olej, který po zaostření „propojí“ preparát s objektivem. Počítá se 200 (eventuálně 100) leukocytů

STANOVENÍ DIFERENCIÁLNÍHO POČTU LEUKOCYTŮ RYB

a zaznamenává se zastoupení jednotlivých typů buněk bílé krevní řady (tužkou na papír nebo pomocí mechanického či digitálního počítadla). Nátěr je nutno prohlížet meandrovitě jedním směrem tak, abychom nezapočítali 2x stejnou buňku a získali tak objektivní výsledek. Buňky je možné hodnotit pouze v místech, kde není hustota nátěru příliš velká a buňky se vzájemně nepřekrývají. Jednotlivé typy buněk byly popsány v kap. 2.2 a jsou zachyceny na fotografiích v kap. 2.6.

2.4. Diferenciální počet leukocytů sladkovodních ryb

2.4.1. Diferenciální počet leukocytů kostnatých ryb (Teleostei)

- Převážná většina granulocytů kostnatých ryb je neutrofilních.
- V rámci granulocytární řady se u většiny ryb, až na pstruha, nejvíce vyskytují neutrofilní metamyelocyty a poté myelocyty.
- U lososovitých ryb bývá zaznamenán menší podíl nezralých forem krevních buněk než u kaprovitých.

Příklady publikovaných diferenciálních počtů leukocytů různých druhů sladkovodních kostnatých ryb jsou uvedeny v tab. 2.

2.4.1.1. Kaprovité ryby

Příklady jednotlivých typů bílých krvinek kaprovitých ryb jsou zachyceny na obr. 17–34. U kaprovitých ryb jsou popisovány lymfocyty, monocyty, neutrofilní granulocyty různých vývojových stadií (viz kap. 2.2.7.3.), ojediněle eozinofilní granulocyty a vzácně bazofilní granulocyty. Neutrofilní metamyelocyty s vakuolizovanou cytoplazmou bývají někdy pokládány za „plazmatickou buňku“ (obr. 20).

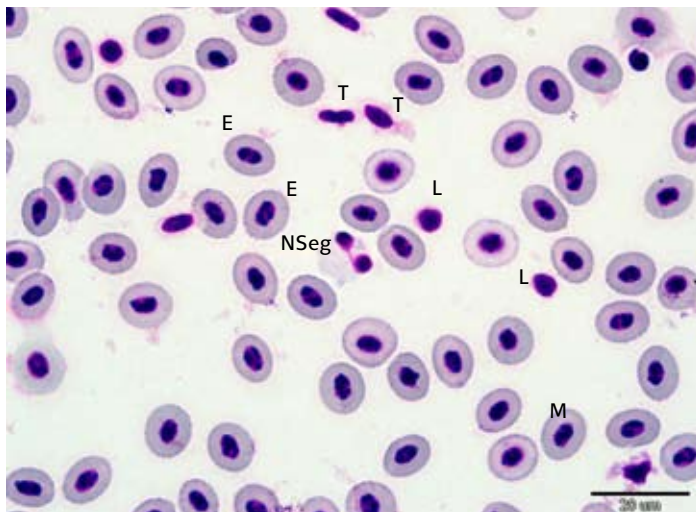
Tab. 2. Příklady diferenciálních počtů leukocytů u různých druhů ryb (průměr ± SD).

Druh	Lymfocyty	Monocyty	Neutrofilní myelocyty	Neutrofilní metamyelocyty	Neutrofilní tyčky	Neutrofilní segmenty	Blasty	Poznámka	Reference
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]		
KOSTNATÉ RYBY									
Kapr obecný (<i>Cyprinus carpio</i>)	92,1 ± 3,15	1,3 ± 0,69	1,6 ± 1,64	2,6 ± 1,51	1,1 ± 1,02	0,8 ± 0,68	0,6 ± 0,65	juvenilní ryby	Palíková a kol. (1998)
Pstruh duhový (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	84,20 ± 5,08	0,4 ± 0,35	3,0 (odchylka neuvedena)	4,2 ± 2,70	8,6 ± 3,64	0	0	půlroček – pstruhařna	Modrá, 1999
Ostretka stěhovavá (<i>Chondrostoma toxostoma</i>)	84,2 ± 6,1	0,8 ± 0,7	9,1 ± 4,6	2,9 ± 1,7	2,5 ± 1,9	0,6 ± 0,7	0	pľídek – podzim	Rečka kol. (2008)
Sumec velký (<i>Silurus glanis</i>)	89,7 ± 5,36	2,1 ± 1,43	3,3 ± 1,41	1,2 ± 1,48	0,4 ± 0,55	0,2 ± 0,33	3,0 ± 1,74	16–17 měsíců, intenzivní chov	Jiráseka kol. (1998)
Úhoř říční (<i>Anguilla anguilla</i>)	90,3 ± 6,64	0,9 ± 1,22	3,5 ± 2,29	3,9 ± 3,12	3,9 ± 3,12	1,3 ± 1,38	0,3	7–11 let, IV–XI, vodárenská nádrž	Palíková a Navrátil (2001)
Jelec tloušť (<i>Squalius cephalus</i>)	96,0	1,5	0,7	0,4	0,7	0,4	0,3	120–350g, řeka, IV–I, SD neuvedeny	Lamková a kol. (2007)
Čejn velký (<i>Abramis brama</i>)	96,7 ± 92,1	0,9 ± 0,82	2,2 ± 1,78	0,03 ± 0,12	0,03 ± 0,12	0	0,2 ± 0,61	6–8 let, řeka	Drastichová a kol. (2001)
Okoun říční (<i>Percu fluviatilis</i>)	97,1 ± 1,24	0,8 ± 0,83	0,9 ± 0,22	0,3 ± 0,25	0,1 ± 0,22	0,1 ± 0,22	0,8 ± 1,03	2–5 let, řeka	Drastichová a kol. (2001)
Parma obecná (<i>Barbus barbus</i>)	95,3 ± 4,57	0,7 ± 1,08	1,9 ± 1,32	0,5 ± 0,65	0,4 ± 0,65	1,1 ± 1,45	1,2 ± 0,30	4–9 let, řeka	Drastichová a kol. (2001)
CHRUPAVČITÉ RYBY									
Yyza velká (<i>Huso huso</i>)	72,6 ± 12,24	0,5 ± 0,67	22,3 ± 9,72	4,6 ± 2,83	4,6 ± 2,83	0,2 ± 0,35	0,2 ± 0,35	intenzivní chov, staří ryb	Palíková a kol. (1999)
Jeseter hvězdnatý (<i>Acipenser stellatus</i>)	72,4 ± 8,26	0,6 ± 0,55	21,8 ± 4,5	4,3 ± 2,25	4,3 ± 2,25	1,4 ± 0,65	1,4 ± 0,65	184–208 dní	
Jeseter sibiřský (<i>Acipenser baeri</i>)	67,95 ± 9,42	0,5 ± 0,37	25,1 ± 10,53	3,1 ± 2,33	3,1 ± 2,33	1,6 ± 0,90	1,6 ± 0,90		

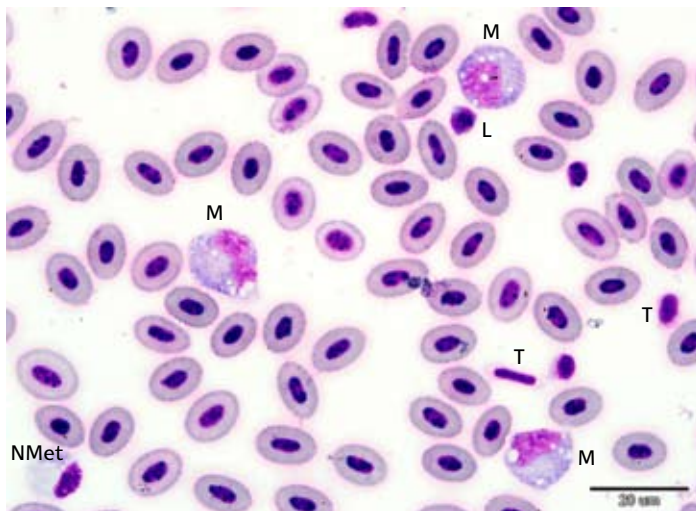
STANOVENÍ DIFERENCIÁLNÍHO POČTU LEUKOCYTŮ RYB

Kapr obecný (*Cyprinus carpio*, L.)

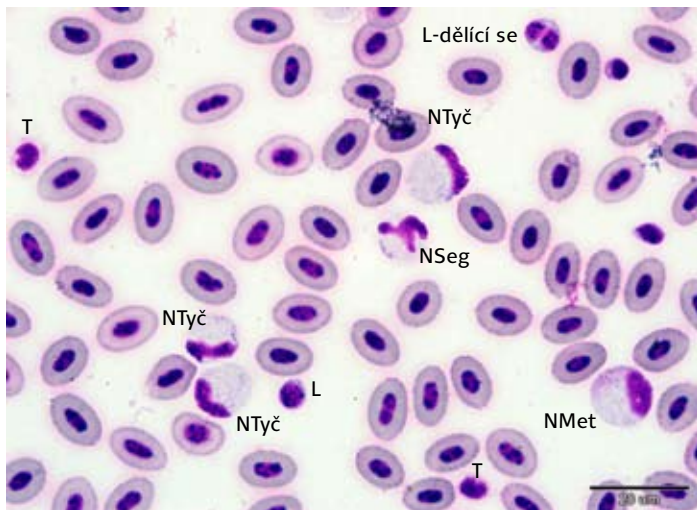
V krevních nátěrech kapra obecného (obr. 17-23) převažují lymfocyty. Z granulocytů bývají nejčastěji zaznamenávány neutrofilní metamyelocyty.



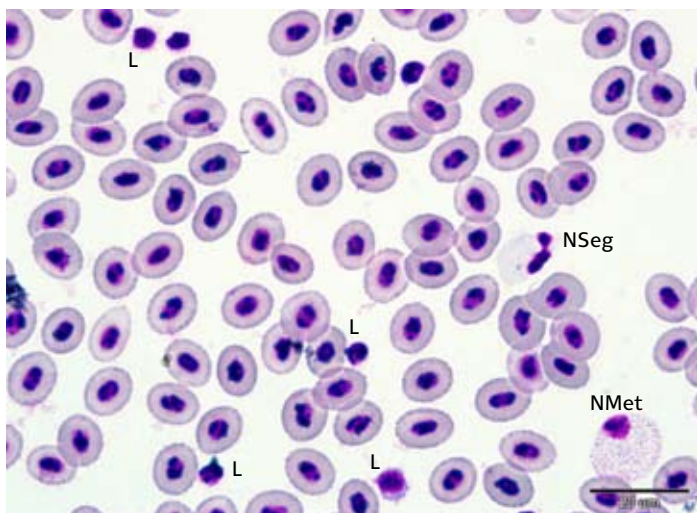
Obr. 17. Krevní nátěr z kapra obecného, barvený dle Pappenheima (L – lymfocyt, E – erytrocyt, NSeg – neutrofilní „segment“, T – trombocyt). (Foto: M. Palíková)



Obr. 18. Krevní nátěr z kapra obecného, barvený dle Pappenheima (L – lymfocyt, M – monocyt, NMet – neutrofilní metamyelocyt, T – trombocyt). (Foto: M. Palíková)

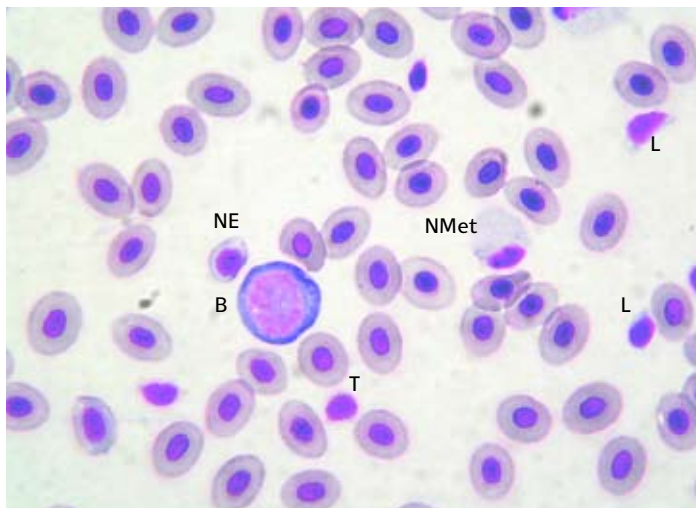


Obr. 19. Krevní nátěr z kapra obecného, barvený dle Pappenheima (L – lymfocyt, NMet – neutrofilní metamyelocyt, NTyč – neutrofilní „tyčka“, T - trombocyt). (Foto: M. Palíková)

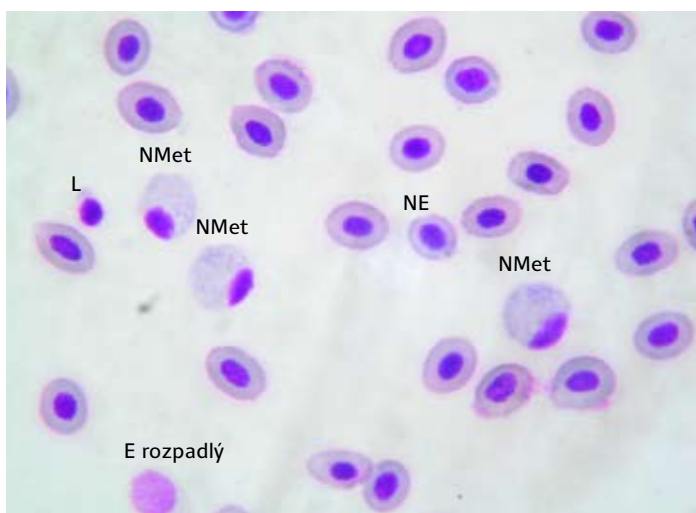


Obr. 20. Krevní nátěr z kapra obecného, barvený dle Pappenheima. Neutrofilní metamyelocyt s vakuolizovanou cytoplazmou někdy bývá označován jako „plazmatická buňka“ (L – lymfocyt, NMet – neutrofilní metamyelocyt, NSeg– neutrofilní „segment“). (Foto: M. Palíková)

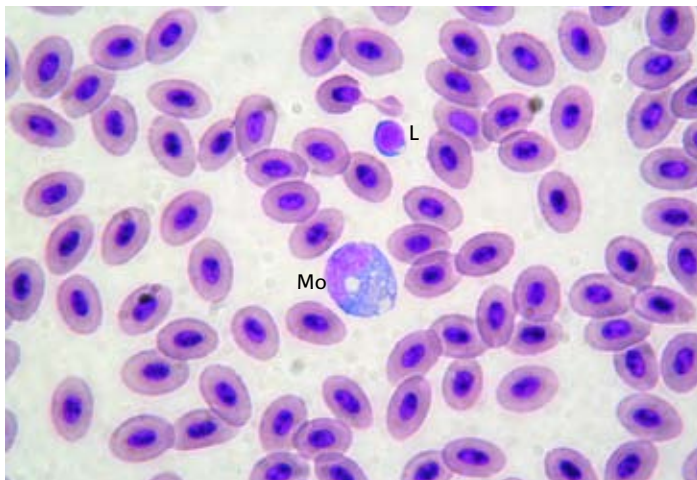
STANOVENÍ DIFERENCIÁLNÍHO POČTU LEUKOCYTŮ RYB



Obr. 21. Krevní nátěr z kapra obecného, barvený dle Pappenheima (L – lymfocyt, NMet – neutrofilní metamyelocyt, NE – nezralý erytrocyt, B – blast, T – trombocyt). (Foto: M. Palíková)



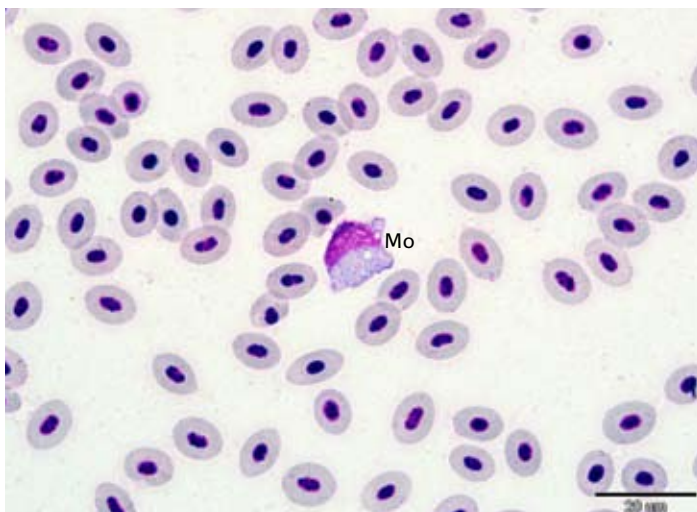
Obr. 22. Krevní nátěr z kapra obecného, barvený dle Pappenheima (L – lymfocyt, NMet – neutrofilní metamyelocyt, E – erytrocyt, NE – nezralý erytrocyt). (Foto: M. Palíková)



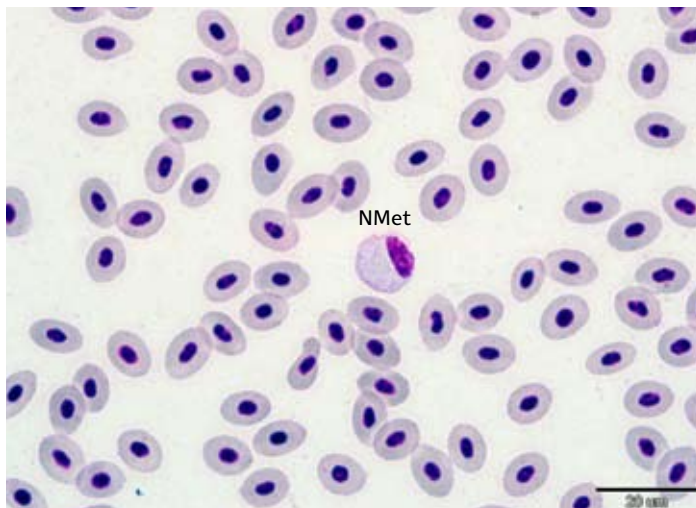
Obr. 23. Krevní nátěr z krapa obecného, barvený dle Pappenheima (L – lymfocyt, Mo – monocyt). (Foto: M. Palíková)

Amur bílý (*Ctenopharyngodon idella*)

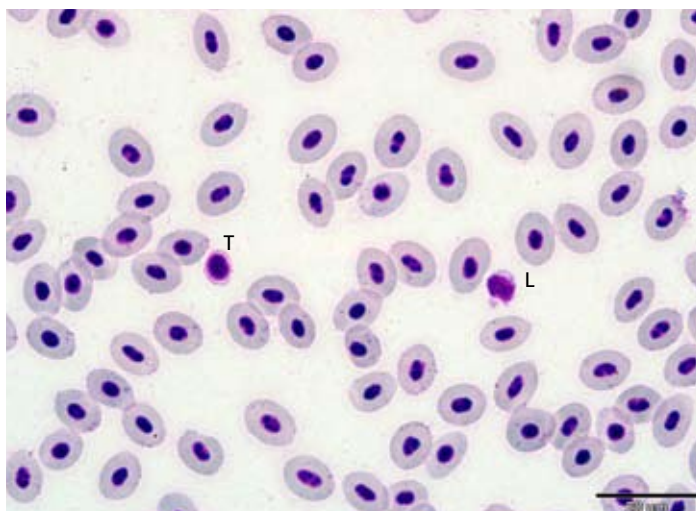
Diferenciální počet leukocytů i vzhled krevních buněk (obr. 24–26) je u amura obdobný jako u krapa obecného.



Obr. 24. Krevní nátěr amura bílého, barvený dle Pappenheima (Mo – monocyt). (Foto: M. Palíková)



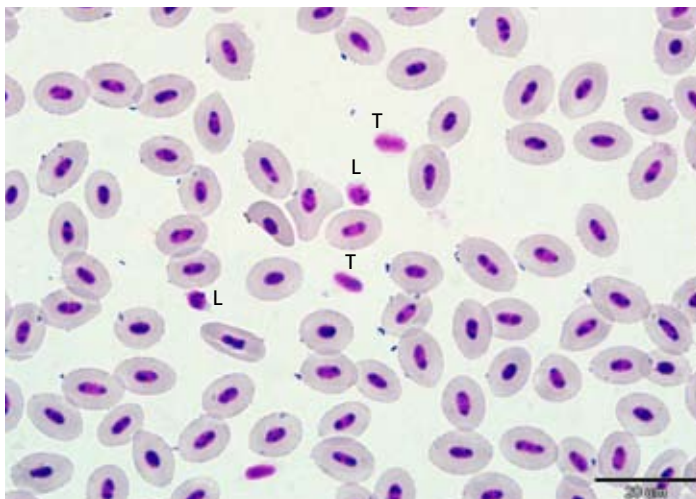
Obr. 25. Krevní nátěr amura bílého, barvený dle Pappenheima (NMet - neutrofilní metamyelocyt). (Foto: M. Palíková)



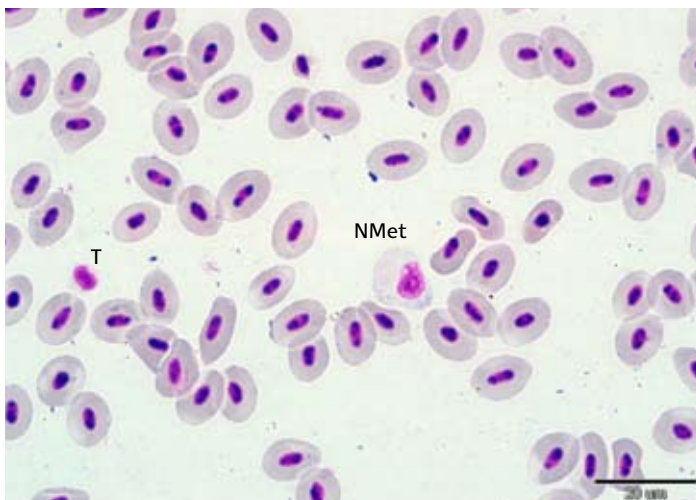
Obr. 26. Krevní nátěr amura bílého, barvený dle Pappenheima (L - lymfocyt, T - trombocyt). (Foto: M. Palíková)

Tolstolobik bílý (*Hypophthalmichthys molitrix*)

Zastoupení jednotlivých typů krevních buněk a jejich vzhled (obr. 27, 28) je podobný jako u ostatních kaprovitých ryb.



Obr. 27. Krevní nátěr tolstolobika bílého, barvený dle Pappenheima (L – lymfocyt, T – trombocyt). (Foto: M. Palíková)

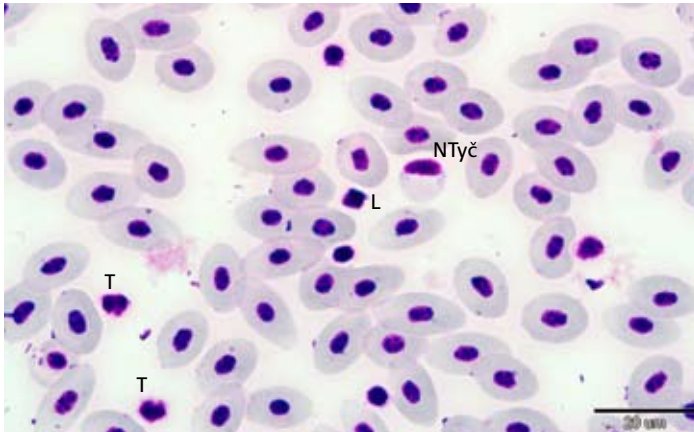


Obr. 28. Krevní nátěr tolstolobika bílého, barvený dle Pappenheima (NMet – neutrofilní metamyelocyt, T – trombocyt). (Foto: M. Palíková)

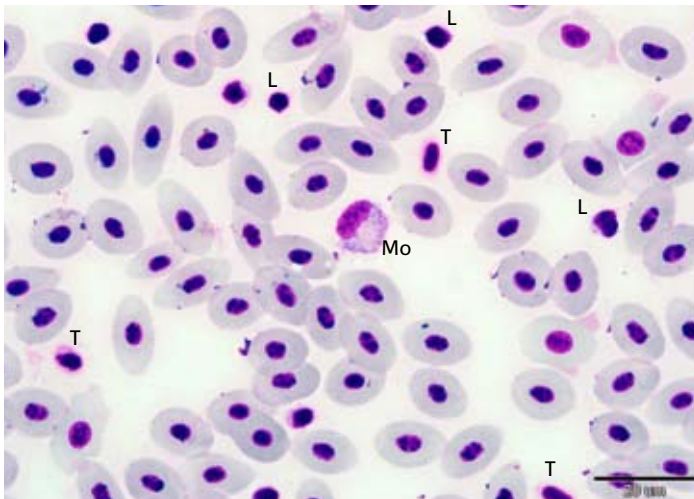
STANOVENÍ DIFERENCIÁLNÍHO POČTU LEUKOCYTŮ RYB

Jelec tloušť (*Squalius cephalus*)

Jelec tloušť je vzhledem k jeho rozšíření téměř ve všech tekoucích povrchových vodách využíván při monitoringu znečištění cizorodými látkami. Zastoupení jednotlivých typů krevních buněk a jejich vzhled (obr. 29, 30) je podobný jako u ostatních kaprovitých ryb.



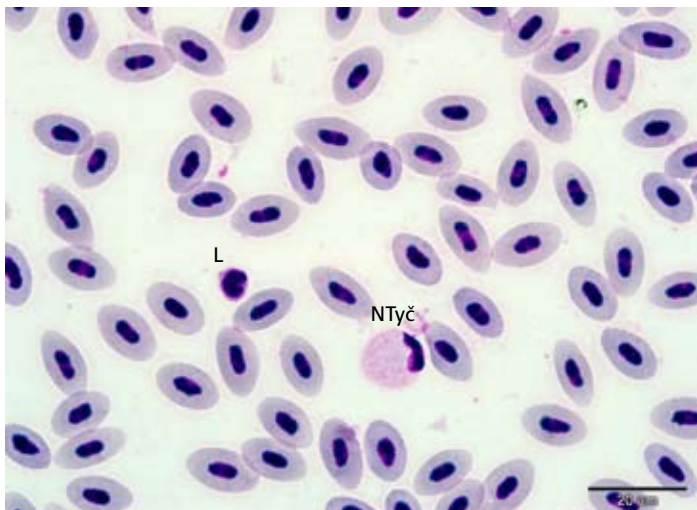
Obr. 29. Krevní nátěr jelce tlouště, barvený dle Pappenheima (L - lymfocyt, T - trombocyt, NTyč - neutrofilní „tyčka“). (Foto: M. Palíková)



Obr. 30. Krevní nátěr jelce tlouště, barvený dle Pappenheima (L - lymfocyt, Mo - monocyt, T - trombocyt). (Foto: M. Palíková)

Parma obecná (*Barbus barbus*)

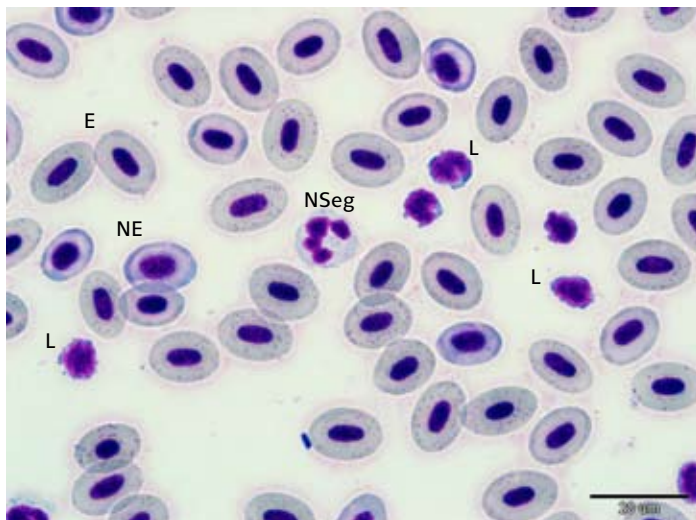
Diferenciální počet leukocytů parmy obecné se provádí zejména při sledování vlivů prostředí na fyziologické parametry. Zastoupení jednotlivých typů krevních buněk a jejich vzhled (obr. 31) je podobný jako u ostatních kaprovitých ryb.



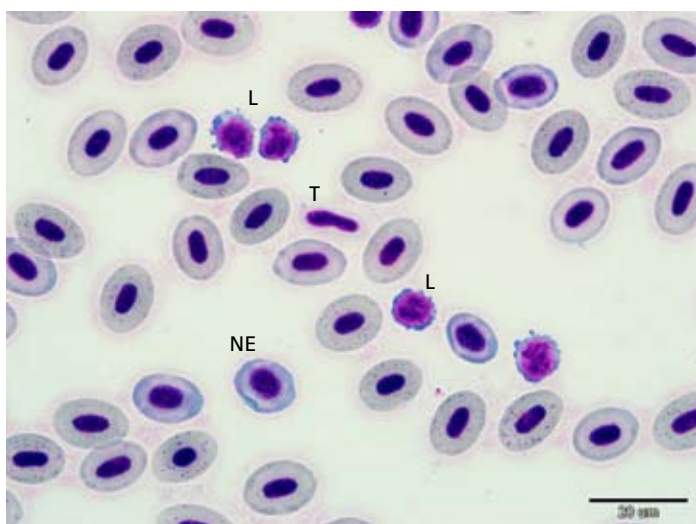
Obr. 31. Krevní nátěr parmy obecné, barvený dle Pappenheima (L – lymfocyt, NTyč – neutrofilní „tyčka“). (Foto: M. Palíková)

2.4.1.2. Lososovité ryby

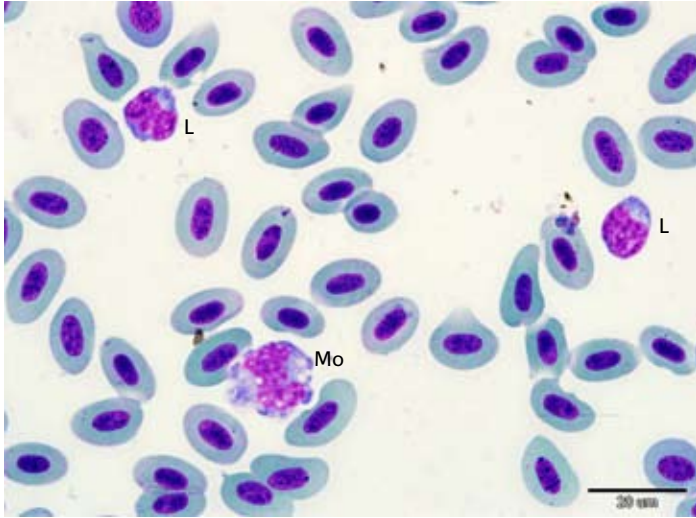
Hlavním zástupcem lososovitých ryb je **pstruh duhový** (*Oncorhynchus mykiss*). Příklady jednotlivých typů bílých krvinek pstruha duhového jsou zachyceny na obr. 32–36. Oproti kaprovitým mají menší podíl nezralých forem neutrofilních granulocytů a vyšší podíl „segmentů“ s typickým laločnatým jádrem (obr. 32, 35 a 36). Někdy se můžeme setkat s náznakem segmentace i u jader lymfocytů (obr. 34).



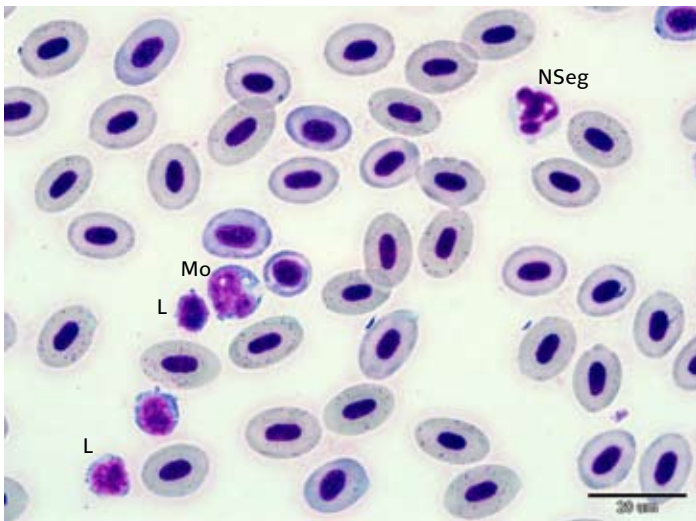
Obr. 32. Krevní nátěr pstruha duhového, barvený dle Pappenheima (L – lymfocyt, E – erytrocyt, NE – nezralý erytrocyt, NSeg – neutrofilní segment). (Foto: M. Palíková)



Obr. 33. Krevní nátěr pstruha duhového, barvený dle Pappenheima (L – lymfocyt, NE – nezralý erytrocyt, T – trombocyt). (Foto: M. Palíková)

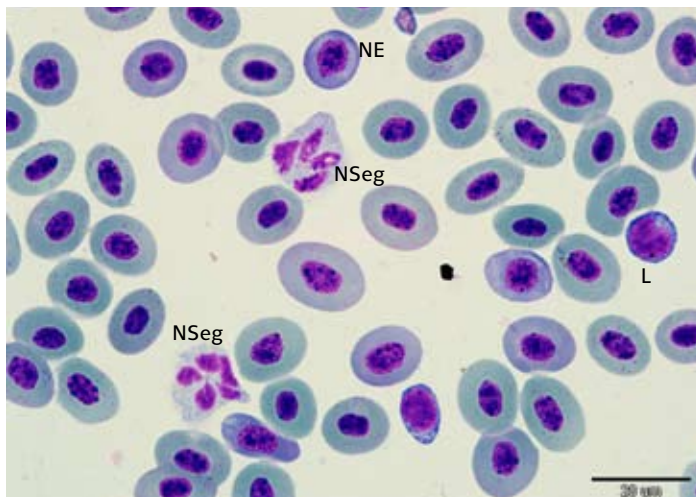


Obr. 34. Krevní nátěr pstruha duhového, barvený Hemacolem (L - lymfocyt, Mo - monocyty). (Foto: M. Palíková)



Obr. 35. Krevní nátěr pstruha duhového, barvený dle Pappenheima (L - lymfocyt, Mo - monocyty, NSeg - neutrofilní „segment“). (Foto: M. Palíková)

STANOVENÍ DIFERENCIÁLNÍHO POČTU LEUKOCYTŮ RYB

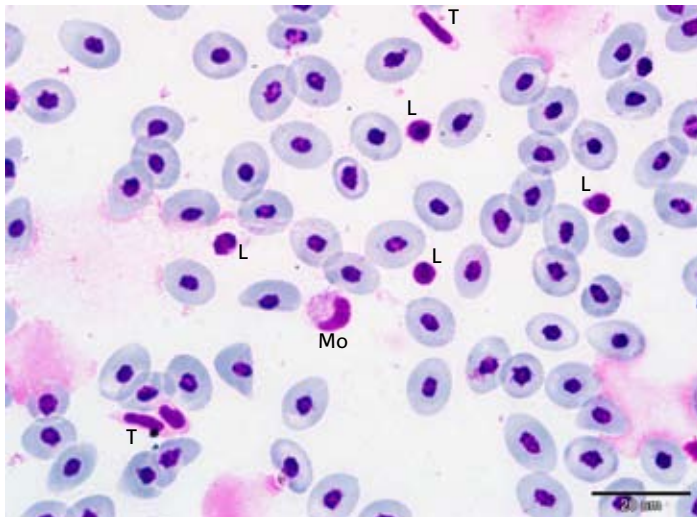


Obr. 36. Krevní nátěr pstruha duhového, barvený Hemacoleorem (NE – nezralý erytrocyt, NSeg – neutrofilní segment). (Foto: M. Palíková)

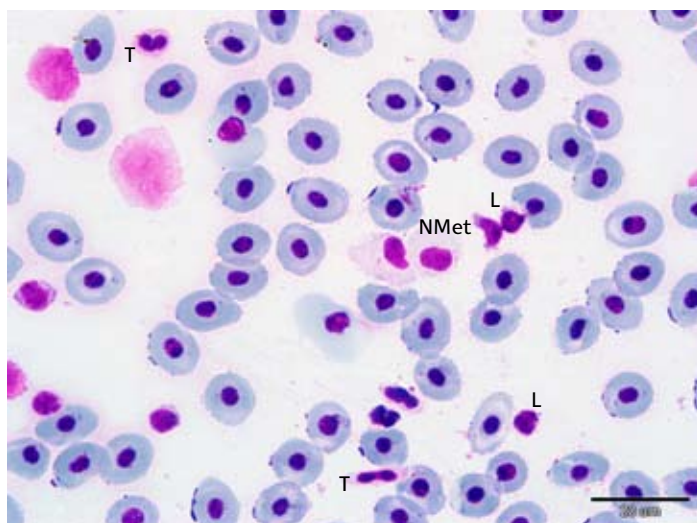
2.4.1.3. Ostatní druhy

Příklady jednotlivých typů bílých krvinek některých dalších druhů kostnatých ryb jsou zachyceny na obr. 37–47.

Sumec velký (*Silurus glanis*)

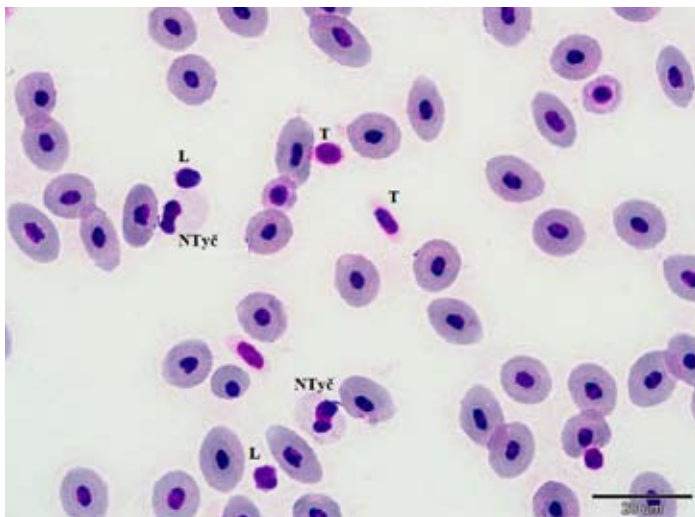


Obr. 37. Krevní nátěr sumce velkého, barvený dle Pappenheima (L - lymfocyt, Mo - monocyt, T - trombocyt). (Foto: M. Palíková)

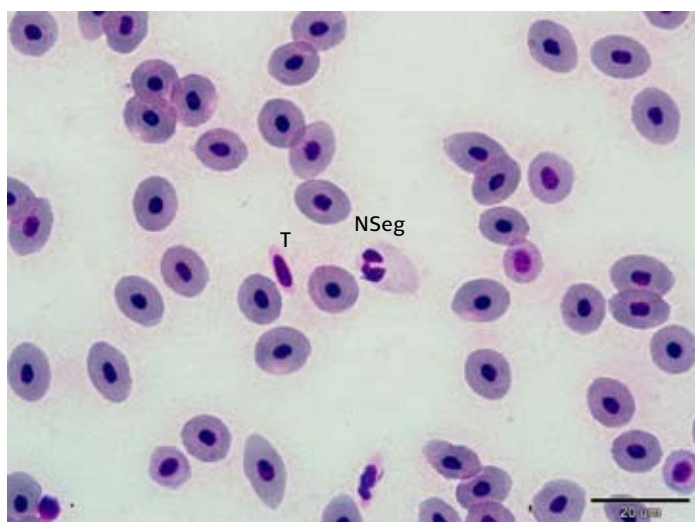


Obr. 38. Krevní nátěr sumce velkého, barvený dle Pappenheima (L - lymfocyt, T - trombocyt, NMet - neutrofilní metamyelocyt). (Foto: M. Palíková)

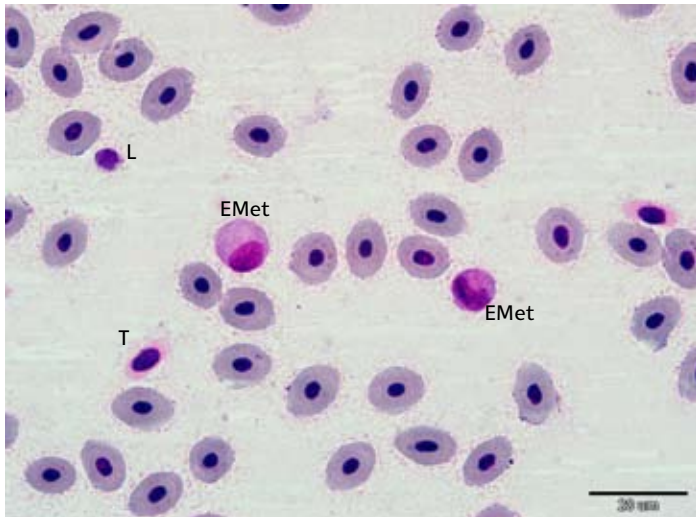
Úhoř říční (*Anguilla anguilla*)



Obr. 39. Krevní nátěr úhoře říčního, barvený dle Pappenheima (L - lymfocyt, T - trombocyt, NTyč - neutrofilní „tyčka“). (Foto: M. Palíková)

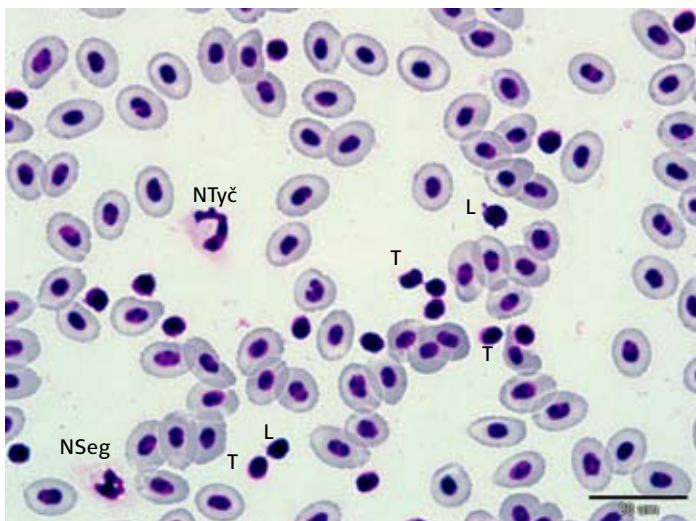


Obr. 40. Krevní nátěr úhoře říčního, barvený dle Pappenheima (NSeg - neutrofilní „segment“, T - trombocyt). (Foto: M. Palíková)

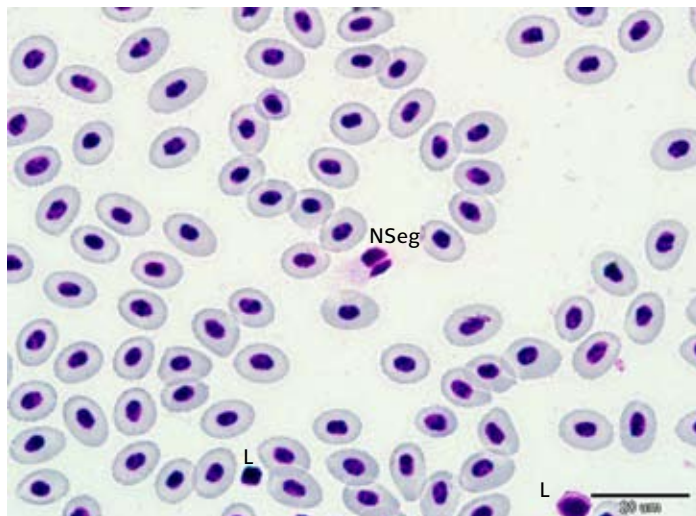


Obr. 41. Krevní nátěr úhoře říčního, barvený dle Pappenheima (L - lymfocyt, T - trombocyt, EMet - eozinofilní metamyelocyt). (Foto: M. Palíková)

Okoun říční (*Perca fluviatilis*)

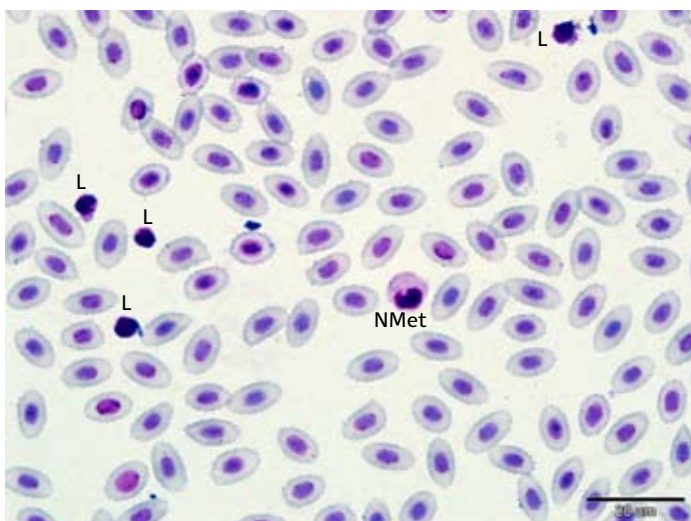


Obr. 42. Krevní nátěr okouna říčního, barvený dle Pappenheima (L - lymfocyt, T - trombocyt, NTyč - neutrofilní „tyčka“, NSeg - neutrofilní „segment“). (Foto: M. Palíková)

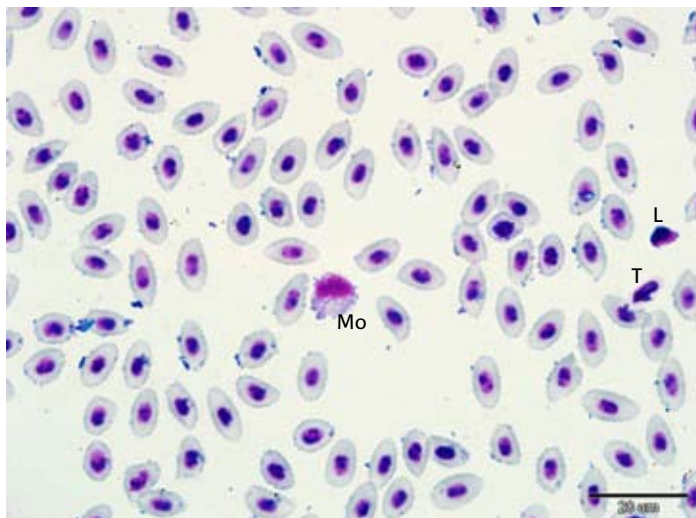


Obr. 43. Krevní nátěr okouna říčního, barvený dle Pappenheima (L – lymfocyt, NSeg – neutrofilní „segment“). (Foto: M. Palíková)

Candát obecný (*Sander lucioperca*)

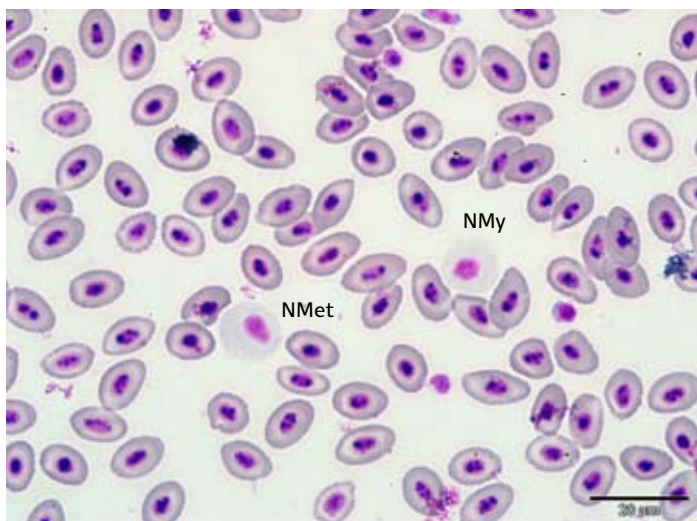


Obr. 44. Krevní nátěr candáta obecného, barvený dle Pappenheima (L – lymfocyt, NMet – neutrofilní metamyelocyt). (Foto: M. Palíková)

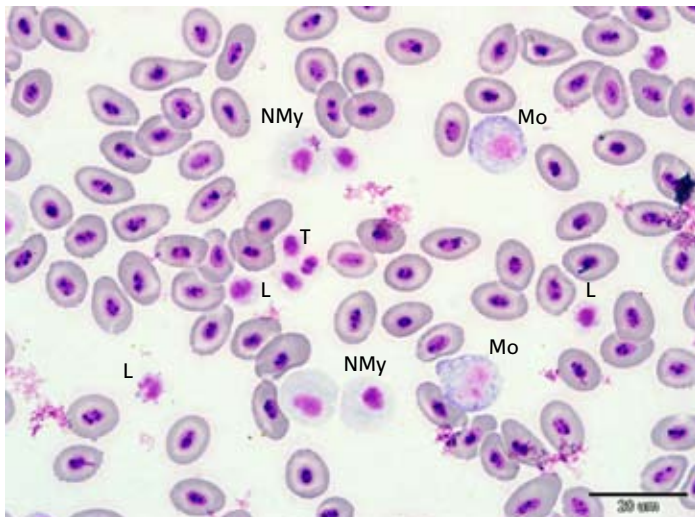


Obr. 45. Krevní nátěr candáta obecného, barvený dle Pappenheima (L – lymfocyt, Mo – monocyt). (Foto: M. Palíková)

Tlamoun nilský (*Oreochromis niloticus*)



Obr. 46. Krevní nátěr tlamouna nilského, barvený dle Pappenheima (NMet – neutrofilní metamyelocyt, NMy – neutrofilní myelocyt). (Foto: M. Palíková)



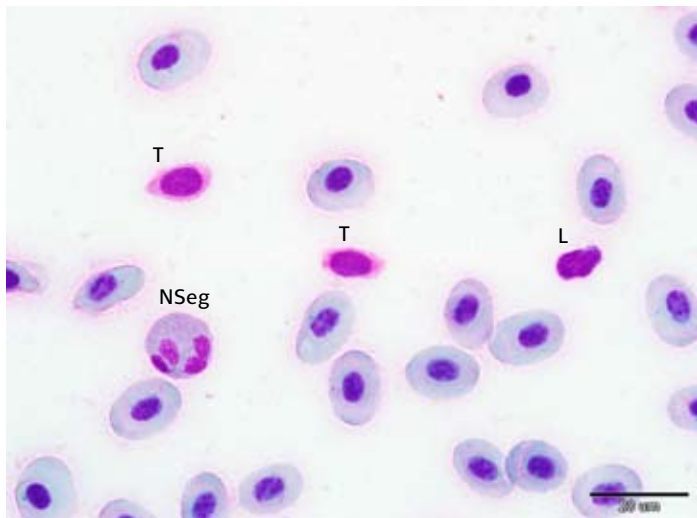
Obr. 47. Krevní nátěr tlamouna nilského, barvený dle Pappenheima (L – lymfocyt, T – trombocyt, NMy – neutrofilní myelocyt, Mo – monocyt). (Foto: M. Palíková)

2.4.2. Diferenciální počet leukocytů chrupavčitých ryb (Chondrostei)

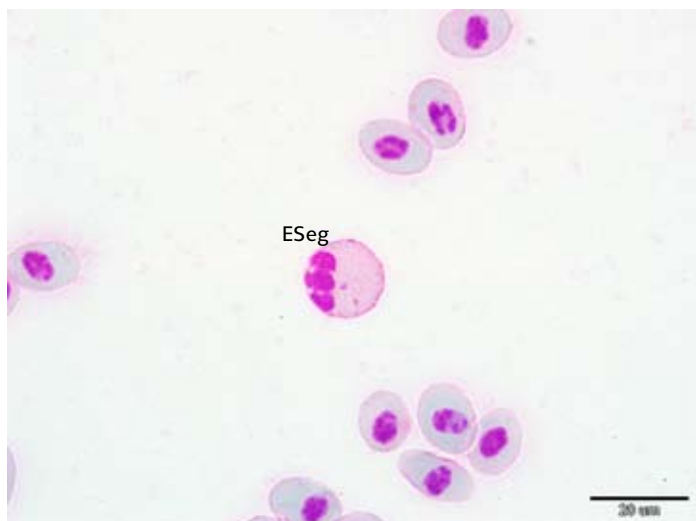
- Chrupavčité ryby mají leukogramy podobnější savcím:
 - o Málo se vyskytují vývojově mladší formy granulocytů: neutrofilní myelocyty do 1 %, neutrofilní metamyelocyty cca do 4 %, eozinofilní myelocyty 0 % a metamyelocyty pouze ojediněle (max. 0,5 %).
 - o Je pozorováno vyšší zastoupení neutrofilních „tyček“ než „segmentů“ (jeseter hvězdnatý, *Acipenser stellatus* 11,2/7,4, jeseter sibiřský, *Acipenser baerii* 11,6/9,5 a vyza velká, *Huso huso* 14/4,4).
 - o Je pozorováno vyšší zastoupení eozinofilních „segmentů“ (obr. 52) než „tyček“ (*A. stellatus* 0,5/3,7, *A. baerii* 0,4/2,7 a *H. huso* 1,9/2,4).
 - o Neutrofilní segmenty mají typický několikaločnatý vzhled (obr. 48)
- Mezi jednotlivými druhy chrupavčitých ryb jsou morfometrické rozdíly v souvislosti s úrovní ploidie (čím vyšší ploidie, tím větší buňky).
- Druhově specifické jsou i poměry tyček/segmentům.

Příklady publikovaných diferenciálních počtů leukocytů chrupavčitých ryb jsou uvedeny v tab. 2, jednotlivé typy buněk jsou zachyceny na obr. 48–54.

Jeseter sibiřský (*Acipenser baerii*)

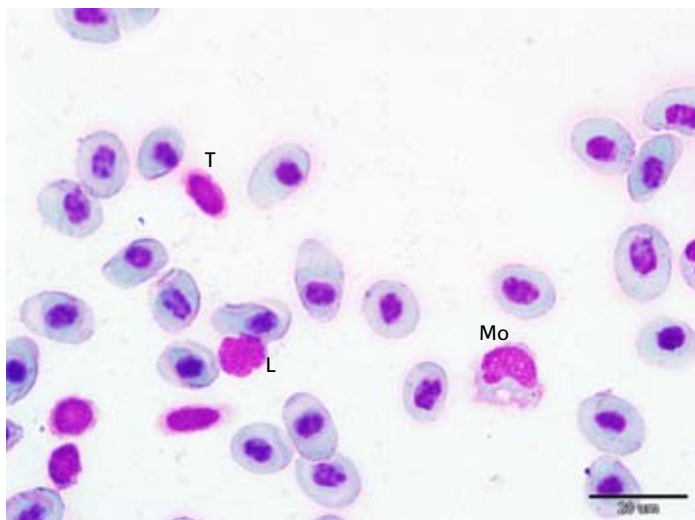


Obr. 48. Krevní nátěr jesetera sibiřského, barvený dle Pappenheima (L – lymfocyt, T – trombocyt, NSeg – neutrofilní „segment“). (Foto: M. Palíková)

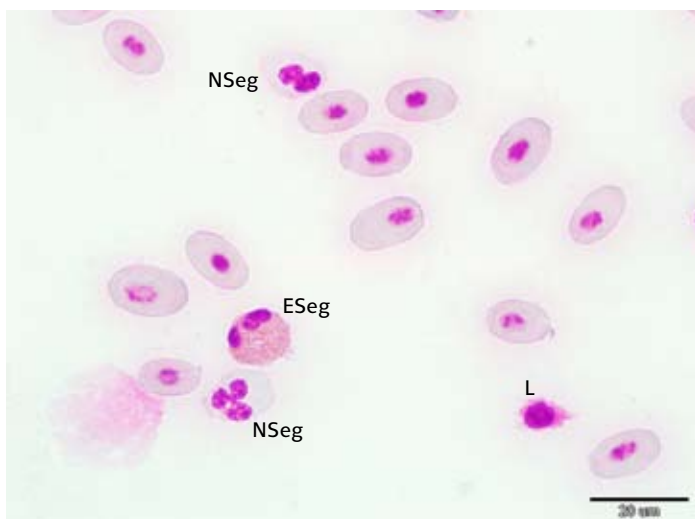


Obr. 49. Krevní nátěr jesetera sibiřského, barvený dle Pappenheima (ESeg – eozinofilní „segment“). (Foto: M. Palíková)

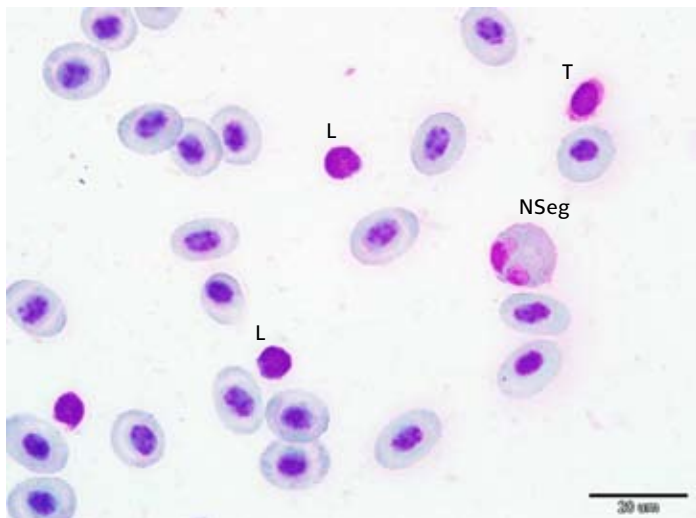
Jeseter hvězdnatý (*Acipenser stellatus*)



Obr. 50. Krevní nátěr jesetera hvězdnatého, barvený dle Pappenheima (L – lymfocyt, T – trombocyt, Mo – monocyt). (Foto: M. Palíková)

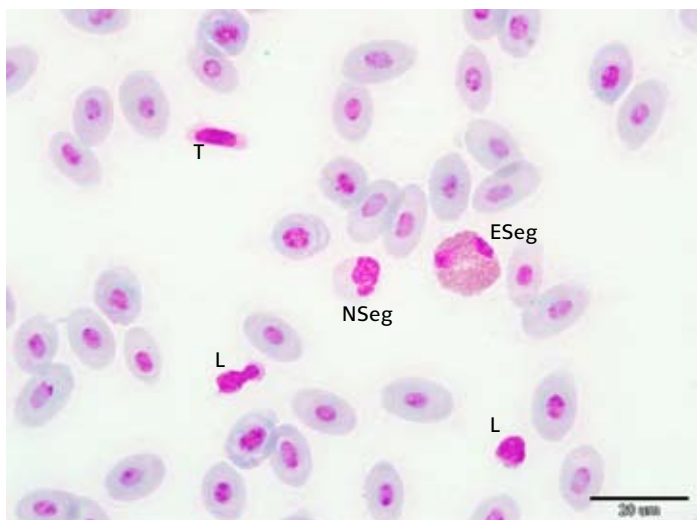


Obr. 51. Krevní nátěr jesetera hvězdnatého, barvený dle Pappenheima (L – lymfocyt, NSeg – neutrofilní „segment“ ESeg – eozinofilní „segment“). (Foto: M. Palíková)

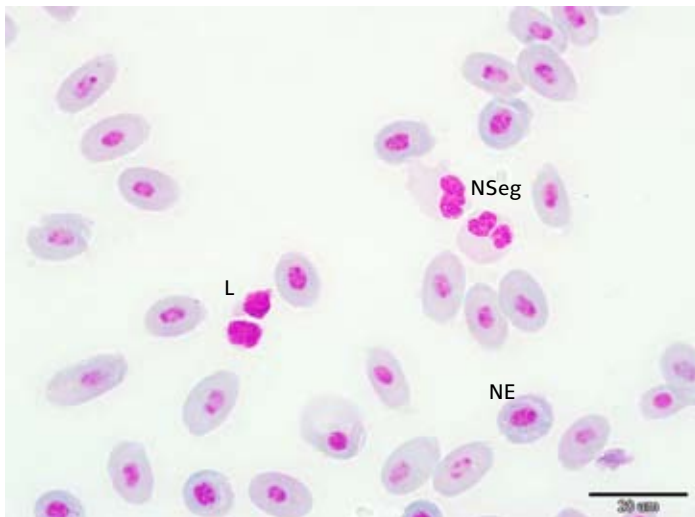


Obr. 52. Krevní nátěr jesetera hvězdnatého, barvený dle Pappenheima (L – lymfocyt, T – trombocyt, NSeg – neutrofilní „segment“). (Foto: M. Palíková)

Vyza velká (*Huso huso*)



Obr. 53. Krevní nátěr vyzy velké, barvený dle Pappenheima (L – lymfocyt, T – trombocyt, ESeg – eozinofilní „segment“, NSeg – neutrofilní „segment“). (Foto: M. Palíková)



Obr. 54. Krevní nátěr vyzy velké, barvený dle Pappenheima (L – lymfocyt, NSeG – neutrofilní „segment“, NE – nezralý erytrocyt) (Foto: M. Palíková)

2.5. Změny v diferenciálním počtu leukocytů

Hematologické vyšetření ryb může být užitečné při diagnostice nemocí postihujících buněčné složky krve. Některé nemoci ryb se projevují **anémií** (sníženým počtem červených krvinek), **leukopenií** (sníženým počtem bílých krvinek), **leukocytózou** (zvýšeným počtem bílých krvinek), **trombocytopenií** (sníženým počtem trombocytů) a dalšími změnami v zastoupení jednotlivých krevních buněk. Posouzení hemogramu může být využito také při sledování průběhu choroby nebo reakce na léčbu. Při interpretaci výsledků je ale nutno brát v úvahu všechny vnější a vnitřní faktory, které je mohly ovlivnit (Campbell a Ellis, 2007). Mezi vnitřní faktory ovlivňující leukogram patří například věk. Je známo, že juvenilní ryby mají vyšší celkový počet bílých krvinek, způsobený vyšší koncentrací lymfocytů, než dospělí jedinci (Hrubec a kol., 2001). Stejný posun v hemogramu můžeme zaznamenat i u ryb chovaných ve vyšší koncentraci, a tedy vystavených nepřetržitému kontaktu s vysokou koncentrací bakterií a horší kvalitě vody (Hrubec a kol., 2000).

Významným faktorem ovlivňujícím leukogram ryb je stres. Leukocytární odezva na stresové faktory je u ryb podobná jako u savců. Spočívá v leukopenii s lymfopenií (sníženým počtem lymfocytů) a **relativní granulocytózou**

(zvýšeným procentuálním zastoupením neutrofilních granulocytů v důsledku snížení absolutního počtu lymfocytů) (Roberts a Ellis, 2001). Změny v krevním obrazu mohou přetrvávat ještě několik dní po eliminaci stresoru.

Zmnožení neutrofilních granulocytů (**neutrofilie**) zpravidla doprovází závažná onemocnění, zejména ta vyvolaná infekčními původci (Groff a Zinkl, 1999).

K výrazným změnám v absolutním i relativním zastoupení jednotlivých typů leukocytů, zejména lymfocytů a neutrofilních granulocytů, dochází po vystavení ryb působení anorganických i organických toxických látek. Příklady takových změn zjištěných v experimentálních podmínkách jsou uvedeny v tab. 3. Při využití diferenciálního počtu leukocytů jako jednoho z parametrů stanovovaných při experimentech je nezbytné hodnotit změny v souvislosti s kontrolní skupinou!

Fyziologická rozmezí absolutního počtu i procentuálního zastoupení jednotlivých typů bílých krvinek jsou u ryb poměrně široká. Je to dáno jejich poikilotermií a velmi těsnou závislostí na vnějším prostředí. Proto je při experimentech vždy nutno porovnávat experimentální skupinu se skupinou kontrolní a ne s tzv. "fyziologickými" hodnotami ryb vzhledem k tomu, že některé změny mohou být patrné i v rámci „fyziologických rozmezí“. Kontrolní skupina musí být chována ve stejných podmínkách jako experimentální a musí s ní být nakládáno stejným způsobem, kromě aplikace testované látky či jiného patogenního činitele (experimentální infekce viry, bakteriemi, parazity nebo plísněmi, testování nových chovných technologií atd.). Jak je patrné z práce Palíková a kol. (2012), diferenciální počet je dobré uvádět spolu s celkovým počtem leukocytů, aby bylo možno dopočítat absolutní počty jednotlivých typů buněk. Pouhé procentuální vyjádření nemusí podchytit skutečné změny a je třeba je přepočítat na absolutní počty podle vzorce:

$$X(G.I^1) = \frac{\text{zastoupení určitého typu buněk (\%)}}{\text{celkový počet leukocytů (G.I^1)}} \cdot 100$$

Tab. 3. Příklady publikovaných změn počtu lymfocytů a neutrofilních granulocytů po expozici ryb toxickým látkám.

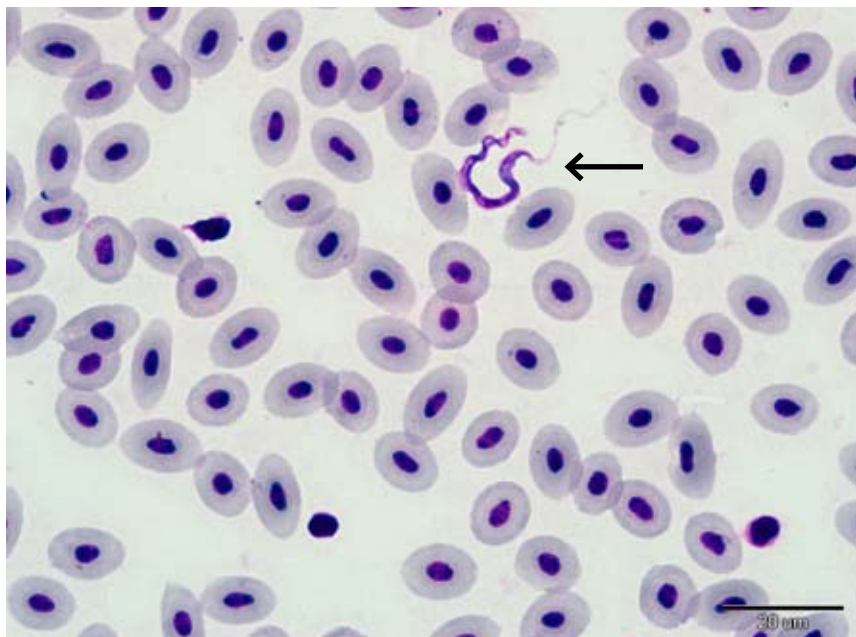
Druh ryby	Látka	Způsob aplikace	Doba expozice	Koncentrace	Lymfocyty		Neutrofilní granulocyty		Reference
					kontrola	pokus	kontrola	pokus	
Kapr obecný	Microcystin LR v biomase samic	per os	24 h	3 µg.kg ⁻¹ ž.hm.	58,5 ± 11,5	35,3 ± 19,4			Paliková a kol. (1998)
				300 µg.kg ⁻¹ ž.hm	58,5 ± 11,5	39,6 ± 19,6			
				600 µg.kg ⁻¹ ž.hm.	46,6 ± 13,4	22,8 ± 10,9			
				1200 µg.kg ⁻¹ ž.hm	46,6 ± 13,4	29,7 ± 8,1			
	Metribuzin	koupeľ	96 h	19,9 mg.l ⁻¹	97,7 ± 35,28	18,10 ± 11,79	3,01 ± 1,36	6,28 ± 2,87	Velíšek a kol. (2009b)
	Terbutryn	koupeľ	90 h	0,02 µg.l ⁻¹		104,06 ± 3,29		5,82 ± 2,62	Velíšek a kol. (2011)
				0,2 µg.l ⁻¹	86,99 ± 6,86	12,59 ± 4,16	8,24 ± 2,44	16,71 ± 4,62	
				2 µg.l ⁻¹		15,86 ± 3,26		11,28 ± 2,21	
Pstruh duhový	Metribuzin	koupeľ	96 h	89,3 mg.l ⁻¹	23,76 ± 11,67	11,66 ± 7,59	5,75 ± 1,00	5,87 ± 1,95	Velíšek a kol. (2008)
	Bifenthrin	koupeľ	96 h	14,7 µg.l ⁻¹	27,63 ± 5,19	31,99 ± 6,37	7,89 ± 2,24	5,34 ± 1,87	Velíšek a kol. (2009a)
	Carbamazepin	koupeľ	96 h	19,9 mg.l ⁻¹	4,84 ± 2,28	3,52 ± 1,82	0,24 ± 0,16	1,86 ± 0,92	Li a kol. (2011)

2.6. Parazité, kteří mohou být identifikováni v krevním nátěru

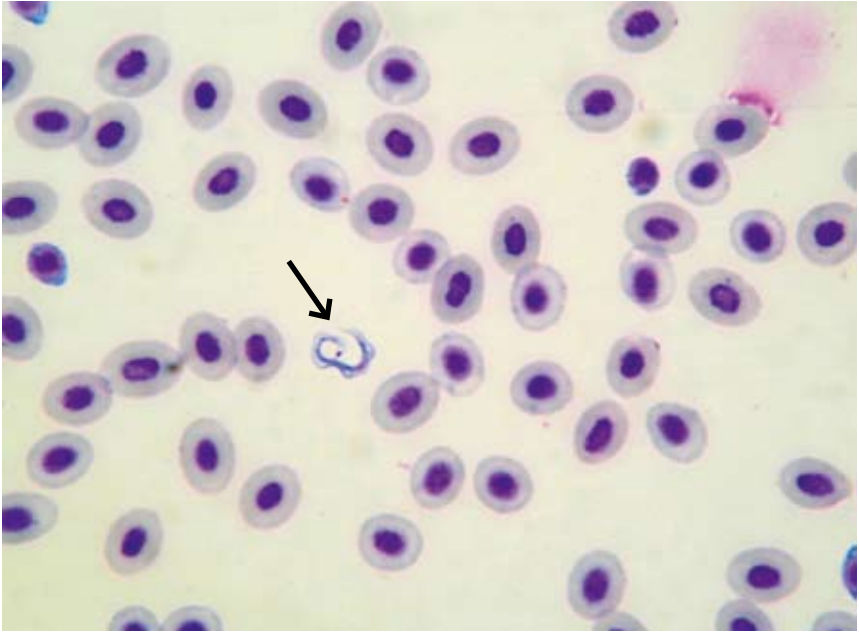
Kromě krevních buněk a různých artefaktů, vzniklých v průběhu barvení, mohou být v krevních nátěrech ryb zaznamenáni také někteří parazité nebo jejich vývojová stadia, vyskytující se v periferní krvi.

2.6.1. *Trypanosoma* sp., *Trypanoplasma* sp.

Jedná se o krevní bičíkovce, parazitující v krvi ryb, kteří napadají zejména kapra obecného, ale mohou být zaznamenáni i u jiných druhů ryb (lín, štika, amur atd.). Zástupci rodu *Trypanosoma* (obr. 55, 56) dosahují délky těla 30–70 μm a mají jeden bičík. V evropských povodích je nejrozšířenějším druhem *Trypanosoma danilewskyi*. Zástupci rodu *Trypanoplasma* dosahují délky těla do 30 μm a mají dva nestejně dlouhé bičíky, jeden směřující dopředu, druhý dozadu. Nejrozšířenějším druhem je *Trypanoplasma borelii*. Trypanosomy se od trypanoplasem liší štíhlejším tělem a rychlejším pohybem v nativním preparátu (Svobodová a kol., 2007).



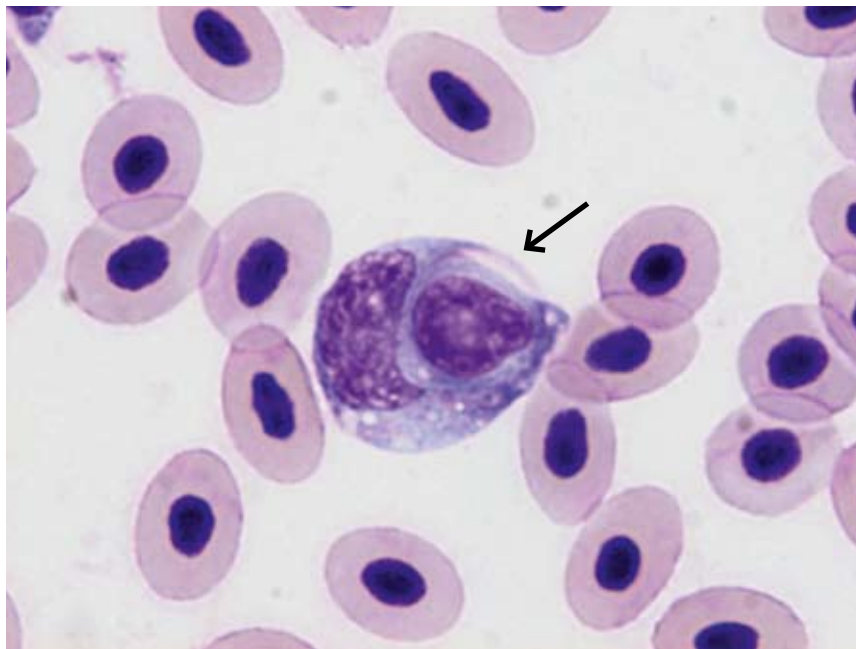
Obr. 55. *Trypanosoma* sp. v krevním nátěru úhoře říčního – barveno dle Pappenheima. (Foto: M. Palíková)



Obr. 56. *Trypanosoma* sp. v krevním nátěru kapra obecného – barveno dle Pappenheima.
(Foto: M. Palíková)

2.6.2. *Haemogregarina* sp.

Příslušníci rodu *Haemogregarina* (obr. 57) jsou protozoární parazité z kmene Apicomplexa, třída Sporozoasida, řád Adeleina čeleď Haemogregarinidae (Mihalca a kol., 2002). Svým vývojovým cyklem, ve kterém se střídají fáze merogonie, gamogonie a sporogonie, jsou velmi podobné kokcidiím (patří do stejné třídy). Typické je pro ně také střídání hostitelů. Jejich vývojová stadia jsou nacházena v erythrocytech, eventuálně leukocytech obratlovců včetně ryb, zejména mořských (Davies a kol., 2004). Nejčastěji jsou v červených krvinkách ryb nacházena vývojová stadia druhu *Haemogregarina bigemina* (Davies a Smit, 2001).



Obr. 57. *Haemogregarina* sp. v krevním nátěru kapra obecného, barveno dle Pappenheima. (Foto: M. Palíková)

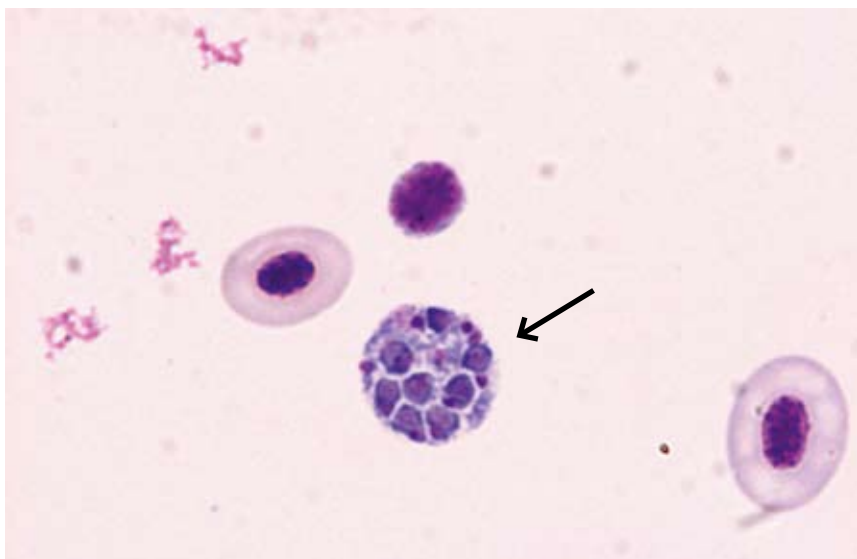
2.6.3. *Sphaerospora dykoveae* (dříve *S. renicola*)

Je to jeden z parazitických organismů kmene Myxozoa. V minulosti byli tito paraziti řazeni mezi prvoky, ale v současné době je jim přiznávána příslušnost k mnohobuněčným organismům. *S. dykoveae* cizopasí v ledvinách kaprovitých ryb. Vývoj vegetativních stádií (pseudoplazmodií) a vznik spor probíhá v epiteliálních buňkách ledvinných kanálků, což má za následek jejich poškození. V určité fázi vývoje parazita jsou do periferní krve vyplavována tzv. K-stadia (obr. 58, 59), pokládána za prekurzory sporogonního stadia (Baska a Molnár, 1988; Holzer a kol., 2014).

STANOVENÍ DIFERENCIÁLNÍHO POČTU LEUKOCYTŮ RYB



Obr. 58. Vývojové stadium *S. dykoveae* v krevním nátěru kapra obecného, barveno dle Pappenheima. (Foto: M. Palíková)



Obr. 59. Vývojové stadium *S. dykoveae* v krevním nátěru kapra obecného, barveno dle Pappenheima. (Foto: M. Palíková)

3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

Metodika představuje rozšíření metodiky č. 122 Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb autorů Svobodová, Pravda, Modrá vydané v roce 2012. Kromě teoretických informací o jednotlivých buňkách bílého krevního obrazu jsou zde zpracovány i praktické zkušenosti autorů s odečítáním leukogramů ryb. Pro uživatele metodiky je také velmi cenná obrazová příloha obsahující fotografie krevních nátěrů čtrnácti druhů sladkovodních ryb. Záměrně byly vybrány i fotografie ne zcela typických buněk a barevně nepříliš zdařilých nátěrů, protože s těmi se uživatelé jistě setkají častěji než s „učebnicovými“ příklady, které bývají uvedeny v hematologických publikacích.

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena pro praktické veterinární lékaře působící v chovech ryb, pro odborné pracovníky komerčních laboratoří a pro vědecké a výzkumné pracovníky. Obrazová příloha může uživatelům sloužit k porovnání s jejich vlastními nálezy.

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Aplikace metodiky do praxe veterinárních laboratoří přinese zkvalitnění služeb rybářskému sektoru. Využití komerčních barvicích kitů při stanovování leukogramu je sice nákladnější, ale představuje významnou časovou úsporu a mnohdy je výsledek nejen srovnatelný, ale dokonce lepší než při využití klasických barvicích metod.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ainsworth, A.J., 1992. Fish granulocytes: Morphology, distribution and function. Annual Review of Fish Diseases 2: 123–148.
- Antychowicz, J., Siwicki, A., 1992. Komorki układu odpornosciowego. In: Antychowicz, J., Siwicki, A. (eds.), Podstawy immunologii ryb. IWet Pulawy, 119–122.
- Ardelli, B.F., Woo, P.T.K., 2006. Immunocompetent cells and their mediators in finfish. In: Woo, P.T.K. (Ed.), Fish Diseases and Disorders, vol. 1, Protozoan and Metazoan Infections, 2nd edition.: CABI Publishing, 800 pp.
- Baska, F., Molnár, K., 1988. Blood stages of *Sphaerospora* spp. (Myxosporaea) in cyprinid fishes. Diseases of Aquatic Organisms 5: 23–28.
- Campbell, T.W., Ellis, C.K., 2007. Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology, 3rd Edition. Blackwell Publishing Professional, U.S.A., 287 pp.
- Collazos, M. E., Barriga, C., De Sande, F., Ortega, E., 1993. Seasonal variations and influence of gender on several hematological parameters in the cyprinid fish *Tinca tinca*. In: Cervino, A., Landin, A., DeCoo, A., Torre, M. (Eds), Proceedings of the Fourth National Congress on Aquaculture, Villanova Arousa, Spain, 173–178.
- Davies, A.J., Smit, N.J., 2001. The life cycle of *Haemogregarina bigemina* (Adeleina: Haemogregarinidae) in South African host. Folia Parasitologica 48 (3): 169–177.
- Davies, A.J., Smit, N.J., Hayes, P.M., Seddon, A. M., Wertheim, D., 2004. *Haemogregarina bigemina* (Protozoa: Apicomplexa: Adeleorina) – past, present and future. Folia Parasitologica 51 (2/3): 99– 03, 107–108.
- De Pedro N., Guijarro A.I., López-Patiño M.A., Martínez – Alvarez, R., Delgado, M.J., 2005. Daily and seasonal variations in haematological and blood biochemical parameters in the tench, *Tinca tinca* Linnaeus 1758. Aquaculture Research 36: 1185–1196.
- Donner, L., 1985. Klinická Hematologie. Avicenum, zdravotnické nakladatelství, 448 s.
- Doubek, J. a kol., 2003. Veterinární hematologie. Noviko a.s., Brno, 464 s.
- Drastichová, J., Modrá, H., Svobodová, Z., 2001. Leukogramy ryb z tekoucích vod. In: Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí. VÚRH JU, Vodňany, 148–153.
- Drastichová, J., Svobodová, Z., Lusková, V., Máchová, J., 2004. Effect of Cadmium on Hematological Indices of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 72: 725–732.

- Ellis, A.E., 1976. Leucocytes and related cells in the plaice, *Pleuronectes platessa*. Journal of Fish Biology 8: 143–156.
- Ellis, A.E., 1977. The leucocytes of fish: A review. Journal of Fish Biology 11: 453–491.
- Ferguson, H.V., 1979. The ultrastructure of plaice leucocytes. Journal of Fish Biology 8: 139–142.
- Fey, F., 1966. Verleichende Hämoytologie niederer Vertebraten. III Granulozyten. Folia Haematologia 86: 1–20.
- Flajšhans, M., Kocour, M., Gela, D., Piačková, V., 2004. The first results on relationships among amphimictic diploid, diploid gynogenic and triploid tench, *Tinca tinca* L. under communal testing. Aquaculture International 12 (1): 103–118.
- Flajšhans, M., Rodina, M., Pšenička, M., Těšitel, J., 2011. Image cytometric measurements of diploid, triploid and tetraploid fish erythrocytes in blood smears reflect the true dimensions of live cells. Cell Biology International 35 (1): 67–71.
- Groff, J.M., Zinkl, J.G., 1999. Hematology and Clinical Chemistry of Cyprinid Fish. Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice 2 (3): 741–776.
- Habekovič, D., 1991. The hematologic characteristics of sexual dimorphism of tench (*Tinca tinca* L.) during spawning period. Ichthyologia 23: 17–24.
- Holzer, A.S., Hartigan, A., Patra, S., Pecková, H., Eszterbauer, E., 2014. Molecular fingerprinting of the myxozoan community in common carp suffering Swim Bladder Inflammation identifies multiple etiological agents. Parasites and Vectors 7: 398
- Hrubec, T.C., Smith, S.A., 2006. Hematology of Fish. In: Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C. (Eds), Shalm's Veterinary Hematology. Blackwell Publishing Professional, Iowa, USA, 1120–1125.
- Hrubec, T.C., Cardinale, J.L., Smith, S.A., 2000. Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia (*Oreochromis* Hybrid). Veterinary Clinical Pathology 29: 7–12.
- Hrubec, T.C., Smith, S.A., Robertson, J.J., 2001. Age related in haematology and biochemistry of hybrid striped bass *Chrysops morone saxatilis*. Veterinary Clinical Pathology 30:8–15.
- Imagawa, T., Hashimoto, Y., Kitagawa, H., Kon, Y., Kudo, N., Sugimura, M., 1989. Morphology of blood cells in carp (*Cyprinus carpio* L.). Japanese Journal of Veterinary Sciences 51: 1163–1172.

STANOVENÍ DIFERENCIÁLNÍHO POČTU LEUKOCYTŮ RYB

- Jeziorska, B., 1993: The effect of lethal and sublethal values of acidification on blood of carp fry. In: Vykusova, B, Svobodova, Z, Machova, J. (Eds), Proceedings of 3rd Ichthyohaematological Conference. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology Vodnany, 34–39.
- Jirásek, J., Mareš, J., Palíková, M., 1998. Haematological and biochemical indices of blood in wels (*Silurus glanis*, L.) from intensive aquaculture. Acta Veterinaria Brno 67: 227–233.
- Kumar, S., Lata, S., Gopal, K., 1999. Deltamethrin Induced Physiological Changes in Freshwater Cat Fish *Heteropneustes fossilis*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 62: 254–258.
- Lamková, K., Šimková, A., Palíková, M., Jurajda, P., Lojek, A., 2007. Seasonal changes of immunocompetence and parasitism in chub (*Leuciscus cephalus*), a freshwater cyprinid fish. Parasitology Research 101: 775–789.
- Li, Z.H., Žlábek, V., Velíšek, J., Grabic, R., Máchová, J., Kolářová, J., Li, P., Randák, T., 2011. Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. Ecotoxicology and Environmental Safety 74: 319–327.
- Mekkawy, I.A., Mahmoud, U.M., Sayed, A.H., 2011. Effects of 4-nonylphenol on blood cells of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Tissue and Cell 43: 223–229.
- Mihalca, A., Achelaritei, D., Popescu, P., 2002. Haemoparasites of the genus *Haemogregarina* in a population of european pond turtles (*Emys orbicularis*) from Dragasani, Valea County, Romania. Revista Scientia Parasitologica 3 (2): 76–81.
- Modrá, H., 1999. Hodnocení vlivu různých neinfekčních faktorů na bílý krevní obraz ryb. Disertační práce, VFU Brno, 57 s.
- Modrá, H., Svobodová, Z., Kolářová, J., 1998. Comparison of differential leucocyte counts in fish of economic and indicator importance. Acta Veterinaria Brno 67: 215–226.
- Oluah, N.S., Mgbenka, B.O., 2004. Effect of Actelic 25 EC on the differential leucocyte counts of the catfish *Clarias albopunctatus* (Nichole&Lamonte, 1953). Animal Research International 1 (1): 52–56.
- Palíková, M., Navrátil, S., 2001. Occurrence of *Anguillicola crassus* in the water reservoir Koryčany (Czech Republic) and its influence on the health condition and haematological indices of eels. Acta Veterinaria Brno 70: 443–449.

- Palíková, M., Mareš, J., Jirásek, J., 1999. Characteristics of leucocytes and thrombocytes of selected sturgeon species from intensive breeding. *Acta Veterinaria Brno* 68: 259–264.
- Palíková, M., Kovářů, F., Navrátil, S., Kubala, L., Pešák, S., Vajcová, V., 1998. The effects of pure Microcystin LR and biomass of blue-green algae on selected immunological indices of carp (*Cyprinus carpio*, L.) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val.). *Acta Veterinaria Brno* 67: 265–272.
- Palíková, M., Navrátil, L., Papežíková, I., Ambrož, P., Veselý, T., Pokorová, D., Mareš, J., Adamovský, O., Navrátil, L., Kopp, R., 2012. Combined exposure of carps (*Cyprinus carpio* L.) to cyanobacterial biomass and white spot disease. *Neuroendocrinology Letters* 33, suppl. 3: 120–123.
- Pulsford, A. J., Lemaire-Gony, S., Tomlinson, M., Collingwood, N., Glynn, P.J., 1994. Effects of acute stress on the immune system of the dab, *Limanda limanda*. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 109 (2): 129–139.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Ishikawa, C.M., das Eiras, A.C., da Silveira, V.R., 2004. Effects of an Experimental Challenge with *Mycobacterium marinum* on the Blood Parameters of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47 (6): 945–953.
- Rieger, A. M., Bareda, D. R., 2011. Antimicrobial mechanisms of fish leucocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 35 (12): 1238–1245.
- Reček, L., Palíková, M., Lojek, A., Navrátil, S., 2009. Health Status of a Nase (*Chondrostoma nasus*) in Breeding Farms from Jihlava River Basin. *Acta Veterinaria Brno* 78: 99–106.
- Rey Vázquez, G., Guerrero, G.A., 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Tissue and Cell* 39: 151–160.
- Rey Vázquez, G., Lo Nostro, F., 2014. Changes in Hematological Parameters of *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes) Exposed to Sublethal Concentrations of 4-tert-Octylphenol. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology* 66: 463–469.
- Roberts, R.J., Ellis, A.E., 2001. The anatomy and physiology of teleosts. In: Roberts, R.J. (Ed.), *Fish Pathology*, 3rd edition. W. B. Saunders, London: 12–54.
- Řehulka, J., 1996. Blood parameters in common carp with spontaneous spring viremia (SVC). *Aquaculture International* 4: 175–182.

STANOVENÍ DIFERENCIÁLNÍHO POČTU LEUKOCYTŮ RYB

- Schalm, O.W., Jain, N.C., Carroll, E.J., 1975. Veterinary Hematology, 3th edition. Lea &Febiger, Philadelphia, USA, 807 pp.
- Schwaiger, J., Fent, K., Stecher, H., Ferling, H., Negele, R.D., 1996. Effects of sublethal concentrations of triphenyltinacetate on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Archive of Environmental Contamination and Toxicology 30: 327–334.
- Singh, N.N. and Srivastava, A.K., 2010. Haematological parameters as bioindicators of insecticide exposure in teleosts. Ecotoxicology 19: 838–854.
- Suzuki, Y., 1986. Cytochemistry of basophil granulocyte in carp and puffer. Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries 52 (11): 1895–1899.
- Svobodová, Z., Kouřil, J., Hamáčková, J., 1978. The values of some haematological indices in parent tench (*Tinca tinca*). Živočišná výroba 23: 825–833.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Paláčková, J., 1991. Unified methods of haematological investigation of fish. Manuals of Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology Vodňany 22, 31 s.
- Svobodová, Z., Kolářová, J., Flajšhans, M., 1998. The first findings of the differences in complete blood count between diploid and triploid tench, *Tinca tinca* L. Acta Veterinaria Brno 67: 243–248.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Modrá, H., 2012. Metody hematologického vyšetřování ryb. Edice Metodik VÚRH Vodňany, č. 122, 29 s.
- Svobodová, Z., Flajšhans, M., Kolářová, J., Modrá, H., Svoboda, M., Vajcová, V., 2001. Leukocyte profiles of diploid and triploid tench, *Tinca tinca* L. Aquaculture 198 (1–2): 159–168.
- Svobodová, Z., Kolářová, J., Navrátil, S., Veselý, T., Chloupek, P., Tesarčík, J., Čítek, J., 2007. Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb, 4. přepracované vydání. Informatorium, Praha, 264 s.
- Thrall, M.A., Baker, D.C., Campbell, T.W., DeNicola, D., Fettman, M.J., Lassen, E.D., Rebar, A., Weiser, G., 2006. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Blackwell Publishing, 518 s.
- Thuvander, A., Norrgren, L., Fossum, C., 1987. Phagocytic cells in blood from rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), characterized by flow cytometry and elektron microscopy. Journal of Fish Biology 31: 197–208.
- Tierney, K.B., Farrell, A.P., Kennedy, C.J., 2004. The differential leucocyte landscape of four teleosts: juvenile *Oncorhynchus kisutch*, *Clupea pallasii*, *Culaea inconstans* and *Pimephales promelas*. Journal of Fish Biology 65: 906–919.

- Toman, M. a kol., 2009. Veterinární imunologie – 2., doplněné a aktualizované vydání. Grada Publishing, a.s., 392 s.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Piačková, V., Novotný, L., Bláhová, J., Sudová, E., Malý, V., 2008. Effects of metribuzin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinární Medicína 53 (6): 324–332.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Piačková, V., 2009a. Effects of acute exposure to bifenthrin on some haematological, biochemical and histopathological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinární Medicína 54 (3): 131–137.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Piačková, V., Sudová, E., 2009b. Effects of Acute Exposure to Metribuzin on Some Hematological, Biochemical and Histopathological Parameters of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 82 (4): 492–495.
- Velíšek, J., Stará, A., Kolářová, J., Svobodová, Z., 2011. Biochemical, physiological and morfological responses in common carp (*Cyprinus carpio* L.) after long-term exposure to terbutryn in real environmental concentration. Pesticide Biochemistry and Physiology 100 (3): 305–313.
- Weinreb, E.L., 1963. Studies on the fine structure of teleosts blood cells. I. Peripheral blood. Anatomical Record 147 (2): 219–238.
- Witeska, M., 1998. Changes in selected blood indices of common carp after acute exposure to cadmium. Acta Veterinaria Brno 67: 289–293.
- Witeska, M., Baka, I., 2002. The effect of long-term cadmium exposure on common carp blood. Fresenius Environmental Bulletin 11 (12A): 1059–1065.
- Witeska, M., Kondera, E., Szymanska, M., Ostrysz, M., 2010. Hematological Changes in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) after Short-Term Lead (Pb) Exposure. Polish Journal of Environmental Studies 19 (4): 825–831.

7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Flajšhans, M., Vajcová, V., 2003. The haematology of gynogenic tench, *Tinca tinca* L. and of recessively homozygous colour tench strains. Journal of Applied Ichthyology 19 (3): 170–173. (dedikace: MSMT 126100001)
- Jirásek, J., Mareš, J., Palíková, M., 1998. Haematological and biochemical indices of blood in wels (*Silurus glanis*, L.) from intensive aquaculture. Acta Veterinaria Brno 67: 227–233. (dedikace: NAZV IE 5139)

STANOVENÍ DIFERENCIÁLNÍHO POČTU LEUKOCYTŮ RYB

- Lamková, K., Šimková, A., Palíková, M., Jurajda, P., Lojek, A., 2007. Seasonal changes of immunocompetence and parasitism in chub (*Leuciscus cephalus*), a freshwater cyprinid fish. *Parasitology Research* 101: 775–789. (dedikace: GACR 524/04/1128; 524/07/0188; MSM 0021622416; LC522)
- Palíková, M., Navrátil, S., 2001. Occurrence of *Anguillicola crassus* in the water reservoir Koryčany (Czech Republic) and its influence on the health condition and haematological indices of eels. *Acta Veterinaria Brno* 70: 443–449. (dedikace: CEZ:J16/98:162700004)
- 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. (bez dedikace)
- Palíková, M., Kovářů, F., Navrátil, S., Kubala, L., Pešák, S., Vajcová, V., 1998. The effects of pure Microcystin LR and biomass of blue-green algae on selected immunological indices of carp (*Cyprinus carpio*, L.) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val.). *Acta Veterinaria Brno* 67: 265–272. (dedikace: MSMT 32/97)
- Reček, L., Palíková, M., Lojek, A., Navrátil, S., 2009. Health Status of a Nase (*Chondrostoma nasus*) in Breeding Farms from Jihlava River Basin. *Acta Veterinaria Brno* 78: 99–106. (dedikace: NAZV QF3028)
- Sudová, E., Piačková, V., Kroupová, H., Pijaček, M., Svobodová, Z., 2009. The effect of praziquantel applied per os on selected haematological and biochemical indices in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 35: 599–605. (dedikace: MSM 6007665809 and MSM 6215712402)
- Svobodová, Z., Flajšhans, M., Kolářová, J., Modrá, H., Svoboda, M., Vajcová, V., 2001. Leukocyte profiles of diploid and triploid tench, *Tinca tinca* L. *Aquaculture* 198 (1–2): 159–168. (dedikace: EP0960996051; MSMT 126100001)
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Piačková, V., 2007. Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on haematological profile on common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Veterinaria Brno* 76 (3): 487–492. (dedikace: NAZV QF3029; MSM 6007665809; GACR 523/03/H076)
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Piačková, V., 2009. Effects of acute exposure to bifenthrin on some haematological, biochemical and histopathological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Medicine-Czech* 54 (3): 131–137. (dedikace: MSM 6007665809; SP/2e7/229/07)

- Velíšek, J., Svobodová, Z., Piačková, V., Sudová, E., 2009. Effects of acute exposure of metribuzin on some haematological, biochemical and histopathological parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 82 (4): 492–495. (dedikace: MSM 6007665809; SP/2e7/229/07)
- Velíšek, J., Štastná, K., Sudová, E., Turek, J., Svobodová, Z., 2009. Effects of subchronic simazine exposure on some biometric, biochemical, hematological and histopathological parameters of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). Neuroendocrinology Letters 30 Suppl 1: 236–241. (dedikace: Czech Science Foundation Project No. 525/09/P218; MSM 6007665809; SP/2e7/229/07)
- Velíšek, J., Zusková, E., Stará, A., Svobodová, Z., 2013. Use of biometric, hematological, and plasma biochemical variables and histopathology to assess the chronic effects of the herbicide prometryn on common carp. Veterinary Clinical Pathology 42: 508–515. (dedikace: CZ.1.05/2.1.00/01.0024; USB 087/2013/Z; CZ.1.07/2.3.00/20.0024)

Interní odborný oponent

dr. hab. Ing. Velíšek Josef, 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, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany

Externí odborný oponent

prof. Dr. Ing. Jan Mareš

Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Oponent za státní správu

Ing. Vladimír Gall

Ministerstvo zemědělství, úsek lesního hospodářství, Sekce lesního hospodářství, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství, Těšnov 17, 117 05 Praha 1

Osvědčení o uplatněné certifikované metodice č. 160/89037/2014-16230 Nmet CERTIFIKOVANÁ METODIKA ze dne 23. 12. 2014

Ministerstvo zemědělství, úsek lesního hospodářství, Sekce lesního hospodářství, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství, Těšnov 17, 117 05 Praha 1

Adresa autorského kolektivu

MVDr. Veronika Piačková, Ph.D. (piackova@frov.jcu.cz), 40 %

MVDr. Eliška Zusková, Ph.D. (zuskova@frov.jcu.cz), 10 %

prof. Ing. Martin Flajšhans, Dr.rer.agr. (flajshans@frov.jcu.cz), 10 %

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, www.frov.jcu.cz

doc. MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D. (palikovam@vfu.cz), 40 %

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav ekologie a chorob zvířete, ryb a včel, Palackého 1-3, 612 42 Brno, www.vfu.cz

*V edici Metodik (Technologická řada) vydala Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod.
odborný editor: MVDr. Jitka Kolářová, Ing. Antonín Kouba, Ph.D.,
redakce: Zuzana Dvořáková, Ing. Blanka Vykusová, CSc.
Náklad: 200 ks, vytištěno v roce 2014
Grafický design a technická realizace: Profi-tisk group, s.r.o.*



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

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



ISBN 978-80-7514-024-1

Vydání a tisk metodiky je uskutečněno za finanční podpory projektu
OP Rybářství 2007–2013:
Metodiky IV (2014–2015); reg. č. CZ.1.25/3.1.00/13.00479



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ RYBÁŘSKÝ FOND
„Investování do udržitelného rybolovu“