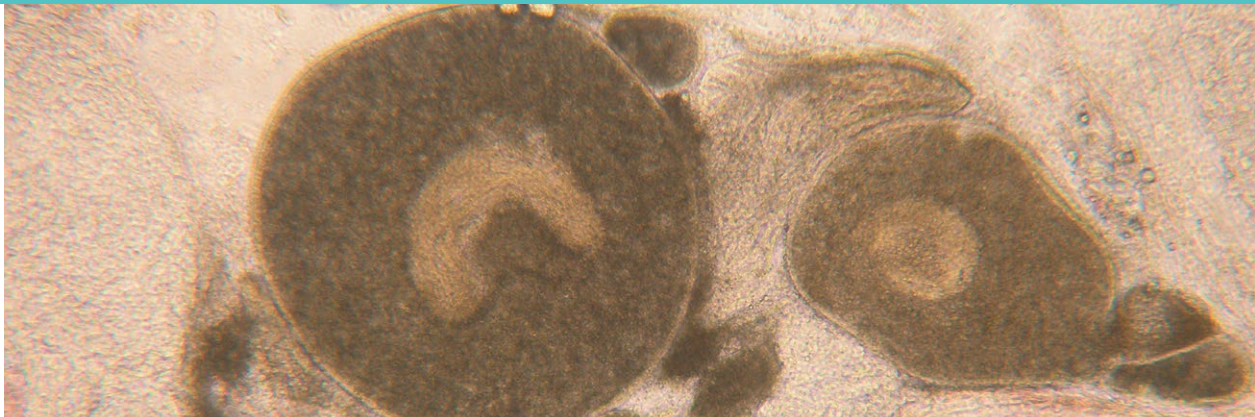




Fakulta rybnářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

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

Ochrana zdraví ryb 2015



Vodňany, 1.-2. 4. 2015



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

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

Ochrana zdraví ryb 2015

Vodňany, 1.-2. 4. 2015



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

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



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



Ochrana zdraví ryb 2015

Vodňany, 1.–2. 4. 2015

Pořadatel

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany vod ve Vodňanech (FROV JU)

Akce je pořádána v rámci řešení projektu:

Odborné rybnářské semináře (2014–2015), reg. číslo: CZ.1.25/3.1.00/13.00490

Operační program Rybnářství 2007–2013

Evropský rybnářský fond



**EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ RYBNÁŘSKÝ FOND
„Investování do udržitelného rybolovu“**

Odborní recenzenti jednotlivých příspěvků: MVDr. Jitka Kolářová a MVDr. Veronika Piačková, Ph.D.

Redakce: Zuzana Dvořáková

Za jazykovou a věcnou stránku příspěvků odpovídají jednotliví autoři, redakce provedla pouze úpravy pro tisk.

Vydala: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany vod, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany

Grafický design a technická realizace: JENA Šumperk

Vydání 1., v roce 2015, 60 ks

ISBN 978-80-7514-029-6

STŘEDA 1. 4. 2015

8:00–9:30	Registrace účastníků	
9:30–9:40	Zahájení semináře	
9:40–10:00	Ohlédnutí za Dr. Tesarčíkem	s. 10
	doc. Ing. Jiří Řehulka, DrSc. (Slezské zemské muzeum, Opava)	
10:00–10:20	Výuka předmětu Nemoci ryb na VFU Brno – historie a současnost	
	prof. MVDr. Stanislav Navrátil, CSc. (Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, FVHE)	
10:20–10:40	Nákazová situace a veterinární dozor v chovech ryb	s. 12
	MVDr. Marie Vágnerová (Státní veterinární správa, Praha)	
10:40–11:00	Postup při potvrzení a následné likvidaci ohniska nebezpečné nákazy ryb	
	MVDr. Lucie Filášová (Krajská veterinární správa České Budějovice)	s. 16
11:00–11:30	Přestávka na kávu	
11:30–11:50	Rozdílná vnímavost plemen kapra ke KHV	s. 21
	MVDr. Veronika Piačková, Ph.D. (Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV JU)	
11:50–12:10	Nové virové onemocnění kaprů KSD/CEV	s. 25
	Ing. Tomáš Veselý, CSc. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno)	
12:10–12:30	Možnosti vakcinace v chovech ryb v ČR	s. 29
	MVDr. Leona Nepejchalová, Ph.D. (ÚSKVBL, Brno)	
12:30–13:30	Oběd	
13:30–13:50	Bakteriologická diagnostika nejčastějších infekcí ryb v našich chovech ryb	
	prof. MVDr. Alois Čížek, CSc. (Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, FVL)	s. 36
13:50–14:10	Sezónní dynamika vybraných imunologických parametrů u různých druhů lososovitých ryb	s. 39
	MVDr. Ivana Papežíková, Ph.D. (Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, FVHE)	
14:10–14:30	Použití antibiotik v chovech ryb v ČR	s. 43
	MVDr. Jitka Kolářová (Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV JU)	
14:30–15:00	Přestávka na kávu	
15:00–15:20	Proliferativní onemocnění ledvin pstruha duhového v podmínkách intenzivního chovu: patogeneze, hematologické a imunitní parametry	
	doc. MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D. (Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, FVHE)	s. 46
15:20–15:40	Sezónní dynamika ergasilózy ryb ve vybraných VN Povodí Moravy v souvislosti s rozvojem zooplanktonu	s. 50
	Bc. Eva Jelínková (Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, FVHE)	
15:40–16:00	Metabolizace praziquantelu a fenbendazolu u pstruha duhového po perorální aplikaci	s. 53
	Mgr. Zdeňka Soukupová (Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, FVHE)	
16:00–18:30	Exkurze po objektech FROV JU	
19:00	Společná večeře	

ČTVRTEK 2. 4. 2015

9:30–9:50	Ichthyoparazitologie v Čechách a na Moravě: od Friče ke škulovci prof. RNDr. Tomáš Scholz, CSc. (Parazitologický ústav, Biologické centrum AV ČR)	
9:50–10:10	ECIP – současnost a perspektivy české ichthyoparazitologické školy	s. 57
	doc. RNDr. Milan Gelnar, CSc. (Ústav botaniky a zoologie, Přírodovědecká fakulta, MU, Brno)	
10:10–10:30	Kdo má na svědomí zánět plynového měchýře u plůdku kapra obecného? – Molekulární metody řeší problémy s identifikací u myxozoárních parazitů	
	RNDr. Ivan Fiala, Ph.D. (Parazitologický ústav BC AV ČB)	s. 60
10:30–10:50	Využití pesticidů na bázi pyrethroidů k léčení parazitárních onemocnění kapra obecného	s. 62
	dr. hab. Ing. Josef Velíšek, Ph.D. (Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV JU)	
10:50–11:20	Přestávka na kávu	
11:20–11:50	Testování účinnosti praziquantelu při léčbě vybraných helmintóz ryb	s.66
	MVDr. Eliška Zusková, Ph.D. (Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV JU)	
11:50–12:10	Možnosti léčby parazitóz v chovech ryb v ČR	s.70
	MVDr. Jitka Kolářová, MVDr. Leona Nepejchalová, Ph.D. (Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV JU; ÚSKVBL, Brno)	
12:10–12:30	Znečištění vodního prostředí cizorodými látkami a jejich vliv na vodní organismy	s.73
	doc. Ing. Tomáš Randák, Ph.D. (Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV JU)	
12:30–13:30	Oběd	
13:30–13:50	Úhyn ryb v rybníce jako důsledek deficitu kyslíku – popis případu (říjen 2014)	s.77
	prof. MVDr. Zdeňka Svobodová, DrSc. (Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, FVHE)	
13:50–14:10	Zavzdušněná voda jako příčina úhynu ryb	s.80
	Ing. Jana Máchová, Ph.D. (Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV JU)	
14:10–14:30	Zdravotní problematika na pstruží farmě v Hynčicích a její řešení z pohledu praxe	s.84
	MVDr. Miroslav Kulich (Pstruží líheň Hynčice)	
14:30–15:00	Přestávka na kávu	
15:00–16:00	Závěrečná diskuse a ukončení semináře	
		s.89
Seznam účastníků		

Přednášky semináře Ochrana zdraví ryb 2015

OHLÉDNUTÍ ZA MVDr. J.F. TESARČÍKEM, CSc.

Jiří Řehulka

Slezské zemské muzeum v Opavě, e-mail: rehulka@szm.cz

V sobotu 14. 2. 2015 se v obci Dobrá naposledy rozloučila odborná a sportovní rybářská veřejnost s ichtyopatologem MVDr. Janem F. Tesarčíkem, CSc.

Zájem o pedagogickou a výzkumnou činnost rodáka z Dobré u Frýdku-Místku se odvíjí už při studiích na veterinární fakultě Vysoké školy zemědělské v Brně v pozici pomocné vědecké síly na mikrobiologickém ústavu, kde po studiích pokračuje jako odborný asistent v kolektivu prof. MVDr. Ing. O. Mráze, DrSc. Krátce poté odchází na katedru fyziologie hospodářských zvířat agronomické fakulty Vysoké školy zemědělské v Brně. Potřeba rybářských odborníků v oblasti diagnostiky nemocí ryb v tehdy rozvíjející se akvakultuře začíná doporučením prof. MVDr. V. Dyka, DrSc., na hodonínskou Výzkumnou stanici rybářskou VÚRH. Po krátkém působení se stěhuje do Vodňan, kde je v prosinci roku 1960 jmenován ředitelem ČSAZV VÚRH



ve Vodňanech ing. F. Chytrou na místo odborného asistenta. V ČSAZV VÚRH Vodňany sloužil v letech 1961 až 1969 a v roce 1966 byl jmenován odborným pracovníkem II. stupně. Po devíti letech práce v ČSAZV VÚRH ve Vodňanech rozšiřuje pracovní tým ostravského pracoviště specializovaného na chov a nemoci lososovitých ryb, vedeného ing. Josefem Kupkou. Po úmrtí vedoucího pracoviště byl v červenci 1971 pověřen prozatímním vedením tohoto dislokovaného pracoviště. V roce 1970 byl ředitelem ústavu ing. V.Krupauerem, CSc. jmenován vědeckým asistentem na ostravském pracovišti ústavu a v roce 1974 byl pověřen funkcí koordinátora dílčího úkolu ŽV-4-2, po předchozím přeřazení na místo samostatného odborného pracovníka. S výzkumnou činností zesnulého úzce souvisí obhajoba jeho kandidátské disertační práce „Neoechinorhynchóza kaprů, její výskyt v ČSSR v uplynulých letech a současné možnosti preventivních a léčebných zásahů při jejím zjištění“ (školitel prof. MVDr. V. Dyk, DrSc., oponent akademik V. Baruš), která se však v důsledku tehdy jeho nepopulárního kádrového profilu v průběhu normalizace a s nutností opakování některých zkoušek protáhla až do roku 1978. Po dvacetiletém působení na ostravském pracovišti VÚRH přerušuje svou výzkumnou činnost a jako vítěz konkurzu nastupuje po jmenování ministrem zemědělství do funkce ředitele Státního rybářství, s.p., Ostrava, kde pracoval až do odchodu do důchodu v červenci roku 1994.

Jeho první výzkumné záměry byly věnované studiu branchiomykózy z hledisky vypracování pomocné diagnostické metody k rozlišení *Branchiomyces sanguinis* Plehn a *Branchiomyces demigrans* Wundsch (Práce VÚRH Vodňany 3, 1963, 101–107) a posléze se spolupracovníky popisuje plísňovou nákazu žaber u síha severního marény (Veterinářství 2, 1963, 63-64 a Veterinářství 3, 1965, 320–322). Z řady řešených výzkumných úkolů od roku 1960 do roku 1991 lze za nejvýznamnější pro praxi hodnotit dva okruhy řešených problémů. Jako první to bylo propracování možnosti dehelmintizace kaprů při neoechinorhynchóze tehdy dostupným čs. preparátem Tetrafinolem, a tím přerušení vývojového cyklu tohoto nejrozšířenějšího vrteješe našich rybníčních druhů ryb. Z výsledků experimentů vyplynulo, že kromě dehelmintizace

vrtejšů v zažívadlech kaprů lze ryby ozdravit jejich přenesením do nezamořeného prostředí ve vhodnou dobu. Z ekonomického a praktického hlediska pak byla vyvinuta možnost jednoduchého přerušení vývoje neoechinorhynchů aplikací Tetrafinolu v krmivu. Druhý zásadní okruh řešených otázek se týkal výzkumu prevence infekční vodnatelnosti, které se jako vedoucí kolektivu spolupracovníků z Biovety Ivanovice na Hané – střediska v Opavě a z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně věnoval v letech 1971 až 1978 v rámci úkolu ŽV-4-2-2, především v jihočeské rybníční oblasti. Po předcházejících třicetiletých tuzemských i zahraničních vědeckých diskuzích byla tak prvně objasněna úloha viru *Rhabdovirus carpio* jako etiologického agens jarní virémie kaprů u nás. Přínos řešení této problematiky spočíval také v odlišení jarní virémie kaprů od erythrodermatitidy, které umožnilo diferencovanou prevenci těchto dvou obávaných infekčních chorob. Výsledky výzkumu jarní virémie kaprů byly pod jeho vedením v roce 1979 oceněny čestným uznáním Československé akademie zemědělské na 45. zasedání jejího předsednictva, v zahraničí pak byly zveřejněny v evropském kontextu jmen významných imunologů v časopise Elsevier „Developmental and Comparative Immunology“ ve sdělení A short history of research on immunity to infectious diseases in fish od autorů W.B. Van Muiswinkel a M.Nakao v roce 2013.

MVDr. J.F. Tesarčík, CSc. je autorem řady odborných publikací a metodik a spoluautorem knižních publikací, z nichž většina vychází z jeho činnosti na ostravském pracovišti, kde evidoval zdravotní a epizootologickou situaci v chovech lososovitých ryb. Nelze vynechat jeho aktivní spolupráci v tomto regionu s organizacemi Českého rybářského svazu, Státním rybářstvím a se závody Povodí Odry. Za tuto činnost mu oborový ředitel Státního rybářství, o.p., při příležitosti 60. výročí VÚRH Vodňany v září 1981 předal medaili „Nejlepší pracovník Státního rybářství“.

Vyřešené výzkumné projekty v úloze řešitele a spoluřešitele lze v časovém přehledu shrnout následovně: Výzkum biotechniky lososovitých ryb (1971), Výzkum účinné veterinární prevence v chovu lososovitých ryb (1973), Výzkum nových technologických postupů v chovu lososovitých ryb (1973), Výzkum infekční vodnatelnosti sladkovodních ryb ve vztahu k parazitózám (1973), Izolace virových agens z případů akutní infekční vodnatelnosti (1975), Propracování technologie přípravy primárních tkáňových kultur pro praktické použití k diagnostice jarní virémie kaprů (1976), Výzkum nových chovatelských metod v rybářství (1976), Výzkum technologických postupů a účinné veterinární prevence v chovu lososovitých ryb (1976), Vyhodnocení a nový širší klinický pokus aplikace biopreparátu proti jarní virémii kaprů (1976), Chov lososovitých ryb, zejména sivena amerického v klecových zařízeních (1977), Výzkum metod chovu lososovitých ryb ve velkokapacitních farmách včetně veterinární prevence (1978), Výzkum intenzivního chovu lososovitých ryb (1979), Optimální preventivní postupy v intenzivních chovech ryb (1979), Výzkum komplexu žaberních onemocnění kapra (1982), Studium ichtyoftiriózy lososovitých ryb a rozpracování boje s ní (1982), Studium protozoárních nemocí (hexamitózy a ichtyoftiriózy) lososovitých ryb a rozpracování boje s nimi (1984), Studium erythrodermatitidy kaprů (1984), Metody profylaxe a terapie chorob kapra a pstruha duhového (1987), Výzkum zdravotního stavu rybích obsádek ve vodárenských nádržích, tocích a rybochovných zařízeních (1988).

V krátkém nekrologu nebylo možné zcela postihnout životní a pracovní pouť zemřelého. Nebylo možné vyjmenovat škálu jeho odborných vystoupení na tuzemských a zahraničních rybářských konferencích a nelze zapomenout na příjemné chvíle při osobním setkání věnovaná příhodám u vody a zejména jeho vlastním kulinářským receptům při úpravě ryb.

MVDr. J. F. Tesarčík, CSc., zůstane ve vzpomínkách odborné a sportovní rybářské veřejnosti, které vycházejí z jeho přátelského vystupování, ochoty a schopnosti se kontaktovat při řešení problémů s rybářskými odborníky a praktiky.

NÁKAZOVÁ SITUACE A VETERINÁRNÍ DOZOR V CHOVECH RYB

Marie Vágnerová

Odbor ochrany zdraví a pohody zvířat Ústřední veterinární správy Státní veterinární správy, Praha, e-mail: m.vagnerova@svs.cz

Souhrn

V období předchozích dvou let bylo v České republice potvrzeno celkem devatenáct ohnisek virové hemoragické septikémie (dále jen „VHS“) a infekční nekrózy krvetvorné tkáně (dále jen „IHN“) v hospodářstvích s chovem pstruha duhového a štiky obecné. V roce 2012 nebyla tato nákaza na území České Republiky diagnostikována a v roce 2011 bylo potvrzeno pouze 1 ohnisko. Tato nepříznivě se vyvíjející nálezová situace je důvodem k poskytnutí základních informací o ohniscích VHS a IHN, postupech prevence zavlečení těchto nákaz do chovu a způsobech jejich eradikace.

VHS a IHN jsou vysoce infekční virová onemocnění lososovitých ryb a štik. Tyto nákazy se podle přílohy č. 2 zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, (dále jen „veterinární zákon“) řadí mezi nebezpečné nákazy zvířat. Vyhláška č. 290/2008 Sb., o veterinárních požadavcích na živočichy pocházející z akvakultury a na produkty akvakultury, o opatřeních pro předcházení a zdolávání některých nákaz vodních živočichů (dále jen „vyhláška č. 290/2008 Sb.“), konkrétně příloha č. 3, část II vyjmenovává ryby, které jsou vnímavé k výše uvedeným nebezpečným nálezům. Tato vyhláška byla aktualizována vyhláškou č. 59/2013 Sb. a vyhláškou č. 134/2014 Sb.

Státní veterinární správa (dále jen „SVS“) provádí od roku 1998 na území České republiky cílený dozor zaměřený na VHS, IHN a KHV. Cílem tohoto dozoru je sledovat výskyt nebezpečných nákaz ryb a v případě výskytu účinně nález tlumit. Díky cílenému veterinárnímu dozoru byl zjištěn v letech 2013 a 2014 zvýšený výskyt případů VHS a IHN. V porovnání s předchozími roky došlo k výraznému zhoršení nálezové situace.

Veterinární dozor v chovech ryb v ČR

V souladu s přílohou č. 2 části B vyhlášky č. 290/2008 Sb., je doporučeno na hospodářství s chovem druhů ryb vnímavých k některé z nebezpečných nález provádět dozor. Tento dozor je nastaven dle úrovně nálezového statutu v dané oblasti. Celá ČR má s ohledem na nález VHS, IHN a KHV nedefinovaný nálezový status. V případě nedefinovaného nálezového statutu se dle legislativy nastavuje v produkčních podnicích akvakultury aktivní dozor. Aktivní dozor provádí orgány veterinárního dozoru (SVS) a zahrnuje prohlídku populace vodních živočichů zaměřenou na klinické příznaky nález, odběr vzorků během kontroly v případě podezření z výskytu nález nebo pozorovaného zvýšeného úhynu a povinnost chovatele okamžitého hlášení výskytu nález či podezření z jejich výskytu nebo jakýkoliv zvýšený úhyn ryb.

Nad rámec legislativy je na území ČR zaveden cílený dozor, který se dle doporučení má provádět v oblastech prostých nález nebo oblastech, které mají přijatý program eradikace. Cílený dozor zahrnuje stejně tak jako u aktivního dozoru provádění kontrol orgány veterinárního dozoru a povinnost chovatelů okamžitého hlášení výskytu stanovených nález či podezření z jejich výskytu nebo jakýkoliv zvýšený úhyn ryb. Rozdíl mezi těmito dvěma dozory je, že v rámci cíleného dozoru se navíc provádí odběr předepsaných vzorků a jejich vyšetření na specifické patogenní původce stanovenými metodami. Tento odběr je uveden v Metodice kontroly zdraví zvířat a nařízené vakcinace pro daný kalendářní rok. Jedná se o vyšetření na VHS, IHN a KHV

nákazy. Samozřejmě i u cíleného dozoru platí, že se provádí prohlídka populace živočichů pocházejících z akvakultury během kontroly a odběr diagnostických vzorků během kontroly v případě podezření na nákazu uvedenou na seznamu.

Kontroly příslušnými orgány veterinárního dozoru (SVS)

Frekvence kontrol prováděné SVS na hospodářství schválených produkčních podniků akvakultury je stanovena na základě vyhodnocené úrovně rizika. Úrovně rizika jsou celkem tři, a to vysoká, střední a nízká. Úroveň rizika se vyhodnocuje na základě zohlednění faktorů, ovlivňujících možné zavlečení nákazy na hospodářství i možné šíření nákazy z hospodářství. Při vyhodnocování úrovně rizika se zejména přihlíží k faktoru přímého šíření nákazy vodou a k přesunům živočichů pocházejících z akvakultury. Na základě vyhodnocené úrovně rizika se stanovuje frekvence kontrol na hospodářství. Pokud má produkční podnik akvakultury úroveň rizika vysokou nebo střední, pak se provádí kontroly jedenkrát za rok a pokud má nízkou úroveň rizika, pak kontroly probíhají jednou za dva roky.

Povinnost okamžitého hlášení

Povinnost okamžitého hlášení výskytu či podezření z výskytu stanovených nálezů nebo jakýkoliv zvýšený úhyn ryb je dána v § 11 odst. 1 veterinárního zákona. Ohlašovací povinnost nebezpečné nálezů zaniká, jestliže podezření nahlásil chovatel soukromému veterinárnímu lékaři.

Odběr předepsaných vzorků na VHS, IHN, KHV

Dozor nad nálezů ryb a odběr předepsaných vzorků na VHS, IHN a KHV probíhá s různými modifikacemi již od roku 1998.

a) Odběr předepsaných vzorků na VHS a IHN

V Metodice kontroly zdraví a nařízené vakcinace pro rok 2015 se v rámci cíleného dozoru v chovech ryb provádí odběr vzorků na všech hospodářstvích s chovem vnímavých druhů ryb požadovaných věkových kategorií (ryba ve věku plůdek až do stáří 18 měsíců, generační ryba) dvakrát ročně v období od sebe vzdálených minimálně 3 měsíce s tím, že musí být při odběru vzorků teplota vody nižší než 14 °C. Jsou-li v hospodářství vytírány generační ryby, je nutné v jednom z termínů nahradit odběr ryb odběrem ovariální tekutiny. Vyšetření na VHS a IHN se provádí u vnímavých ryb a sivena amerického ze společného vzorku. Na hospodářstvích, která produkují pouze násady do volných vod, se provádí na tyto nálezů virologické vyšetření ovariální tekutiny odebrané při výtěru jednotlivých druhů generačních ryb.

Provádí se odběr 30 ks ryb nebo odběr ovariální tekutiny od 30 ks generačních ryb. Pokud se na hospodářství nacházejí ryby slabé, nemocné nebo vykazující změny chování, musí být upřednostněny. Pokud se na hospodářství chová pstruh duhový, celý vzorek sestává z ryb nebo ovariální tekutiny tohoto druhu, i když se současně na hospodářství chovají jiné druhy vnímavých ryb. V případě, že se na hospodářství nechová pstruh duhový, odebírají se poměrně vzorky ostatních vnímavých druhů.

b) Odběr předepsaných vzorků na KHV

Vyšetření se provádí na celém území ČR jedenkrát ročně. Na vybraných hospodářstvích se odebere 30 ryb. Hospodářství vybírá krajská veterinární správa na základě vyhodnocení míry rizika. Monitoring je prováděn u kaprů obecných, přednostně by se měla odebírat kategorie K2, případně je možné odebrat kategorie K1. Odběr vzorku probíhá v období od června do září,

to je nutné dodržet z důvodu teplotního optima pro působení viru cca 18 – 28°C. Pro vyšetření se přednostně vybírají ryby slabé, vykazující změny chování, soustředěné především u hladiny a přítoku nebo čerstvě uhynulé. Pokud takové ryby na hospodářství nejsou, odběr se provádí tak, aby reprezentoval obsádku jako celek.

Aktuální nálezová situace v chovech ryb v ČR

S ohledem na nákazy VHS a IHN na území ČR došlo k výraznému zhoršení nálezové situace oproti předchozím rokům. Největší problém způsobovala nákaza VHS hlavně v roce 2014. Od roku 2008 do roku 2012 se VHS a IHN nákaza objevovala na našem území pouze ojediněle. V roce 2013 a především v roce 2014 došlo k výraznému nárůstu počtu ohnisek VHS a IHN.

Ohniska VHS a IHN v letech 2013–2014

V roce 2013 se z celkového počtu 100 monitorovaných hospodářství s chovem vnímavých ryb provedlo 172 odběrů a potvrdilo se 5 ohnisek. Čtyři ohniska byla potvrzena na základě zjištění klinických příznaků. Jedno ohnisko bylo zjištěno v rámci cíleného dozoru. Těchto 5 ohnisek se vyskytlo v kraji Moravskoslezském, Jihočeském kraji a Olomouckém kraji. V červnu roku 2013 byly v ČR záplavy, které způsobily velké ztráty v chovech ryb. Došlo ke ztrátám ryb úhynem i únikem a možnému roznesení viru do volných vod.

V roce 2014 se během 152 odběrů v rámci cíleného dozoru odebraly vzorky ze 100 hospodářství. Z toho bylo v rámci cíleného dozoru potvrzeno celkem 10 samostatných ohnisek VHS, dvě samostatné nákazy IHN a dva případy potvrzení společného výskytu nákaz VHS a IHN. Tři ohniska (dvakrát společný výskyt VHS a IHN a jedno ohnisko IHN), která byla potvrzena 6. 1. 2014, spadají do cíleného dozoru 2013 (podzimní odběry), ale zahrnujeme je do případů v roce 2014, protože výsledek vyšetření z Národní referenční laboratoře pro virové choroby ryb při VÚVeL v Brně (dále jen „NRL“) a vydání mimořádných veterinárních opatření (dále jen „MVO“) připadlo do 2014. Ohniska v roce 2014 se vyskytla v kraji Vysočina, Pardubickém kraji a Královéhradeckém kraji.

Postup KVS SVS při podezření na výskyt nebezpečné nákazy ryb

Při podezření na výskyt nebezpečné nákazy ryb je chovatel povinen nahlásit podezření na Krajskou veterinární správu (dále jen „KVS“) nebo soukromému veterinárnímu lékaři. Soukromý veterinární lékař má následně povinnost informovat KVS. Úřední veterinární lékař pak provede kontrolu na místě společně s odběrem vzorků. Až do stanovení výsledku vyšetření NRL pro virové choroby ryb KVS postupuje podle veterinárního zákona a v souladu s § 19 –21 vyhlášky č. 290/2008 Sb. KVS vydá do doby výsledku vyšetření předběžné opatření. Pokud laboratorní vyšetření neprokáže přítomnost nákazy, předběžné opatření bude ukončeno.

Postup při potvrzení výskytu nebezpečné nákazy ryb

V případě potvrzení nákazy KVS postupuje podle veterinárního zákona a v souladu s § 27–28 vyhlášky č. 290/2008 Sb. Zásadní informací je, že u těchto nákaz není léčba známa. Pokud se onemocnění v chovu prokáže, je jediným východiskem ryby utratit a neškodně odstranit. Proto je důležité klást velký důraz na prevenci, aby nedošlo k zavlečení této nebezpečné nákazy do chovu. Aktuální informace je možné nalézt na webu www.svs.cz v sekci Zdraví zvířat – Ryby.

Literatura

Zákon č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně souvisejících zákonů (veterinární zákon), ve znění pozdějších předpisů.

Vyhláška č. 290/2008 Sb., o veterinárních požadavcích na živočichy pocházející z akvakultury a na produkty akvakultury, o opatřeních pro předcházení a zdolávání některých nálezů vodních živočichů, ve znění pozdějších předpisů.

Metodika kontroly zdraví zvířat a nařízené vakcinace na rok 2015, Věstník MZe, částka 2, prosinec 2014

OIE (World Organisation for Animal Health), Viral haemorrhagic septicaemia/Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2013. Dostupný z: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online/>

Svobodová, Z. a kol., 2007. Nemoci sladkovodních a akvariálních RYB. Čtvrté, přepracované vydání. Informatorium, Praha, 264 s.

Informační systém Státní veterinární správy

POSTUP PŘI POTVRZENÍ A NÁSLEDNÉ LIKVIDACI OHNISKA NEBEZPEČNÉ NÁKAZY RYB – KONKRÉTNÍ PŘÍPAD Z PRAXE

Lucie Filášová

Krajská veterinární správa Státní veterinární správy pro Jihočeský kraj, České Budějovice, e-mail: l.filasova.kvsc@svscr.cz

Vzhledem ke vzrůstajícímu trendu výskytu nebezpečných nákaz ryb virová hemoragická septikémie (VHS) a infekční hematopoetická nekróza (IHN) se úřední veterinární lékaři častěji setkávají v praxi s výskytem těchto nákaz v dozorovaných chovech. Již v případě vyslovení podezření je nutné nařídít na místě zákaz přesunů ryb a především zahájit epizootologické šetření. Zjišťuje se především původ nákazy, zdroje kontaminace a možnost zavlečení původce nákazy na další hospodářství. Původce nebezpečné nákazy ryb ve vzorcích musí být vždy potvrzen Národní referenční laboratoří (NRL) pro virové choroby ryb, následně je zahájeno správní řízení ve věci nařízení mimořádných veterinárních opatření (MVO) při výskytu nebezpečné nákazy ryb. Ohniskem se vyhláší příslušná epizootologická jednotka. O dalším nakládání s vnímavými druhy ryb v ohnisku se rozhoduje na základě věkové kategorie a klinické manifestace nákazy. Ryby vykazující klinické příznaky nákazy musí být vždy utraceny a neškodně zpracovány v asanačním podniku. Utrácení ryb za použití CO₂ zajišťují Pohotovostní střediska pro mimořádné situace při krajské veterinární správě. Během utrácení je sledována účinnost metody vyhodnocováním projevů vědomí ryb z důvodu dodržování zásad welfare. Základními podmínkami pro zrušení ohniska je odstranění všech vnímavých ryb a provedení závěrečné ohniskové dezinfekce. Z důvodu zabránění dalšího zavlečení nebezpečné nákazy ryb na hospodářství lze doporučit všem chovatelům, aby zavedli alespoň základní preventivní opatření k minimalizaci rizika zavlečení původců nákaz do chovu a aby dohlíželi na jejich dodržování.

Legislativní podklad

V případě podezření z výskytu a následného potvrzení ohniska nebezpečné nákazy ryb postupujeme v souladu s Hlavou III vyhlášky č. 290/2008 Sb., o veterinárních požadavcích na živočichy pocházející z akvakultury a na produkty akvakultury, o opatřeních pro předcházení a zdolávání některých nákaz vodních živočichů. Z důvodu upřesnění postupu ve specifických podmínkách chovů ryb v České republice byla problematika výskytu ohnisek nebezpečných nákaz ryb zpracována v Metodickém návodu SVS č. 1/2013. Při zabezpečení likvidace ohniska nebezpečné nákazy ryb se dále řídí pohotovostním plánem pro případ výskytu nebezpečných nákaz ryb.

Popis postiženého hospodářství

Hospodářství je součástí produkčního podniku akvakultury (PPA) spolu s jedním dalším hospodářstvím, které se nachází na území stejného okresu ve vzdálenosti přibližně 10 km. Mezi hospodářstvími dochází k přesunům ryb, zaměstnanců i vybavení (především společná vozidla). Hospodářství je zásobováno vodou z náhonu. Přírodní koryto je v areálu hospodářství z velké části zabudováno pod panely ve formě kanálu. Hospodářství má i vlastní vrt, který slouží především jako zdroj vody pro líheň. Vzhledem k povaze průtočného systému chovu je zařízení při vydatných srážkách postižováno povodní. Celé hospodářství je oplocené. Hlavní činností hospodářství je produkce násad různých druhů ryb, které jsou vysazovány do rybářských revírů. Na hospodářství je prováděn výtěr generačních ryb, líhnutí a odchov plůdku. Zároveň

jsou ryby nakupovány z tuzemských i zahraničních zdrojů. Na hospodářství se produkuje tržní ryba, která se prodává v rámci velkoobchodu i přímo konečnému spotřebiteli.

Postup při vyslovení podezření z výskytu nebezpečné nákazy ryb

Podezření na výskyt nebezpečné nákazy ryb z důvodu zvýšeného hynutí pstruha duhového oznámil vedoucí provozu hospodářství dne 21. 10. 2013 v 7.30 hodin ráno úřednímu veterinárnímu lékaři (ÚVL), který ihned zahájil epizootologické šetření. Na základě anamnézy bylo zjištěno, že již dne 18. 10. 2013 došlo ke zvýšenému úhynu pstruha duhového (Pd2) dodaného regionální MO ČRS dne 10. 10. 2013 přímo v revíru vysazení. V době oznámení hynutí ryb od MO ČRS nebyl na hospodářství původu plůdku pstruha duhového zaregistrován zvýšený úhyn. Během následujících dvou dnů došlo k úhynům pstruha duhového i na hospodářství nejprve ve žlabu S 13 a následně ve žlabech S 15, S 16 a S 19 (obr. 1). Obsádka ryb ve žlabu S 13 byla tvořena pstruhem duhovým kategorie Pd1 v množství 60 000 kusů původem ze zahraničí. V ostatních postižených žlabech S 15, S 16 a S 19 byly chovány kategorie pstruha duhového Pd1 a Pd2, které pocházely z vlastního chovu. Ve žlabu S 13 byla v době šetření naměřena teplota vody 8 °C. Na dně v místě výtoku vody se nacházeli uhynulí jedinci, další ryby v nádrži vykazovaly klinické příznaky onemocnění, především špatnou koordinaci pohybů, spirálovitý pohyb, někteří jedinci se nacházeli v boční poloze. Byla provedena pitva tří kusů pstruhů, přičemž byly zjištěny patologickoanatomické příznaky onemocnění jako anémie žaber, krváceniny v dutině tělní a na orgánech. Na základě úhynů, manifestace klinických příznaků a výsledku pitvy bylo vysloveno podezření na výskyt nebezpečných nálezů IHN a VHS (terénní pitvou a zjištěním na místě nelze nákazy rozlišit, existuje i možnost podvojně infekce). Ze žlabu S 13 byl během epizootologického šetření odebrán úřední vzorek 30 kusů pstruha duhového a doručen ještě téhož dne do NRL pro virové choroby ryb.

Do protokolu byla chovateli na místě v souvislosti s vyslovením podezření na výskyt nebezpečné nákazy ryb nařízena opatření podle § 13 odst. 3 a § 76 odst. 4 veterinárního zákona. Chovateli byl nařízen zákaz přesunu ryb z a do výše uvedeného hospodářství do doby potvrzení nebo vyloučení nákazy.

Postup při potvrzení výskytu nebezpečné nákazy ryb

Dne 23. 10. 2013 bylo vyhodnoceno NRL pro virové choroby ryb PCR vyšetření odebraných vzorků jako pozitivní na přítomnost DNA viru VHS, vyšetření vzorku na IHNV bylo negativní. Dne 24. 10. 2013 byl NRL pro virové choroby ryb vypracován a schválen protokol o zkoušce a téhož dne byla provedena kontrola hospodářství ÚVL a seznámení chovatele s pozitivním výsledkem laboratorního vyšetření na VHS. Do protokolu o kontrolním zjištění bylo zahájeno správné řízení ve věci nařízení mimořádných veterinárních opatření (MVO) při výskytu nebezpečné nákazy ryb – virové hemoragické septikémie (VHS).

Dne 25. 10. 2013 bylo vydáno místně příslušnou KVS SVS rozhodnutí nařizující MVO při výskytu nebezpečné nákazy ryb – VHS. Do MVO bylo vymezeno ohniskem nákazy postižené hospodářství jako epizootologická jednotka. Prostřednictvím MVO bylo chovateli nařízeno ohnisko označit tabulkou „NEBEZPEČNÁ NÁKAZA – vstup zakázán“ a jeho uzávěra ve smyslu zákazu přemísťování vnímavých druhů ryb a jiker a dále vozidel, technologického vybavení, pracovních nástrojů a pomůcek z ohniska bez účinné dezinfekce. Omezen byl i přesun zaměstnanců pracujících v ohnisku do dalších provozů s chovem vnímavých druhů ryb na případy nezbytně nutné při dodržení veškerých protinákazových opatření. U vnímavých druhů ryb tržní velikosti bez klinických příznaků byla stanovena možnost usmrcení a prodeje

konečnému spotřebiteli. Pro ostatní kategorie vnímavých druhů byla nařízena likvidace do 15. 11. 2013 odborně způsobilou osobou podle zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání. Z vnímavých druhů ryb se na hospodářství nacházely pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), pstruh obecný (*Salmo trutta*), lipan podhorní (*Thymallus thymallus*) a síh maréna (*Coregonus maraena*). V souvislosti s utracením ryb bylo chovateli nařízeno usmrčené ryby neškodně odstranit v souladu s § 40 veterinárního zákona a provést mechanickou očištění a průběžnou dezinfekci nádrží, pomůcek, zařízení a dopravních prostředků.

Z důvodů předchozího záchytu viru VHS v ovariální tekutině sivena amerického v roce 2011, vzhledem k popsáním záchytům viru VHS u tohoto druhu ve světě a na základě úhynům v obsádce sivena amerického (kategorie Si2) ve žlabech S 17 a S 18 byly odebrány zástupcem NRL pro virové choroby ryb dne 25. 10. 2013 dva směsné vzorky. Vzorky byly následně vyšetřeny na přítomnost původce nákazy VHS s negativním výsledkem.

Do MVO byl nařízen zákaz přemísťování druhů ryb považovaných v souladu s nařízením Komise 2008/1251/ES za přenašeče nákazy VHS na hospodářství s vnímavými druhy ryb. Z přenašečů nákazy VHS se na hospodářství nacházely druhy jeseter (*Acipenser* sp.), kapr obecný (*Cyprinus carpio*), jelec jesen (*Leuciscus idus*) a jelec tloušť (*Leuciscus cephalus*), plotice obecná (*Rutilus rutilus*) a sumec velký (*Silurus glanis*). Většina druhů ryb považovaných za přenašeče byla prodána konečnému spotřebiteli přímo na hospodářství. Pouze obsádka tržní kategorie sumce velkého (900 kg) byla po schválení ÚVS SVS a místně příslušné KVS SVS přemístěna do vodní nádrže bez chovu vnímavých druhů ryb a přenašečů v jiném kraji. Zásilka byla doprovázena úředně potvrzeným veterinárním osvědčením. Dále byla v MVO obsažena podmínka pro nové osazení hospodářství vnímavými druhy ryb až poté, kdy na hospodářství nebudou přítomny vnímavé druhy ani druhy ryb považované za přenašeče a bude provedena závěrečná ohnisková desinfekce.

Dne 25. 10. 2013 bylo vydáno nařízení Státní veterinární správy nařizující ochranná a zdlávací opatření v souvislosti s výskytem nebezpečné nákazy ryb – VHS. Do nařízení bylo vymezeno vedle ohniska nákazy uzavřené pásmo představované přesně definovaným úsekem řeky zásobující hospodářství vodou z náhonu, a to od ohniska po první soutok s větším tokem (definováno vždy souřadnicemi GPS). Na tomto úseku řeky se nenachází žádná hospodářství s chovem druhů ryb vnímavých k nákaze VHS, opatření se vztahovala na případné vypouštění ryb do revírů a sportovní rybolov. Pozorovací doba byla stanovena na období 3 měsíců od zrušení ohniska nákazy. V uzavřeném pásmu bylo nařízeno včasné a neškodně odstraňovat uhynulé ryby a jakékoliv podezření z výskytu nákazy hlásit místně příslušné KVS SVS. Z uzavřeného pásma se nesměly vnímavé druhy ryb přesouvat, pouze klinicky zdraví jedinci směli být využiti k přímé spotřebě. V rámci sportovního rybolovu bylo nařízeno neškodně odstranit vnitřnosti ulovených ryb. Omezeno bylo i vysazení ryb do uzavřeného pásma.

Utrácení vnímavých ryb v ohnisku

Na základě objednávky PPA a po koordinační schůzce v ohnisku za účelem určení termínu, rozsahu a postupu utrácení hospodářství provedli pracovníci obou PSMS (Hradec Králové a PSMS Brno) utrácení klinicky nemocných ryb v ohnisku za použití CO₂. Během utrácení ryb se měří pH vody a koncentrace O₂ a CO₂ ve vodě pro kontrolu účinnosti usmrcování ryb, přičemž pH kolem 5 indikuje plné nasycení vody CO₂. Účinnost usmrcení ryb je posuzována na základě hodnocení vestibulookulárního reflexu a dýchacích pohybů ryb.

Usmrčené ryby průběžně odloveny z nádrží a přemístěny do přistaveného kontejneru a odvezeny asanačním podnikem. Na hospodářství zůstala pouze nádrž ZS 2 s obsádkou nevnímavé ryby, a to s ročkem sivena amerického v počtu 10 000 ks.

Průběžná a závěrečná dezinfekce, zrušení ohniska

Po likvidaci ryb a vypuštění nádrží bylo provedeno zimování a následně (na jaře) mechanické čištění betonových nádrží, kanálů, rybníků, hrází a zařízení pro chov a transport ryb tlakovou horkou vodou. Ze dna rybníků byla odstraněna povrchová vrstva bahna. Po vyschnutí bylo bahno odvezeno na schválenou skládku komunálního odpadu. Chovatel provedl následně průběžnou dezinfekci. Závěrečná ohnisková dezinfekce byla provedena specializovanou firmou ve dnech 11. 03. 2014 až 12. 03. 2014. K použití přípravku Persteril 36% v koncentraci 0,1% dal souhlas správce příslušného toku.

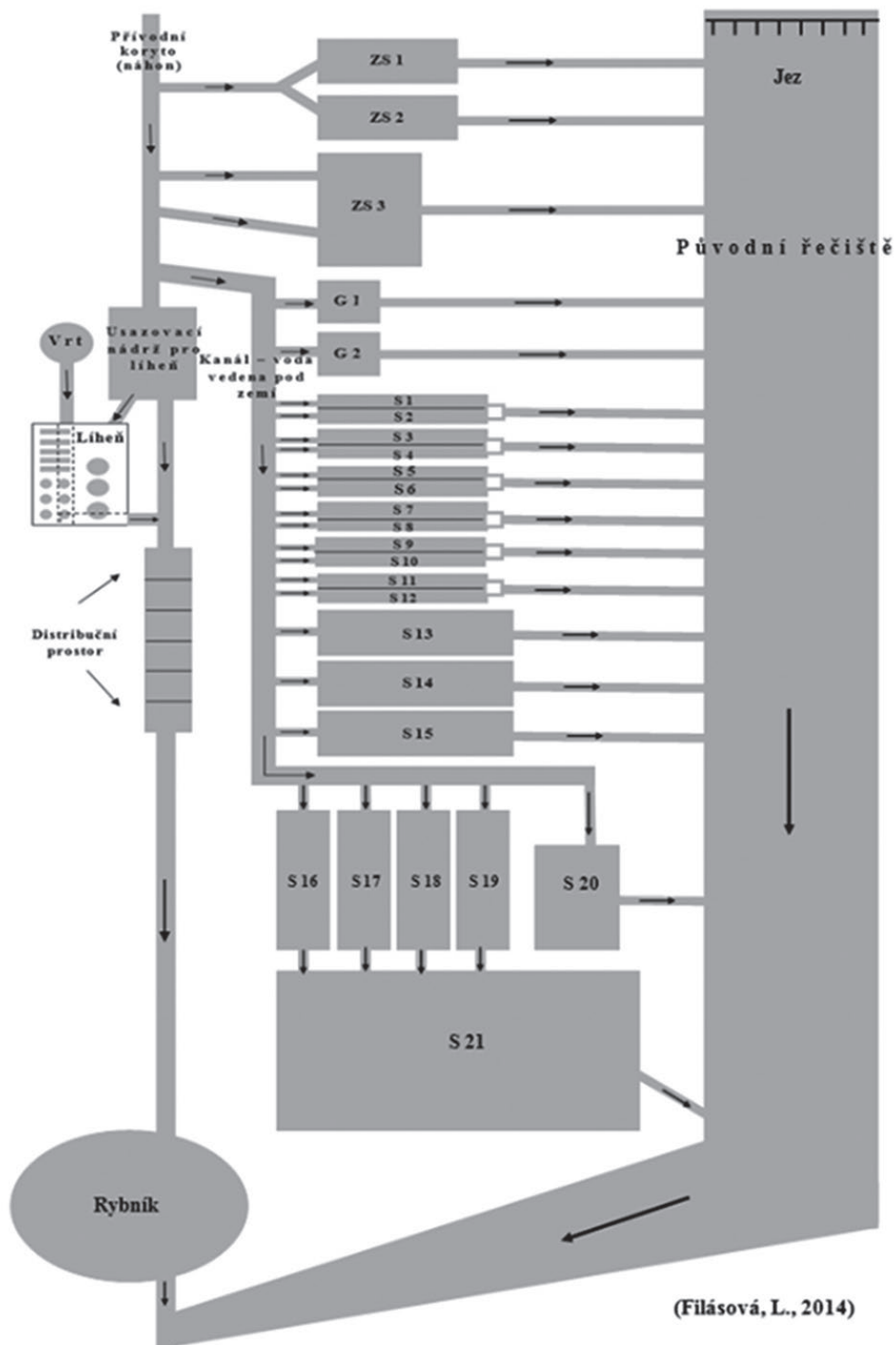
Jelikož chovatel splnil všechna ustanovení nařízená prostřednictvím MVO, bylo dne 31. 03. 2014 vydáno rozhodnutí, kterým se zrušilo rozhodnutí nařizující MVO. Ukončením MVO započala tříměsíční pozorovací doba pro uzavřené pásmo. V pozorovací době nebyly zaznamenány žádné úhyny vnímavých ryb k nákaze VHS v uzavřeném pásmu a proto byla dne 01. 07. 2014 ukončena ochranná a zdlavací opatření v souvislosti s výskytem VHS v uzavřeném pásmu a zrušeno nařízení Státní veterinární správy.

Výsledek epizootologického šetření a určení potencionálního zdroje nákazy

Na základě epizootologického šetření byla jako nejpravděpodobnější zdroj nákazy vyhodnocena zásilka pstruha duhového ze zahraničí dovezená na hospodářství dne 29. 04. 2013. Jedinci z této zásilky byli umístěni do žlabu S 13, ve kterém následně došlo k nejvyšším úhynům a výskytům klinicky nemocných ryb. V úvahu připadá zavlečení původce nákazy buď přímo nakoupenými rybami, nebo vodou ze zásilky. Klinickou manifestaci nákazy VHS u pstruha duhového až po šesti měsících od dovozu lze zdůvodnit vhodnou teplotou vody spolu se stresem po prožitých povodních v červnu 2013 a následných pracích na obnově hospodářství v průběhu léta. Povodně mohou být příčinou výskytu nákazy v ostatních žlabech, jelikož došlo k zaplavení nádrží a dokonce vyplavení ryb do vodoteče. Došlo tak k promíchání vody v jednotlivých žlabech a k mísení ryb. V ostatních postižených žlabech byly chovány také mladé věkové kategorie pstruha duhového, které pocházely z vlastního chovu.

Nastavení pravidel biologické bezpečnosti v chovu

Ve spolupráci s chovatelem byla navržena následující preventivní opatření ke snížení rizika opětovného zavlečení původce nebezpečné nákazy ryb do chovu: bezpečný zdroj ryb, kompartmentalizace hospodářství (5 kompartmentů), kontrolované přesuny mezi hospodářstvími PPA, nařízený postup práce pro zaměstnance, vyčlenění dopravních prostředků pro jednotlivá hospodářství PPA a úprava zásobování vodou.



Obr. 1. Schéma postiženého hospodářství (ohniska).

ROZDÍLNÁ VNÍMAVOST PLEMEN KAPRA KE KHV

Veronika Piačková¹, Dagmar Pokorová², Stanislava Reschová², Aleš Pospíchal¹, Tomáš Veselý²

¹Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany vod, Vodňany, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, e-mail: piackova@frov.

²Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, e-mail: vesely@vri.cz

Souhrn

Světový chov okrasných (koi) i konzumních kaprů je od konce dvacátého století ohrožován nebezpečným virovým onemocněním způsobeným herpesvirem zařazeným do čeledi *Alloherpesviridae* a označeným *Cyprinid herpesvirus 3* (CyHV-3). Přestože je v České republice kapr hlavním rybím druhem chovaným v akvakultuře a i chov okrasné variety kapra je poměrně rozšířený, dosud bylo na našem území zaznamenáno pouze několik ojedinělých případů hynutí kaprů v důsledku tohoto onemocnění a několik asymptomatických záchytů viru v rámci monitoringu. Vzhledem k tomu, že sousední země, zejména Polsko a Německo, byly v posledních letech koi herpesvirózou značně zasaženy, je absence onemocnění v našich chovech malou záhadou.

V rámci grantového projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum MZe byla v laboratorních podmínkách testována vnímavost některých u nás chovaných plemen, meziplenných hybridů a linií kapra obecného (*Cyprinus carpio*) vůči tomuto viru. Výsledky experimentálních infekcí prokázaly, že většina plemen a hybridů, v jejichž rodokmenu se vyskytuje původní divoký kapr z povodí řeky Amur, tzv. Amurský sazan, vykazuje statisticky významně vyšší odolnost vůči onemocnění koi herpesvirózou než plemena a hybridy vyšlechtění pouze z původní dunajské populace divokého kapra obecného.

Úvod

První případy onemocnění, jehož původce byl následně identifikován jako Koi Herpesvirus (KHV) byly zaznamenány u koi kaprů v Izraeli a v USA (Walster a kol., 1999; Hedrick a kol., 2000). Od té doby se onemocnění rozšířilo téměř po celém světě (Pokorová a kol., 2005). Původce byl díky svým morfologickým vlastnostem zařazen do nově vytvořené čeledi *Alloherpesviridae*. V literatuře jej můžeme najít pod pojmenováním Koi Herpesvirus (KHV) (Hedrick a kol., 2000; Gilad a kol., 2002), Carp Nephritis and Gill Necrosis Virus (CNGV) (Hutoran a kol., 2005) nebo *Cyprinid herpesvirus 3* (CyHV-3) (Waltzek a kol., 2005).

Hlavním faktorem, podmiňujícím vznik onemocnění, je teplota vody. Onemocnění se projevuje mezi 18 a 28 °C, přičemž nevhodnější teplota pro replikaci viru je kolem 24 °C. Při 30 °C již onemocnění nepropukne (Siwicki a kol., 2004). Klinicky se koi herpesviróza projevuje dezorientovaným plaváním, shromažďováním ryb u hladiny a u přítoku a zvýšenou frekvencí dýchání. Povrch těla nabývá skvrnitého vzhledu v důsledku nepravidelné tvorby hlenu, někdy doprovázené kožními erozemi. Při pitvě nemocných nebo uhynulých ryb bývají zjišťovány především rozsáhlé nekrózy žaberního aparátu (Hedrick a kol., 2000; Perelberg a kol., 2003). Histologicky bylo poškození žaber charakterizováno jako spojování lamel v důsledku hyperplazie respiratorních epitelálních buněk, někdy byly zjišťovány hemoragie na vrcholcích žaberních tyčinek. Kromě žaber jsou při koi herpesviróze postiženy ledviny, v jejichž parenchymu se rozvíjí intersticiální glomerulonefritida, periglomerulární fibróza a hyperplastické změny ledvinných kanálků (El-Din, 2011).

Monitoring výskytu CyHV-3 v chovech kapra a koi kapra byl zahájen v roce 2005 v rámci grantového projektu NAZV „Ochrana chovů kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) před onemocněním způsobeným koi herpesvirem (KHV)“. V rámci tohoto projektu byly vzorky ryb ze 7–10 chovů ročně pomocí PCR vyšetřovány na přítomnost DNA koi herpesviru (Pokorová a kol., 2007). Od srpna roku 2008 byla koi herpesviróza zařazena na seznam nálezů povinných hlášením a monitoring výskytu viru v chovech převzala Státní veterinární správa ČR. Počty klinických ohnisek koi herpesvirózy i počty asymptomatických záchytů viru v rámci obou monitoringů se ročně dají vyčíslit v jednotkách případů. V porovnání se sousedními zeměmi (Polsko, Německo) (Antychowicz, 2005; Kempter a Bergmann, 2007) je tato prevalence poměrně nízká. Jedním z možných důvodů je i skutečnost, že při šlechtění některých nových plemen a při tvorbě užitkových hybridů byl kromě plemen vycházejících z původního dunajského kapra (*Cyprinus carpio*) využit také Ropšinský šupinatý kapr, který v sobě nese část krve divokého kapra z povodí asijské řeky Amur – Amurského sazana (Pokorný a kol., 1995), který podle současné systematiky náleží k druhu kapra asijského, *Cyprinus rubrofuscus*. Předpokládá se, že plemena a hybridy vycházející z tohoto druhu mohou zdědit jeho přirozenou odolnost.

Materiál a metodika

Do testů odolnosti vůči KHV byla zařazena čistá plemena a hybridy kapra obecného s ohledem na jejich genetickou příslušnost k druhům *C. carpio* a *C. rubrofuscus* (Tab. 1). Pro kontrolu navození a průběhu infekce byl do všech testů zařazen i koi kapr. K testům byl použit plůdek kapra a koi kapra na konci prvního vegetačního období. Výběr plemen a hybridů byl do značné míry závislý na provozu líhně, proto byly některé skupiny testovány víckrát než jiné. Výsledná kumulativní mortalita je váženým průměrem kumulativních mortalit ze všech experimentů.

Testy odolnosti jednotlivých plemen a hybridů byly prováděny v laboratorních podmínkách. Ryby byly infikovány dvouhodinovou koupelí ve známé koncentraci viru, poté přesazeny do samostatných nádrží. Během následujících třiceti dní byly zaznamenávány úhyny ryb a prováděno ověření přítomnosti CyHV-3 ve tkáních uhynulých ryb. Pro průkaz virové DNA ve tkáních byla použita metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) s využitím primerů dle Bercoviera a kol., 2005.

Tab. 1. Plemena a meziplenní hybridy kapra obecného testování na odolnost vůči koi herpesviróze.

plemena odvozená od <i>Cyprinus rubrofuscus</i>		plemena odvozená od <i>Cyprinus carpio</i>		F ₁ hybridy
Název plemene	značka	Název plemene	značka	Značky rodičovských plemen (♀ x ♂)
Amurský sazan	AS	Jihočeský kapr šupinatý	C73	Rop x Tat
Ropšinský kapr šupinatý	Rop	Mariánskolázeňský kapr šupinatý	ML	M2 x M72
Severský lysec	M72	Třeboňský šupináč	TŠ	M2 x AM _p
Amurský lysec, linie Vodňany	AL _v	Pohořelický lysec	PoL	M2 x AM _v
Amurský lysec, linie Pohořelice	AL _p	syntetická linie	C 435	
		Přerovský šupináč	PŠ	
		Maďarský lysec	M2	
		Tatajský kapr šupinatý *	Tat *	

* Tatajský kapr šupinatý nebyl testován jako čisté plemeno, ale byl využit na „otcovské pozici“ hybrida s Ropšinským kaprem šupinatým (Rop x Tat).

Výsledky

Všechny ryby uhynulé v průběhu pokusů byly CyHV-3 pozitivní. Nejnižší kumulativní mortalita byla podle očekávání zaznamenána u Amurského sazana (1,7%), nejvyšší u koi kapra (96,6%). Průměrná kumulativní mortalita nižší než 50% byla zaznamenána u Ropšínského šupinatého kapra (5%), křížence Ropšínského kapra s Tatajským (10%), u obou linií novošlechtěného plemene Amurského lysce (ALP a ALV; 26,7%), u kříženců těchto dvou linií s Maďarským lyscem (M2 x ALP 16,7%; M2 x ALV 26,7%) a u čistého M2 (43,3). Ostatní plemena a hybridy vykazovali mortalitu vyšší.

Diskuse a závěr

Výsledky experimentálních infekcí byly statisticky zpracovány. Původní hypotéza, že plemena a hybridy mající genetickou souvislost s Amurským sazánem, jsou odolnější proti infekci CyHV-3, se potvrdila. Mortalita těchto plemen a hybridů byla signifikantně nižší ($p < 0,001$) než mortalita plemen a hybridů odvozených od *Cyprinus carpio*. Vysoká odolnost kříženců s AS byla prokázána už Shapirou a kol. (2005), kteří je použili v podobném testu společně s čistým izraelským plemenem DOR70, jugoslávským plemenem Našice a s jejich vzájemnými kříženci.

Mezi plemeny, která vykazovala kumulativní mortalitu nižší než 50%, byla zastoupena všechna plemena odvozená od *C. rubrofasciatus* kromě jediného, Severského lysce M72. Naproti tomu Maďarský lysec M2 a jeho kříženci vykazovali překvapivě nízkou mortalitu. Vzhledem ke spotřebitelské atraktivitě lysých plemen je významné především zařazení Amurského lysce a jeho hybridů mezi skupiny s relativně nízkou kumulativní mortalitou.

Literatura

- Antychowicz, J., 2005. Koicarp herpesvirus infection. *Medycyna Weterynaryjna* 61 (7): 735–738.
- Bercovier, H., Fishman, Y., Nahary, R., Sinai, S., Zlotkin, A., Eyngor, M., Gilad, O., Eldar, A., Hedrick, R.P., 2005.
- Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiology* 5: 13.
- El-Din, M.M.M., 2011. Histopathological studies in experimentally infected koi carp (*Cyprinus carpio* koi) with Koi Herpesvirus in Japan. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 3 (3): 252–259.
- Gilad, O., Yun, S., Andree, K.B., Adkison M.A., Zlotkin A., Bercovier H., Eldar A., Hedrick, R.P., 2002. Initial Characteristics of Koi Herpesvirus and Development of a Polymerase Chain Reaction Assay to Detect the Virus in Koi, *Cyprinus carpio* koi. *Diseases of Aquatic Organisms* 48: 101–108.
- Hedrick, R.P., Gilad, O., Yun, S., Spangenberg, J.V., 2000. A Herpesvirus Associated with Mass Mortality of Juvenile and Adult Koi, a Strain of Common Carp. *Journal of Aquatic Animal Health* 12: 44–57.
- Hutoran M., Ronen A., Perelberg A., Ilouze M., Dishon A., Bejerano I., Chen N., Kotler M., 2005. Description of an as yet unclassified DNA virus from diseased *Cyprinus carpio* species. *Journal of Virology* 79: 1983–1991.
- Kempton, J., Bergmann, S.M., 2007. Detection of koi herpesvirus (KHV) genome in wild and farmed fish from Northern Poland. *Aquaculture* 51: 272.
- Perelberg, A., Smirnov, M., Hutoran, M., Diamant, A., Bejerano, I., Kotler, M., 2003. Epidemiological Description of a New Viral Disease Afflicting Cultured *Cyprinus carpio* in Israel. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgah* 55: 5–12.

- Pokorný, J., Flajšhans, M., Hartvich, P., Kvasnička, P., Pružina, I., 1995. Atlas kaprů chovaných v České republice. Victoria Publishing, Praha, 69 s.
- Pokorová, D., Piačková, V., Čížek, A., Reschová, S., Hůlová, J., Vícenová, M., Veselý, T., 2007. Tests for the presence of koi herpesvirus (KHV) in common carp (*Cyprinus carpio carpio*) and koi carp (*Cyprinus carpio koi*) in the Czech Republic. Veterinarni Medicina 52 (12): 562–568.
- Pokorová, D., Veselý, T., Piačková, V., Reschová, S., Hůlová, J., 2005. Current knowledge on koi herpesvirus (KHV): a review. Vet Med – Czech 50: 139 – 147.
- Shapira, Y., Magen, Y., Zak, T., Kotler, M., Hulata, G., Levavi – Sivan, B., 2005. Differential resistance to koi herpes virus (KHV)/carp innterstitial nephritis and gill necrosis virus (CNGV) among common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains and crossbreeds. Aquaculture 245: 1–11.
- Siwicki, A.K., Terech-Majewska, E., Daczka, A., Trapkowska, S., Kazun, B., 2004. Herpeswirusy a szczególnie koi herpes wirus (KHV) – nowe zagrożenie w hodowli karpia. In: Sborník konference „Ochrana zdrowia ryb – aktualne problemy“, Olsztyn, Poland, 31–38.
- Walster, C. I., 1999. Clinical observations of severe mortalities in koi carp, *Cyprinus carpio*, with gill disease. Fish Veterinary Journal 3: 54–58.
- Waltzek, T.B., Kelley, G.O., Stone, D.M., Way, K., Hanson, L., Fukuda, H., Hirono, I., Aoki, T., Davison, A. J., Hedrick, R. P., 2005. Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family Herpesviridae. Journal of General Virology 86: 1659–1667.

Poděkování

Příspěvek vzniknul za podpory projektu NAZV QJ1210237 a projektů MŠMT CENAKVA I (CZ.1.05/2.1.00/01.0024) a CENAKVA II (LO1205 v rámci programu NPU I).jcu.cz

NOVÉ VIROVÉ ONEMOCNĚNÍ KAPRŮ KSD/CEV

Tomáš Veselý¹, Veronika Piačková², Dagmar Pokorová¹, Stanislava Reschová¹

¹Výzkumný ústav veterinárního lékařství Brno, ²Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, e-mail: vesely@vri.cz

²Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Fakulta rybářství a ochrany vod, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Vodňany, e-mail: piackova@frov.jcu.cz

Souhrn

První zmínky o spavé nemoci koi kaprů (*koi sleepy disease* – KSD) se objevily v Japonsku v druhé polovině sedmdesátých let. Postižené ryby před hynutím ležely na dně, v dalším průběhu docházelo k poškození žaber a zduření těla. Elektronovou mikroskopií ultratenkých řezů byly zjištěny obalené virové částice odpovídající morfologicky poxvirům. Původce onemocnění začal být uváděn pod názvem „*carp edema virus*“ (CEV). Spoluprací s CEFAS ve Velké Británii jsme vyšetřili pomocí PCR vzorky kaprů vykazujících nekrózu žaber, kožní léze, či příznaky spavé nemoci. Prokázali jsme přítomnost CEV u kapra v lokalitě postižené hynutím a také v okrasném rybníčku u koi kapra. Oba nálezy jsme sekvenovali a zjistili, že sekvence viru z koi kapra je úplně shodná s údaji z Japonska, zatímco sekvence nálezu z kapra obecného je shodná v 95,8%. Jedná se o první záchyt uvedeného viru v České republice.

Úvod

První zmínky o spavé nemoci koi kaprů (*koi sleepy disease* – KSD) se objevily v Japonsku v druhé polovině sedmdesátých let, kde byly popsány hromadné úhyny mladých koi kaprů (až 80% obsádek) doprovázené poškozením žaber s hyperplazií žaberního epitelu a edematózním zduřením celého těla ryb. K problémům docházelo v rozmezí teplot vody 15–25 °C. Ryby ležely před hynutím několik dní na dně (proto název „spavá nemoc“) a masivní hynutí nastalo do dvou týdnů. Nebyl diagnostikován žádný bakteriální, mykotický ani parazitární původce (Murakami a kol., 1976 a 1977, Hosoya a Suzuki, 1976).

Začalo se uvažovat o virovém původu onemocnění, ale snahy o izolaci viru na buněčných liniích RTG-2, FHM a EPC byly neúspěšné (ročenka Hiroshima prefectural freshwater fish experimental station, 176, 1977, 1978)

Jelikož k úhynům doprovázeným zduřením těla docházelo i v dalších letech, byla provedena podrobná histopatologická studie postižených mladých koi kaprů, zahrnující kromě světelné mikroskopie hlavně transmisní elektronovou mikroskopii. Světelnou mikroskopií byly pozorovány kyjovité změny žaberních lamel. V blízkosti sekundárních lamel bylo pozorováno množství granulocytů a buněk neznámého původu. Elektronová mikroskopie ultratenkých řezů postižených sekundárních lamel odhalila obalené virové částice „morušovitě“ morfologie o velikosti 250–280 nm. Tyto morfologické rysy naznačily, že by uvedený virus mohl patřit do skupiny poxvirů (Ono a kol., 1986).

Oyamatsu a kol. (1997a) prokázal v etiologické studii možnost přenosu onemocnění filtrovaným homogenátem z nemocných ryb na zdravé. V experimentálně infikovaných rybách byly nalezeny změny na žábrech, pankreatu, ledvinách, slezině a střevech, avšak samotné virové částice byly pozorovány pouze v epiteliálních buňkách žaberních lamel. Ačkoliv se virus opět nepodařilo izolovat, uvedená fakta naznačovala, že „pox-like“ virus pozorovaný v žaberním epitelu je patogenním původcem tohoto onemocnění a byl navržen název onemocnění „virový edém kaprů“ (Oyamatsu a kol., 1997a).

Původce onemocnění začal být uváděn pod názvem „*carp edema virus*“ (CEV), a z naklonovaného fragmentu DNA CEV o délce 1272 bp byly navrženy dva páry primerů pro

nested PCR. Amplifikací DNA z žaber nemocných i experimentálně infikovaných ryb byly získány PCR produkty očekávaných velikostí, zatímco u zdravých ryb byl výsledek negativní. Uvedené výsledky ukázaly, že vyvinutá PCR může být použita pro detekci CEV a tedy i konfirmaci onemocnění (Oyamatsu a kol., 1997b).

Pozdější histopatologickou a elektron mikroskopickou studií spavé nemoci koi kaprů bylo prokázáno, že původce KSD a CEV je identický (Miyazaki a kol., 2005).

První prezentovaný záchyt CEV mimo Japonsko byl ve Velké Británii v letech 2009 a 2011 u importovaných koi kaprů a po sestavení alternativní nested PCR metody byl „CEV – like“ virus také zjištěn v jihovýchodní a střední Anglii u kaprů obecných vykazujících znaky spavé nemoci. Nukleová kyselina byla v 93–95% shodná s japonským CEV. Další případy onemocnění nastaly v Anglii i v roce 2013 a uvedením onemocnění na EAAP konferenci v Tampere vešla nákaza do širšího povědomí (Way a kol., 2013).

Jelikož příznaky onemocnění jsou velmi podobné koi herpesviróze (KHVD), pro kterou je také charakteristický enoftalmus, nekróza žaber a léze na pokožce, navázali jsme kontakty s pracovištěm CEFAS a pokusili se vyšetřit podobné případy v České Republice, kdy příznaky ukazovaly na KHVD, ale koi herpesvirus prokázán nebyl.

Materiál a metody

Virologické vyšetření

Byly použity buněčné linie EPC (*Epithelioma papulosum cyprini*) a RTG-2 (Rainbow trout gonads). Buňky byly kultivovány v minimálním esenciálním médiu s Earlovými solemi a doplněny 10% fetálním bovinním sérem, 2 nM glutaminem, penicilinem (100 IU/ml), streptomycinem (100 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-1}$), a gentamycinem 100 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-1}$; pH media bylo upraveno na hodnotu 7,6. Na takto připravené 24 hodinové buněčné kultury byly inokulovány vyšetřované vzorky a kultivovány 7 dní při teplotě 15 °C a denně sledována tvorba cytopatického efektu (CPE). Pokud nedošlo k jeho tvorbě, byly buňky zamrazeny a jejich alikvoty po rozmrazení inokulovány na nově připravené buněčné kultury. Subkultivace probíhala dalších sedm dní za stejných podmínek.

PCR metody

Extrakce DNA z orgánových homogenátů byla prováděna pomocí soupravy QIAamp DNA Mini kit (Qiagen) dle pokynů výrobce.

Vyšetřování na přítomnost CyHV 3, původce KHVD bylo prováděno pomocí dvoukolové (nested) PCR, za použití vnějších primerů, dávajících produkt 409 bp, a vnitřních primerů dávajících produkt o velikosti 348 bp (Pokorová a kol., 2010).

K vyšetřování přítomnosti CEV bylo použito dvoukolové PCR metody vyvinuté na pracovišti CEFAS za použití vnějších primerů, dávajících produkt 528 bp, a vnitřních primerů dávajících produkt o velikosti 478 bp (Way a kol., 2014).

Sekvenování

Produkt PCR (templát) byl přečištěn pomocí soupravy High Pure Product Purification kit (Roche), změřena koncentrace, upravena na 20 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-1}$, a k 5 μl templátu přidáno 5 μl roztoku primeru (5 μM). Takto připravené vzorky byly komerčně sekvenovány (SEQme.eu) po použití kitu BigDye Terminator (Applied Biosystems). Výsledky sekvenace byly analyzovány pomocí softwaru BioEdit version 7.2.0 a pro srovnání sekvencí byl použit program Clustal X.

Výsledky

První případ

Kapr obecný (*Cyprinus carpio*) kategorie K1 (množství 2t) byl zimován v rybníku o rozloze 2 ha. Na jaře (duben 2013) bylo přidáno přibližně 0,5t mladých ryb. V polovině května se

objevily první příznaky atypického chování. Ryby se shromažďovaly u přítoku do rybníka a byly pozorovány příznaky dušnosti. Teplota vody v uvedenou dobu byla v rozmezí 13–14 °C. Po několika dnech počalo hynutí. Většina postižených ryb byla kategorie K2. Klinické příznaky odpovídaly koi herpesviróze. Uhybnulé ryby měly zapadlé oči (enoftalmus), byla pozorována zvýšená tvorba kožního hleu a jeho částečné odlučování a na žábrech byly silné nekrotické změny. Z toho důvodu byli 4 kapři (2 lysi a 2 šupináci) zasláni do Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně, kde je zároveň NRL pro virové nemoci ryb. Ryby měly uvedené klinické příznaky a u jednoho z lisců byly přítomny i kožní léze.

Z každé ryby byl odebrán vzorek žaber, jater, ledvin a sleziny a zpracovány jako samostatný orgánový homogenát pro virologické vyšetření.

Kultivace vzorků orgánových homogenátů na buněčných liniích RTG a EPC byla po 7 dnech negativní. Proto byla po zamražení a rozmražení provedena subkultivace všech vzorků na nových 24 hodinových liniích RTG a EPC, avšak nebyl pozorován žádný cytopatický efekt. Výsledkem bylo, že není přítomen virus replikovatelný v uvedených buněčných liniích, jako je např. virus jarní virémie kaprů.

Vyšetření na přítomnost kapřího herpesviru 3, který je původcem KHVD, bylo prováděno dvoukolovou PCR, protože uvedený virus je známý tím, že v buněčných liniích je pomnožován pouze výjimečně. Extrahovaná DNA z všech čtyř ryb byla vyšetřena PCR v oblasti genu thimidinkinázy a ani v prvním kole, ani v nested PCR nebyla zjištěna přítomnost ampliconů specifických pro KHV, přičemž pozitivní i negativní kontroly potvrdily validitu použité metody. Případ byl uzavřen (červen 2013) s tím, že šlo o hynutí nejasné etiologie, s vyloučením průkazu SVCV a KHV.

Jelikož již v období podzim 2013 až jaro 2014 probíhala intenzivní komunikace s pracovištěm CEFAS, vzorky byly znovu vyšetřovány jako podezřelé na přítomnost CEV. K PCR vyšetření na přítomnost CEV byla použita dvoukolová metoda za použití primerů navržených na pracovišti CEFAS. Již v prvním kole PCR byl získán PCR produkt o očekávané velikosti 528 bp ve dvou ze čtyř ze vzorků kapra. Amplifikační produktů v druhém kole (nested PCR) byly získány produkty silné intenzity a očekávané velikosti 478 bp u všech čtyř vzorků.

Druhý případ

V okrasném rybníčku byli chováni společně koi kapři, zlatí jeseni a jeseteři. V dubnu 2014 byly pozorovány změny v chování koi kaprů a jelců. Ryby plavaly nekoordinovaně a posléze i ležely na dně, po vyrušení začaly plavat, ale posléze opět padly na dno. Jeden koi kapr uhybnul, u jeseterů však nebyly pozorovány žádné změny chování ani žádné další klinické příznaky. Naměřená teplota vody byla 15 °C. Dva koi kapři a jeden jelec byli opět zasláni na vyšetření do Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně.

Doručené vyšetřované ryby neměly výraznější kliniku, na žábrech nebyly viditelné změny, pouze u koi kaprů byl pozorován mírnější enoftalmus. Jelec byl bez viditelných příznaků. Z ryb byly odebrány výše uvedené orgány, které byly dále vyšetřovány jako dva samostatné vzorky: směsný vzorek orgánů z dvou koi kaprů a směsný vzorek orgánů z jelce jesena (zlatá forma). PCR vyšetření na přítomnost CyHV-3 (KHV) bylo u vzorku z koi kaprů i jesena v obou kolech negativní.

Vzorky byly dále vyšetřovány pomocí PCR na přítomnost CEV. Ze vzorku koi kapra byl již v prvním kole PCR získán produkt o očekávané velikosti 528 bp. Produkt stejné velikosti, ale slabší intenzity byl získán i z buněčné linie infikované uvedeným vzorkem. Amplifikační produktů v druhém kole (nested PCR) byly získány produkty silné intenzity a očekávané velikosti 478 bp u vzorku extrahované NK z orgánových homogenátů koi kaprů i z buněčné linie EPC tímto vzorkem inokulovaným. Vzorek z jesena byl v obou kolech negativní.

Produkty CEV PCR byly sekvenovány za použití vnějších primerů z obou stran. Byly získány čitelné sekvence o délce 505 nt, které byly srovnány v programu Clustal X s původní japonskou

sekvencí M141 poskytnutou pracovištěm CEFAS. Bylo zjištěno, že sekvence viru z koi kapra je plně shodná s údaji z Japonska, zatímco sekvence nálezu z kapra obecného je shodná v 95,8%.

Závěr

Vyšetřili jsme kultivací na buněčných liniích a pomocí PCR vzorky kaprů vykazujících nekrózu žaber, kožní léze, či příznaky spavé nemoci. Prokázali jsme přítomnost CEV u kapra v lokalitě postižené hynutím a také v okrasném rybníčku u koi kapra. Oba PCR produkty jsme sekvenovali a zjistili, že sekvence viru z koi kapra je plně shodná s údaji z Japonska, zatímco sekvence nálezu z kapra obecného je shodná v 95,8%. Jedná se o první záchyt uvedeného viru v České republice.

Literatura

- Hosoya, H., Suzuki, M., 1976. Effect of NaCl solution bath to a disease of juvenile colorcarp accompanied by mass mortality, arising at rainy season. Report of Niigata Prefectural Inland Fisheries Experimental Station 4:69 – 71
- Murakami, Y., Shitanaka, M., Toshida, S., Matsuzato, T., 1976. Studies on mass mortality of juvenile carp. – about mass mortality showing edema-. Bulletin Hiroshima Fresh Water Fisheries Experimental Station: 19-33
- Murakami, Y., Shitanaka, M., Toshida, S., Matsuzato, T., 1977. Studies on mass mortality of juvenile carp - II. – about mass mortality showing edema-. Bulletin Hiroshima Fresh Water Fisheries Experimental Station: 19-36
- Miyazaki, T., Isshiki, T., Katsuiuki, H., 2005: Histopathological and electron microscopy studies on sleepy disease of koi *Cyprinus carpio* koi in Japan. Dis Aquat Org, 65: 197–207.
- Ono, S., Nagai, A., Sugai, N., 1986. A Histopathological Study on Juvenile Colorcarp, *Cyprinus carpio*, Showing Edema. Fish Pathology 21 (3): 167–175
- Oyamatsu, T., Hata, N., Yamada, K., Sano, T., Fukuda, H., 1997a. An Ethiological Study on Mass Mortality of Cultured Colorcarp Juveniles Showing Edema. Fish Pathology 32 (2): 81–88.
- Oyamatsu, T., Matoyama, H., Yamamoto, K., Fukuda, H., 1997b. A Trial for the Detection of Carp Edema Virus by Using Polymerase Chain Reaction. Aquaculture Science 45 (2): 247–251.
- Pokorova, D., Reschova, S., Hulova, J., Vicenova, M., Vesely, T., 2010. Detection of cyprinid herpesvirus-3 in field samples of common and koi carp by various single-round and nested PCR methods. Journal of theWorld Aquaculture Society 41 (5): 773–779.
- Way, K., Stone, D., Stinton, N., Gardiner, R., Wood, G., Feist, S., 2013. Detection of Carp Edema-like Virus during Disease Outbreaks in Koi and Common Carp (*Cyprinus carpio*) in the UK. In: Abstract Book of 16th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Tampere, September 2–6, 2013.
- Way, K., Martin, P., Mølkänen, S., Wood, G., Reading, A., Williams, C., Stone, D., 2014. Detection of Carp Edema-like Virus during Disease Outbreaks in Koi and Common Carp (*Cyprinus carpio*) in the UK and examination of archive samples. In: Abstarct book of 9th. International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates, Malaga, October 1–4, 2014.

Poděkování

Práce byla provedena s podporou činnosti NRL pro virové choroby ryb, projektu Ministerstva zemědělství ČR (0002716202), projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum (QJ1210237) a projektů MŠMT CENAKVA I (CZ.1.05/2.1.00/01.0024) a CENAKVA II (LO1205 v rámci programu NPU I).

MOŽNOSTI VAKCINACE RYB V ČR

Leona Nepejchalová¹, Jitka Kolářová²

¹Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Brno, email: nepejchalova@uskvbl.cz

²Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Fakulta rybářství a ochrany vod, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Vodňany, e-mail: kolarova@frov.jcu.cz

Souhrn

V současné době jsou v ČR registrovány pouze 4 vakcíny, tyto vakcíny jsou určeny pro lososovité druhy ryb. Škála je velmi omezená a veterinární lékař v terénu musí často hledat alternativní řešení při využití kaskády, která umožňuje předepsat vakcíny registrované v jiných členských státech, nebo využít vyrobené autogenní vakcíny. Také může v některých případech žádat o použití neregistrované vakcíny na výjimku udělenou Ústřední veterinární správou SVS.

V České republice jsou registrovány vakcíny, které se používají k vakcinaci lososovitých ryb. Jsou podávány buď perorálně, ve formě koupelí (ponoření do suspenze) nebo injekčně (intraperitoneálně).

U pstruha duhového se používají k vakcinaci proti **ERM (Enteric Redmouth Disease)**, kdy dochází ke snížení mortality způsobené *Yersinia ruckeri*, kmenem Hagerman typ 1 (serotyp 01) samostatně nebo v kombinaci s kmenem biotypu EX5.

U lososa atlantského se registrovaná vakcína používá ke snížení mortality při onemocnění furunkulózou způsobenou *Aeromonas salmonicida*. Doba potřebná k nastolení imunity závisí na teplotě vody, proto je důležité dodržovat teplotní podmínky doporučené v SPC. U některých z nich se doporučuje nevakcinovat pstruhy při teplotě vody pod 5 °C a lososy pod 1 °C.

Tab. 1. Vakcíny registrované v ČR.

Název vakcíny	Léková forma	Cílový druh	Léčivá látka	Ochranná lhůta	Držitel registračního rozhodnutí
AquaVac ERM oral	Perorální emulze	pstruh duhový (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>Yersinia ruckeri</i> (kmen Hagerman typ 1), inaktivované buňky RPS* >60% po vakcinaci	Bez ochranných lhůt.	Intervet International, B.V.
Aquavac ERM	Koncentrát k smáčecí suspenzi	pstruh duhový (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Inaktivované buňky <i>Yersinia ruckeri</i> (kmen Hagerman typ 1) RPS* ≥ 75% po vakcinaci	Bez ochranných lhůt.	Intervet International, B.V.
Aquavac relera	Koncentrát suspenze pro koupel nebo suspenze pro injekci	pstruh duhový (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Inaktivované buňky <i>Yersinia ruckeri</i> (kmen Hagerman typ 1) ≥ 75% RPS* Inaktivované buňky <i>Yersinia ruckeri</i> (kmen biotypu EX5) ≥ 75% RPS*	Bez ochranných lhůt.	Intervet International, B.V.
AquaVac FNM PLUS	Injekční emulze	losos atlantský (<i>Salmo salar</i>)	Inaktivované buňky <i>Aeromonas salmonicida</i> (kmen MT004 a kmen MT 432) RPS ₆₀ ≥ 80% po vakcinaci	Bez ochranných lhůt.	Intervet International, B.V.

*RPS – relativní procento přežití vakcinovaných ryb.

Řešení situace v rámci kaskády pro potravinové druhy zvířat (§ 3 vyhlášky č. 344/2008)

Pokud nejsou dostupné vhodné vakcíny registrované na území našeho státu, lze využít ty, které jsou registrovány v jiném členském státě EU. V jiných státech EU jsou registrovány pro lososovité další vakcíny proti nejčastějším bakteriálním infekcím: **furunkulóze** (*Aeromonas salmonicida*); **vibrióze** (*Vibrio anguillarum*); hemoragicko-septikemickému onemocnění označovanému jako „**Hitra disease**“ nebo „**Cold water vibriosis**“ (*Vibrio salmonicida*), či virovým onemocněním jako je infekční nekróza pankreatu lososovitých ryb.

Tab. 2. Další vakcíny registrované v EU.

Název vakcíny	Léková forma	Cílový druh	Léčivá látka	Ochranná lhůta	Držitel registračního rozhodnutí
AquaVac Vibrio	Koncentrát suspenze pro koupel nebo suspenze pro injekci	pstruh duhový (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Inaktivované buňky <i>Listonella (Vibrio) anguillarum</i> kmen 78-SKID: RPS ₆₀ * > 75% Inaktivované buňky <i>Vibrio ordalii</i> kmen MSC 275: RPS ₆₀ * > 75%	Bez ochranných lhůt.	Intervet UK Ltd
AquaVac Vibrio Oral	Perorální emulze	pstruh duhový (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Inaktivované buňky <i>Listonella (Vibrio) anguillarum</i> kmen 78-SKID: RPS ₆₀ * > 60% Inaktivované buňky <i>Vibrio ordalii</i> kmen MSC 275: RPS ₆₀ * > 60%	Bez ochranných lhůt.	Intervet UK Ltd
Birnagen Forte As	Injekční emulze	losos atlantský (<i>Salmo salar</i>)	Inaktivované buňky <i>Aeromonas salmonicida</i> (As27) RPS ₆₀ * ≥ 80% Inaktivovaný virus infekční nekrózy pankreatu (IPNV) RP** ≥ 1.22	Bez ochranných lhůt.	Novartis Animal Vaccines Ltd
Norvax Compact PD	Injekční emulze	losos atlantský (<i>Salmo salar</i>)	Salmon pancreas disease virus (SPDV) kmen F93-125, ≥ 70% RPP***	Bez ochranných lhůt.	Intervet UK Ltd
Winvil 3 Micro	Injekční emulze	losos atlantský (<i>Salmo salar</i>)	Inaktivovaná <i>Aeromonas salmonicida</i> subspecies <i>salmonicida</i> *RPS ₆₀ ≥ 80% Inaktivovaná <i>Moritella viscosa</i> *RPS _{end} ≥ 83% Virus infekční nekrózy pankreatu (IPNV) serotyp A2 RP ≥ 2,0	Bez ochranných lhůt.	Novartis Animal Health UK. Ltd.

*RPS – relativní procento přežití vakcinovaných ryb, **RP: relativní účinnost porovnávaná s referenční vakcínou, ***RPP – relativní procento ochrany v testu.

V případě řešení mimořádné nakažové situace, kde není k dispozici žádný registrovaný imunologický veterinární léčivý přípravek, lze k vakcinaci použít i **veterinární autogenní vakcíny**, které jsou vyráběny pouze a výhradně z patogenů či antigenů, které byly získány v konkrétním hejnu v dané lokalitě a pouze v tomto chovu a v této lokalitě může být veterinární autogenní vakcína použita. Je nepřípustné do veterinární autogenní vakcíny přidávat jakékoli další patogeny či antigeny (zákon č. 378/2007 Sb., ve znění pozdějších předpisů, § 71 odst. 4). Veterinární autogenní vakcíny musí být vždy inaktivovány a jejich výroba může být zahájena jen na základě „**Předpisu pro výrobu veterinární autogenní vakcíny**“ (Obr. 2) vystaveného ošetřujícím veterinárním lékařem (zákon č. 378/2007 Sb., ve znění pozdějších předpisů, § 71 odst. 2). Vždy před zahájením výroby každé šarže veterinární autogenní vakcíny podává výrobce

„Oznámení o zahájení výroby veterinární autogenní vakcíny“ (Obr. 1), oznámení se podává ÚSKVBL a Krajské veterinární správě místně příslušné dle lokality, kde má být veterinární autogenní vakcína použita. Šarží veterinární autogenní vakcíny se rozumí množství vakcíny vyrobené v souladu s předpisem pro veterinární autogenní vakcíny.

Výrobce veterinárních autogenních vakcín je povinen zajistit, aby veterinární autogenní vakcíny byly označeny na vnitřním a, je-li přítomen, i na vnějším obalu údaji, které zajistí bezpečné použití veterinární autogenní vakcíny v příslušném chovu. Ke každému balení veterinární autogenní vakcíny musí být připojena příbalová informace; to neplatí, pokud jsou veškeré údaje, které musí být uvedeny v příbalové informaci, uvedeny na vnitřním obalu veterinární autogenní vakcíny. Veterinární autogenní vakcíny smí být používány pouze v souladu s údaji uvedenými na obalu nebo v příbalové informaci autogenní vakcíny. Před použitím veterinární autogenní vakcíny musí příslušný veterinární lékař provést zkoušku snášenlivosti na cílových zvířatech v souladu s pokyny uvedenými na obalu nebo v příbalové informaci veterinární autogenní vakcíny.

Nesmí být používány veterinární autogenní vakcíny:

- a) o kterých tak rozhodl ÚSKVBL nebo s ohledem na veterinární opatření přijímaná podle zákona o veterinární péči (166/1999 Sb.) příslušný orgán veterinárního dozoru,
- b) se závadou v jakosti,
- c) s prošlou dobou použitelnosti nebo
- d) pokud byly uchovávány za jiných podmínek, než které stanovil jejich výrobce.

Výrobce autogenních vakcín musí hlásit nejpozději do 30 dnů od obdržení informace podezření na závadu jakosti. Výrobce má také další farmakovigilanční povinnosti (stejně jako veterinární lékař) a je povinen dle odst. 4 § 72 zákona o léčivech hlásit ÚSKVBL nejpozději do 30 dnů od obdržení informace podezření z výskytu nežádoucích účinků spojených s použitím jím vyrobené veterinární vakcíny; to neplatí, pokud již o podezření z výskytu nežádoucího účinku informoval prokazatelně ošetřující veterinární lékař ÚSKVBL.

Dle písm. b) odst. 5 § 72 zákona o léčivech je také ošetřující veterinární lékař povinen nejpozději do 15 dnů hlásit výrobci, který veterinární autogenní vakcínu vyrobil, podezření z výskytu nežádoucích účinků spojených s použitím veterinární autogenní vakcíny.

[Výrobce doplní svou identifikaci a doplní adresáta (ÚSKVBL a příslušná KVS) dle svých zvyklostí, případně k Oznámení připojí průvodní dopis]

Oznámení o zahájení výroby šarže veterinární autogenní vakcíny

Dle zákona č. 378/2007 Sb., o léčivech, ve znění pozdějších předpisů a v souladu s Vyhláškou č. 229/2008 Sb. – část šestá

A. <u>Výrobce</u> veterinární autogenní vakcíny (VAV) (včetně případného akreditovaného pracoviště, které připravilo antigen)	
B. <u>Složení</u> veterinární autogenní vakcíny (identifikace patogenů a antigenů)	
C. <u>Označení stáje a lokality</u> , kde byly získány antigeny či patogeny	
D. <u>Druh a kategorie zvířat</u> , u nichž bude VAV použita	
E. <u>Jméno a adresa pracoviště (ordinace) veterinárního lékaře</u> , který VAV předepsal	
F. <u>Celkové předepsané množství VAV</u> , včetně počtu dávek	
G. <u>Datum použitelnosti</u> veterinární autogenní vakcíny	
H. <u>Zvláštní upozornění</u> , jsou-li uvedena v předpisu ošetřujícího veterinárního lékaře	

V:
Dne:

Podpis:
Razítko:|

Obr. 1. Oznámení o zahájení výroby veterinární autogenní vakcíny.

Kopie předpisu musí být uchována po dobu 5 let

Veterinární předpis pro výrobu veterinární autogenní vakcíny

Vyplňte hůlkovým písmem!

Ošetřující veterinární lékař, který předpis vystavil (jméno, příjmení, adresa pracoviště/ordinace)	○ ○ ○ ○ ○
Chovatel Jméno, příjmení, adresa (fyz. osoba) Obchodní jméno, sídlo (práv. osoba)	○ ○ ○ ○ ○
Číslo katastrálního území, kam spadá chov, kde mají být odebrány antigeny či patogeny pro výrobu veterinární autogenní vakcíny	○ ○ ○ ○ ○
Identifikační číslo stáje, z níž mají být odebrány antigeny či patogeny pro výrobu veterinární autogenní vakcíny	○ ○ ○ ○ ○
Indikace (označení onemocnění)	○ ○ ○ ○ ○
Označení antigenů či patogenů, ze kterých má být autogenní vakcína vyrobena	○ ○ ○ ○ ○
Druh a kategorie zvířat, u nichž bude VAV použita	○ ○ ○ ○ ○
Celkové předepsané množství VAV (počet dávek)	○ ○ ○ ○ ○
Zvláštní upozornění, která mají být uvedena na obalu či PI	○ ○ ○ ○ ○
Podmínky dodání (termín, místo apod.)	○ ○ ○ ○ ○
Odborné odůvodnění nezbytnosti použití VAV (odborné odůvodnění je možné doložit ve formě přílohy na samostatném listu)	○ ○ ○ ○ ○
<input type="checkbox"/> JE <input type="checkbox"/> NENÍ k dispozici registrovaný veterinární léčivý přípravek pro danou indikaci, který obsahuje jakýkoliv patogen nebo antigen obsažený ve veterinární autogenní vakcíně	
V případě, že je k dispozici: <input type="checkbox"/> Ošetřující veterinární lékař potvrzuje, že informoval ÚSKVBL o podezření ze snížené účinnosti registrovaného veterinárního léčivého přípravku při řešení aktuální nakažové situace ve výše uvedeném chovu	

○ ○ ○ ○ ○

→

Datum, razítko a podpis veterinárního lékaře

Poznámka:

Předpis pro výrobu veterinární autogenní vakcíny vystavuje příslušný ošetřující veterinární lékař ve třech vyhotoveních. Jedno vyhotovení uchovává veterinární lékař, který předpis pro výrobu veterinární autogenní vakcíny předepsal, ostatní dvě vyhotovení předává výrobci veterinární autogenní vakcíny.
Výrobce jedno vyhotovení předpisu pro výrobu veterinární autogenní vakcíny uchovává a jedno vyhotovení předává krajské veterinární správě (spolu s Oznamení o zahájení výroby), v jejímž obvodu působnosti bude veterinární autogenní vakcína použita.

Obř. 2. Předpis pro výrobu veterinární autogenní vakcíny.

Řešení situace podle podmínek výjimek z registrace povoloovaných Ústřední veterinární správou (§ 46 zákona 378/2009)

Ústřední veterinární správa může na základě obdržení žádosti ošetřujícího veterinárního lékaře výjimečně rozhodnout o povolení použití neregistrovaného léčivého přípravku, jde-li o **imunologický veterinární léčivý přípravek** v případě výskytu závažné nákazy zvířat nebo nákazy přenosné ze zvířat na člověka. V případě realizace ochranných či zdolávacích opatření v případě výskytu nálezů zvířat či nálezů přenosných ze zvířat na člověka může Ústřední veterinární správa rozhodnout o povolení použití tohoto VLP ze svého podnětu.

Ústřední veterinární správa si může vyžádat stanovisko ÚSKVBL.

Po povolení výjimky odpovídá za škody osoba, na jejíž žádost byla výjimka povolena (má přesně vymezeno, v jakém množství jaký přípravek doveze (název, léčivá látka), dovozce, způsob uvedení do oběhu (jsou možná omezení) a časový rozvrh dovozu a použití, u jakého druhu zvířete, v jaké indikaci). Odpovědnost výrobce či dovozce za škodu způsobenou vadou výrobku zůstává zachována.

Poděkování

Tato práce byla provedena za finanční podpory MŠMT projektu CENAKVA (CZ.1.05/2.1.00/01.0024), projektu CENAKVA II (LO1205 v rámci programu NPU I).

BAKTERIOLOGICKÁ DIAGNOSTIKA INFEKČÍ RYB V NAŠICH CHOVECH

Alois Čížek

Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno, e-mail: cizeka@vfu.cz

Souhrn

*Se zvyšující se mírou intenzifikace chovu ryb nabývají na významu zejména oportunní bakteriální infekce, mezi kterými v našich chovech převažují hemoragické septikémie a ulcerativní choroby vyvolávané různými druhy aeromonád. Úspěšnost tlumení těchto infekcí je závislá na míře spolupráce mezi chovateli, veterináři specialisty na choroby ryb a laboratorními diagnostickými pracovišti. Potvrzené akutní bakteriózy se řeší antibiotickou terapií, nicméně nastávají situace, kdy je preventivní užití antimikrobiálních látek u ohrožené obsádky rovněž nezbytné. Bez znalosti stavu citlivosti potenciálních původců infekcí se však stává empirická volba antimikrobiálního léčiva značným rizikem. Užití antimikrobiálních látek v akvakulturách sebou přináší vedle efektu snížení možné ekonomické ztráty způsobené bakteriální infekcí, také negativní dopad v podobě selekce rezistentních klonů bakterií. Tento příspěvek shrnuje výsledky dosažené v oblasti sledování výskytu získané rezistence vůči registrovaným antimikrobiálním látkám u vybraných souborů izolátů mezofilních aeromonád, *Aeromonas salmonicida* a *Flavobacterium psychrophilum*.*

Intenzifikace chovu ryb je celosvětově na vzestupu a snaha o vyšší efektivitu produkce nutně zvyšuje míru stresové zátěže chovaných ryb, což se ve svém důsledku může projevit zvýšením výskytu infekčních onemocnění. Proto chovatelé ryb a veterinární lékaři musí zlepšovat profylaktické postupy, aby zamezili ekonomickým ztrátám v ohrožených akvakulturách. Komplex profylaktických opatření proti infekcím bakteriálního původu vychází mimo jiné také z výsledků laboratorních vyšetření. Během posledních několika desetiletí byl dosažen v oblasti diagnostiky bakteriálních původců onemocnění ryb značný pokrok. Jen z pohledu možných původců bylo popsáno více než 70 druhů bakterií schopných vyvolat u živočichů chovaných v akvakulturách infekční onemocnění (Austin a Austin, 2007). V našich chovech se jedná hlavně o zástupce rodu *Aeromonas*, kteří mohou vyvolávat septikémie, ulcerativní a hemoragické choroby ryb, včetně furunkulózy lososovitých ryb. Dále pak to mohou být epidemická vzplanutí infekcí ryb způsobených *Yersinia ruckeri* (původce Enteric Redmouth Disease – ERM), *Renibacterium salmoninarum* (renibakterióza lososovitých ryb); *Flavobacterium columnare* (kolumnaróza), *F. psychrophilum* (cytofagóza lososovitých ryb), *Edwardsiella ictaluri* (střevní septikémie sumců) a další. Skutečnost, že mnoho bakteriálních kultur izolovaných z nemocných ryb neodpovídá vždy popisovaným charakteristikám bakteriálního druhu, zejména pokud jsou použity pouze biochemické znaky pro jejich identifikaci, vede k chybám v udávání reálného výskytu a různorodosti druhů podílejících se na infekcích ryb. Vedle bakteriálních druhů, které byly dobře charakterizovány jako původci infekcí ryb, existuje řada případů, kdy se izolovaný mikroorganismus podaří identifikovat pouze částečně nebo zůstane neidentifikovaný.

Problematika chemoterapie bakteriálních infekcí je velmi široká. V celosvětovém měřítku je v porovnání s ostatními druhy hospodářských zvířat povolen k terapii ryb jen omezený počet antimikrobiálních substancí. V ČR jsou aktuálně registrovány pro léčbu ryb v užitkových chovech oxytetracyklin (Rupin Special), flumechin (Flumiquil 50%), florfenikol (Aquaflor 500 mg.g⁻¹ premix pro medikaci krmiva pro pstruha duhového) (Kolářová a Nepejchalová, 2014). Vedle empirické volby je ve většině případů nutné provést před zahájením vlastní chemoterapie

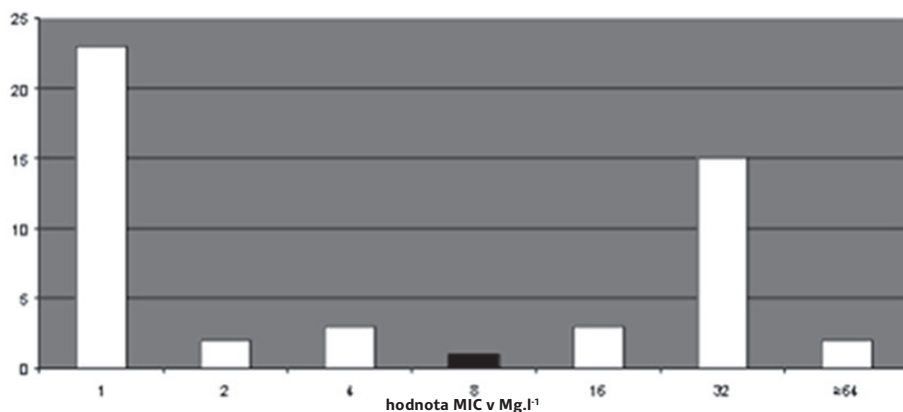
stanovení citlivosti vůči antimikrobiálním látkám. To je indikováno také tehdy, když existuje obava, že bakteriální původci onemocnění mohou být vybaveni mechanismy rezistence proti běžně užívaným antimikrobiálním látkám v daném chovu. Evropská legislativa povoluje veterinárním lékařům předepisovat pro „extra-label“ užití některých dalších účinných látek při dodržení požadavků vyhlášky č. 344/2008. Předpis pro „extra-label“ užití musí být podložen výsledky laboratorními vyšetření, tj. kulturační potvrzení bakteriální infekce a výsledky stanovení citlivosti izolátů bakterií vůči antibakteriálním látkám. Výběr nejvhodnějších antimikrobiálních látek k testování citlivosti a sdělování výsledků provádí veterinární laboratoř po konzultaci se specialisty na choroby ryb. V těchto případech je důležité poznamenat, že klient (chovatel) nebo veterinární lékař přebírá všechnu odpovědnost za bezpečnost a zamezení výskytu reziduí při použití neschválených látek. Každá laboratoř by měla do sdělení o výsledcích vyšetření zahrnout upozornění na národní předpisy, které tuto terapeutickou činnost regulují.

Neregulované použití antimikrobiálních látek usnadňuje selekci rezistentních bakterií, což bylo potvrzeno zejména u hospodářských zvířat. Užívání antimikrobiálních látek v akvakulturách vzbuzuje rovněž vzrůstající zájem o možné dopady na lidské zdraví. Existují například obavy z průkazu reziduí antimikrobiálních látek v sedimentech a s tím souvisejícím výskytem rezistentních bakterií, které jsou výsledkem intenzivního chovu ryb a jejich terapie antimikrobiálními látkami. Stanovování citlivosti nepatogenních bakterií pocházejících z vodního ekosystému akvakultur se pak stává také důležité, a to zejména pro poznání epidemiologických souvislostí výskytu a šíření genetických determinant antimikrobiální rezistence.

Rezistence vzniká v souvislosti s mutacemi přirozených genů na chromozómu bakteriální buňky nebo bakterie získají přenosné úseky DNA, kterými mohou být plazmidy a integrony, které nesou geny rezistence. Závažnost přítomnosti integronů spočívá v tom, že tyto genetické elementy mohou obsahovat tzv. genové kazety s různým počtem genů rezistence. Integrony jsou součástí transponozonů nebo plazmidů, které se mohou v populacích bakterií snadno šířit. Aeromonády vybavené těmito transponovatelnými elementy se stávají mimo jiné zásobárnou genů rezistence, ze které se mohou přenést na bakterie jiných druhů. V této souvislosti je často diskutováno také riziko šíření rezistence k chinolonům vázané na plazmidy.

Mezi indikátorové bakterie vhodné ke studiu výskytu a vývoje antibiotické rezistence v prostředí chovu ryb patří pohyblivé aeromonády. Tyto bakterie jsou spojeny s vodním ekosystémem, kolonizují ryby a mohou u nich vyvolat různé infekční procesy. Výsledky našich dosavadních studií ukázaly, že použití antibiotik v intenzivních chovech ryb vede ke zvýšení výskytu antibiotické rezistence v celém mikrobiálním ekosystému, a tím i rizika přenosu genetických determinant rezistence na bakterie patogenní pro ryby (Čížek a kol., 2010; Dobiášová a kol., 2014; Gerzová a kol., 2014).

Praktické důsledky antibiotické rezistence jsou dokumentovány v grafu č. 1. Ten ukazuje rozložení hodnot minimální inhibiční koncentrace (MIC) oxytetracyklinu, který je účinnou látkou v přípravku Rupin, u vyšetřených izolátů mezofilních aeromonád (*A. hydrophila*, *A. sobria*). Izoláty jsou podle zjištěných hodnot rozděleny na populaci citlivou (s hodnotami MIC > 8 mg.l⁻¹) a populaci rezistentní k oxytetracyklinu (s hodnotami MIC > 8 mg.l⁻¹). Z čehož vyplývá, že 40 % izolátů bylo k oxytetracyklinu rezistentních a terapie konaná bez výsledků laboratorního vyšetření by byla v takovém případě neúčinná.



Graf 1. Rozložení hodnot MIC oxytetracyklinu u izolátů mezofilních aeromonád izolovaných z kaprů obecných (n = 49).

Výsledky získané vyšetřením izolátů aeromonád z kaprů koi a akvarijních ryb ukázaly, že u této skupiny se běžně izolují multirezistentní kmeny, které jsou vybaveny transponovatelnými elementy, konkrétně plazmidy skupiny IncU s genovými kazetami různé velikosti, které nesou další geny, které kódují rezistenci vůči dalším skupinám chemoterapeutik. Z nich epidemiologicky závažné jsou geny *qnrA* a *aac(6)-Ib-cr*, které zprostředkovávají rezistenci vůči fluorovaným chinolonům, a mohou se horizontálně šířit mezi bakteriemi ve vodním prostředí. Z toho vyplývá potenciální riziko zavlečení bakterií s tímto typem rezistencí dovozem akvarijních a okrasných ryb, zejména tam, kde se kříží technologie chovu s konzumními druhy ryb.

Tyto výsledky a zkušenosti ze zahraničí ukazují na potřebu u rybích obsádek průběžně monitorovat výskyt bakterióz a prověřovat stav citlivosti jejich původců k registrovaným molekulám antimikrobiálních látek. Bez těchto informací není možná volba účinná terapie bakteriálních infekcí v intenzivních chovech ryb.

Literatura

- Austin, B., Austin, D., 2007. Bacterial fish pathogens. Diseases of farmed and wild fish. Fourth Edition. Springer Praxi Publishing Ltd. Chichester, UK. 552 s.
- Čížek, A., Dolejská, M., Sochorová, R., Strachotová, K., Piačková, V., Veselý, T., 2010. Antimicrobial resistance and its genetic determinants in aeromonads isolated in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinary Microbiology* 142 (3–4): 435–439.
- Dobiasova, H., Kutilova, I., Piackova, V., Vesely, T., Cizek, A., Dolejska, M., 2014. Ornamental fish as a source of plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic resistance plasmids. *Veterinary Microbiology* 171 (3–4): 413–421.
- Gerzova, L., Videnska, P., Faldynova, M., Sedlar, K., Provaznik, I., Cizek, A., Rychlik, I., 2014. Characterization of Microbiota Composition and Presence of Selected Antibiotic Resistance Genes in Carriage Water of Ornamental Fish. *Plos One* 9: e103865.
- Kolářová, J., Nepejchalová, L., 2014. Terapeutické možnosti v chovech ryb ČR -přehled. *Veterinářství* 64 (7): 533–538.

Poděkování

Prezentované výsledky byly získány za podpory projektů: NAZV QJ1210237 a NAZV QJ 1210013.

SEZÓNÍ DYNAMIKA VYBRANÝCH IMUNOLOGICKÝCH PARAMETRŮ PSTRUHA DUHOVÉHO (*ONCORRHYNCHUS MYKISS*), SIVENA AMERICKÉHO (*SALVELINUS FONTINALIS*) A KŘÍŽENCE SIVENA AMERICKÉHO A SIVENA ARKTICKÉHO (*S. FONTINALIS* X *S. ALPINUS*)

Ivana Papežíková¹, Jan Mareš², Libor Vojtek³, Pavel Hyršl³, Zdeňka Soukupová¹, Miroslava Palíková¹

¹Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav ekologie a chorob zvířet, ryb a včel, Brno, e-mail: palikovam@vfu.cz, papezikovai@email.cz, zdena.13@seznam.cz, navratils@vfu.cz

²Mendelova univerzita v Brně, Fakulta agronomická, Oddělení rybářství a hydrobiologie, Brno, e-mail: mares@mendelu.cz

³Masarykova univerzita Brno, Ústav experimentální biologie, Brno, e-mail: 150465@mail.muni.cz, hyrsl@sci.muni.cz

Souhrn

V této práci byla sledována sezónní dynamika vybraných imunologických parametrů u pstruha duhového, sivena amerického a křížence sivena amerického a sivena arktického. Byly sledovány počty leukocytů (lymfocytů, granulocytů a monocytů), dále hladiny celkových imunoglobulinů v plazmě, koncentrace lysozymu v kožním slizu a bakteriolytická aktivita komplementu v plazmě. Bylo zjištěno, že většina sledovaných parametrů podléhá výrazným sezónním změnám a mezi jednotlivými druhy ryb jsou rozdíly v sezónní dynamice i v absolutních hodnotách.

Úvod

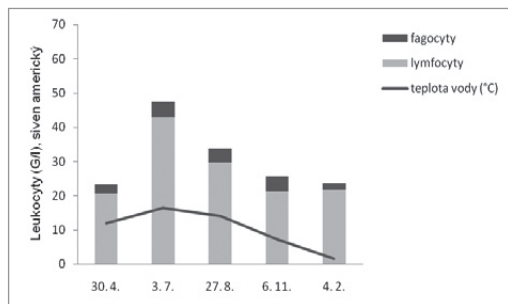
Imunitní systém ryb zahrnuje nespecifické (přirozené, vrozené) a specifické (adaptivní, získané) mechanismy, které jsou zodpovědné za schopnost organismu čelit patogenním mikroorganismům a parazitům. Mezi nespecifické mechanismy imunity patří humorální faktory (např. komplementový systém nebo lysozym) a buněčné faktory, především fagocytární aktivita. Specifické mechanismy zahrnují především aktivované lymfocyty a protilátkovou odpověď. Imunitní odpověď ryb je závislá na řadě faktorů. Jedním z nejdůležitějších faktorů je roční období a teplota vody. Mezi jednotlivými druhy ryb jsou v tomto směru značné rozdíly (Saha a kol., 2002; Buchtíková a kol., 2011; Tolarová a kol., 2014). Také různé parametry se mění v průběhu roku různě – u některých nejsou sezónní změny skoro patrné, jiné mají výraznou sezónní dynamiku. Cílem této práce bylo srovnání imunitní odpovědi pstruha duhového, sivena amerického a křížence sivena amerického a sivena arktického a posouzení sezónní dynamiky vybraných parametrů specifické a nespecifické imunity.

Materiál a metodika

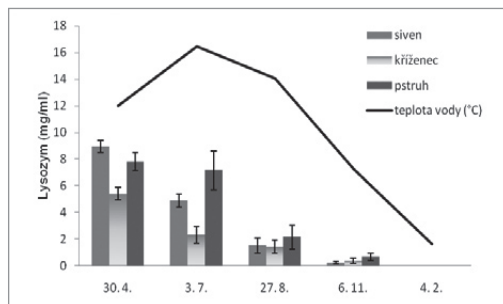
Ryby byly získány z rybářství BioFish Pravíkov. V průběhu roku bylo provedeno pět odběrů vzorků – na konci dubna, na začátku července, na konci srpna, na začátku listopadu a na začátku února následujícího roku. Při každém odběru bylo od každého druhu odloveno osm ryb. Od ryb byla punkcí ocasních cév odebrána krev do heparinizovaných stříkaček. Část plné krve byla použita ke zhotovení krevních nátěrů a ke stanovení počtů krevních elementů. Zbytek krve byl zcentrifugován a získaná plazma byla zamražena na -80 °C pro další použití. Všechny ryby byly zváženy a byla u nich stanovena celková délka těla, výška a šířka. Seškrabem tupou stranou skalpelu byly odebrány vzorky kožního slizu pro stanovení lysozymu.

Pro stanovení počtů leukocytů v Bürkerově komůrce byla plná krev byla ředěna 1 : 200 Natt-Herrickovým roztokem. Ke stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů byly použity krevní nátěry, obarvené dle Pappenheima. Bylo hodnoceno 100 buněk z každého krevního nátěru.

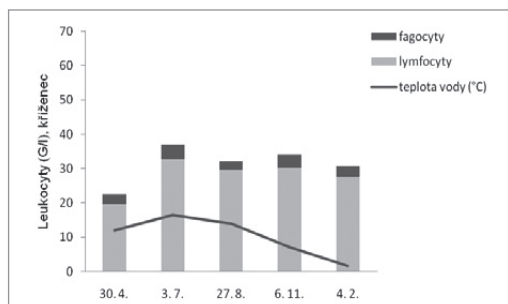
Hladina celkových imunoglobulinů v krevní plazmě byla stanovena ELISA metodou. Celková bakteriolytická aktivita komplementu v plazmě byla měřena luminometricky za použití rekombinantní bioluminiscenční bakterie *Escherichia coli*. Výsledkem měření byl čas potřebný k usmrcení (tj. ztrátě luminiscence) 50% bakterií (Buchtíková a kol., 2011). Koncentrace lysozymu v kožním slizu byla stanovena metodou radiální imunodifúze v agarózovém gelu s usmrcenou bakterií *Micrococcus lysodeicticus*. (Poisot a kol., 2009). Jako standard byl použit roztok purifikovaného lysozymu.



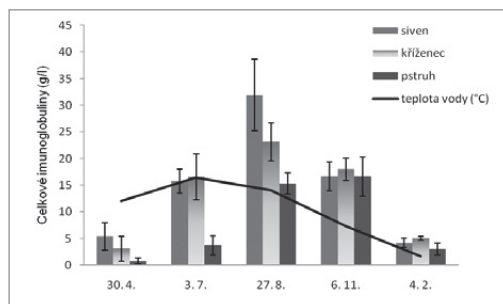
Obr. 1A. Počty leukocytů, lymfocytů a fagocytů (granulocytů + monocytů) u sivena amerického



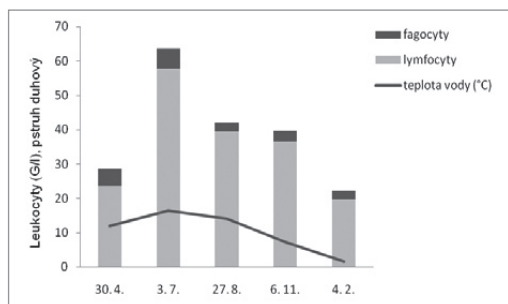
Obr. 2. Koncentrace lysozymu v kožním slizu. Data představují průměr ± střední chybu průměru



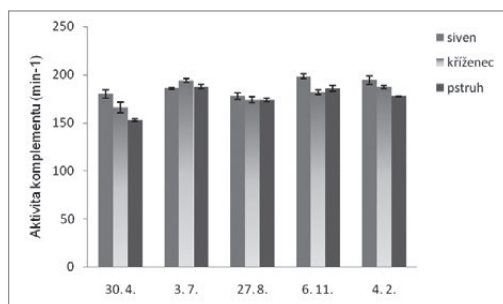
Obr. 1B. Počty leukocytů, lymfocytů a fagocytů (granulocytů + monocytů) u křížence



Obr. 3. Koncentrace celkových imunoglobulinů v plazmě. Data představují průměr ± střední chybu průměru.



Obr. 1C. Počty leukocytů, lymfocytů a fagocytů (granulocytů + monocytů) u pstruha duhového



Obr. 4. Aktivita komplementu v plazmě. Data představují průměr ± střední chybu průměru.

Výsledky a diskuse

Ryby patří mezi poikiloternní živočichy, u kterých řada životních funkcí včetně funkcí imunitního systému podléhá výrazným změnám v závislosti na ročním období. Většinou jsou tyto změny připisovány měnící se teplotě vody, ale je známo, že funkci imunitního systému ovlivňují i jiné environmentální faktory, jako například fotoperioda, nebo faktory, související s životním cyklem ryb (hormonální změny během tření). Průměrné denní teploty vody, naměřené při jednotlivých odběrech, se pohybovaly v rozmezí od 1,5 °C (únor) do 16 °C (červenec), přičemž průměrné teploty během druhého a třetího odběru (červenec – srpen) leží v rozmezí, které je považováno za teplotní optimum pro pstruha duhového, sivena amerického i sivena arktického (Larsson, 2004). Dalo by se tedy předpokládat, že za těchto teplot bude nejintenzivněji pracovat i imunitní systém ryb. Naše výsledky však ukázaly, že sezónní změny některých sledovaných parametrů nekopírují vývoj teplot. Navíc byly zjištěny značné rozdíly mezi druhy, přestože jejich nároky na podmínky prostředí jsou velmi podobné. To je velmi nápadné především u imunoglobulinů. Zatímco u sivena a křížence začaly hladiny Ig stoupat koncem dubna a dosáhly vrcholu koncem srpna, u pstruha duhového byla ještě koncem dubna hladina Ig velmi nízká a dosáhla vrcholu až začátkem listopadu (Obr. 3). Tento trend lze vysvětlit dlouhou životností protilátek v plazmě – díky tomu, že se imunoglobuliny v plazmě kumulují, mohou dosáhnout maximální koncentrace se zpožděním, až poté, co dojde k jejich maximální produkci. Tento předpoklad podporují i počty lymfocytů, které dosáhly nejvyšších hodnot už začátkem července (Obr. 1A, 1B, 1C). Velmi zajímavý trend vykazovala koncentrace lysozymu v kožním slizu, která byla nejvyšší v dubnu, poté prudce klesala až k téměř nulové hodnotě, naměřené v únoru. Přestože průměrná teplota vody se při dubnovém a srpnovém odběru lišila jen o dva stupně (a při srpnovém odběru ležela v udávaném teplotním optimu ryb), v dubnu byla aktivita lysozymu čtyřikrát až šestkrát vyšší než koncem srpna (Obr. 2). Vzhledem k tomu, že kožní sliz se u ryb neustále obnovuje, dá se předpokládat, že na rozdíl od imunoglobulinů naměřené hodnoty odrážejí aktuální produkci lysozymu. Zjištěné sezónní změny v koncentraci lysozymu jsou tedy pravděpodobně ovlivňovány i jinými faktory, než je teplota.

Celková lytická aktivita komplementu se v průběhu roku téměř neměnila a nebyly naměřeny významné rozdíly mezi jednotlivými druhy (Obr. 4). To kontrastuje s výsledky, získanými u kaprovitých ryb – u kapra (Buchčíková 2011) a u lína (Tolarová 2014), kde byly u obou sledovaných druhů zjištěny výrazné sezónní změny.

Ze všech studovaných parametrů kopírovaly vývoj teplot pouze počty leukocytů (lymfocytů i fagocytů), které dosáhly nejvyšších hodnot počátkem července (Obr. 1A, 1B, 1C). To je v souladu s výsledky řady autorů, kteří potvrdili zvyšování počtů leukocytů u různých druhů ryb na jaře a v létě a nízké hodnoty během zimních měsíců (Morgan a kol., 2008, Saha a kol., 2003, Buchčíková 2011). Nejvýraznější sezónní dynamika v počtech leukocytů byla pozorována u pstruha duhového, nejmenší u křížence.

Závěrem lze říci, že většina měřených parametrů vykazovala výraznou sezónní dynamiku i mezidruhové rozdíly. Přestože je všeobecně uznáváno, že imunitní systém ryb pracuje nejintenzivněji v letních měsících, naše výsledky ukazují, že dynamika některých imunologických parametrů nemusí nutně kopírovat vývoj teplot.

Literatura

- Buchtíková, S., Šimková, A., Rohlenová, K., Flajšhans, M., Lojek, A., Lilius, E.M., Hyršl, P., 2011. The seasonal changes in innate immunity of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 318 (1–2): 169–175.
- Larsson, S., Forseth, T., Berglund, I., Jensen, A.J., Naslund, I., Elliott, J.M., Jonsson, B., 2005. Thermal adaptation of Arctic charr: experimental studies of growth in eleven charr populations from Sweden, Norway and Britain. *Freshwater biology* 50 (2): 353–368.
- Morgan, A.L., Thompson, K.D., Auchinachie, N.A., Migaud, H., The effect of seasonality on normal haematological and innate immune parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* L. *Fish Shellfish Immunol.* 25: 791–799.
- Poisot, T., Šimková, A., Hyršl, P., Morand, S., 2009. Interactions between immunocompetence, somatic condition and parasitism in the chub *Leuciscus cephalus* in early spring. *Journal of Fish Biology* 75: 1667–1682.
- Saha, N.R., Usami, T., Suzuki Y., 2002. Seasonal changes in the immune activities of common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Physiol. Biochem.* 26, 379–387, 2002
- Tolarová, S., Dávidová, M., Šimková, A., Flajšhans, M., Hyršl, P., 2014. The seasonal changes of innate immunity of tench, *Tinca tinca* (L.) with different ploidy level. *Aquaculture* 432: 46–52.

Poděkování

Tato práce byla podporována projektem MZe NAZV číslo QJ1210013 „Technologie chovu sladkovodních ryb s využitím necirkulačních systémů dánského typu se zaměřením na metody efektivního řízení prostředí a veterinární péče“.

POUŽITÍ ANTIBIOTIK V CHOVECH RYB V ČR

Jitka Kolářová¹, Leona Nepejchalová²

¹Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Vodňany, e-mail: kolarova@frov.jcu.cz

²Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Brno, e-mail: nepejchalova@uskvbl.cz

Paleta v ČR registrovaných antibiotických léčivých přípravků pro potravinové ryby je velmi chudá a veterinární lékař v terénu musí velmi často používat léčiva „off label“. Cílem příspěvku je poskytnout přehled o možnostech používání antibiotik při léčbě nemocí ryb především v produkčních chovech v České republice.

U ryb určených k lidskému konzumu (potravinových ryb) je možné v rámci celé EU, ČR nevyjímaje, použít k léčbě pouze veterinární léčivé přípravky, jejichž farmakologicky účinné látky jsou klasifikovány z pohledu maximálních limitů reziduí podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 470/2009, to znamená, že jsou zařazeny do přílohy 1 nařízení Komise (EU) č. 37/2010. Jednorázově lze dovést a použít v množství potřebném k léčbě jednoho případu u nás neregistrovaná léčiva, která jsou však registrována pro ryby v jiných státech EU. Pro takový dovoz je nutné žádat o výjimku Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv (ÚSKVBL). V odůvodněných případech mohou veterinární lékaři na vlastní odpovědnost aplikovat „off label“ léčivý přípravek určený pro jiný druh zvířete či pro jinou indikaci nebo léčivo humánní, případně léčivo připravené dle receptu „magistraliter“. Pokud takovýto přípravek bude použit pro chov potravinových ryb, je nutné dodržet „standardní“ ochrannou lhůtu (OL), tzn. nejméně 500 stupňodnů (Z. č. 166/1999 Sb.). Použití veterinárního léčivého přípravku neregistrovaného v EU a povolení dovozu se provádí prostřednictvím žádosti o výjimku Státní veterinární správy ČR, jak je upraveno zákonem č. 378/2007Sb. § 9 (následně § 46) a také zákonem č. 166/1999 Sb. § 19. Jednodušší situace je při ošetřování v zájmových chovech ryb (akvariijní a okrasné ryby). Za účelem léčby je zde možné použít léčivé přípravky, které nemají stanoven maximální limit reziduí (MRL).

Antibakteriální přípravky by měly být používány v chovech ryb obezřetně s ohledem na možná rizika plynoucí ze vzniku antimikrobiální rezistence. Před nasazením antibiotické léčby v chovech ryb se doporučuje provést bakteriologické vyšetření a stanovení citlivosti na antibiotika. Často však v praxi nastává situace, kdy je nezbytně nutné nasadit léčbu širokospektrálními antibiotiky aktuálně před dokončením testování v bakteriologické laboratoři.

V chovech ryb přicházejí v úvahu tři **možnosti aplikace antibiotik**:

1. Aplikace léčebných látek do vodního prostředí (léčebné koupele ryb) – léčebná látka působí na změny na žábřácích a kůži, ale léčivo se může zároveň vstřebávat kůží a žábry do těla ryby. Při tomto způsobu je dobře zajištěno dávkování antibiotika a skutečnost, že se léčebná látka dostane ke všem kusům ryb stejně. Antibiotická koupel se připravuje každý den čerstvá. Problémem ve vztahu k životnímu prostředí je likvidace léčebných koupelí.
2. Perorální aplikace – provádí se podáváním léčebných látek v krmivu (medikovaná krmiva), případně aplikací pomocí sondy zavedené do jícnu ryby. Medikovaná krmiva pro ryby smí

být vyráběna a uváděna do oběhu pouze na základě lékařského předpisu a podle schválené receptury pouze s použitím premixu pro medikované krmivo nebo se, pokud není medikovaný premix k dispozici, medikace např. s použitím perorálních prášků provádí přímo na místě chovu ryb obsluhujícím personálem, který krmivo medikuje podle instrukcí veterinárního lékaře. Při této aplikaci není zajištěno stejné dávkování jednotlivým rybám a také se často stává, že nemocné ryby již nepřijímají potravu. Tento způsob léčby s sebou nese rizika přetrvávání reziduí léčiv ve dně rybníka (pocházejí buď z nepozředeného medikovaného krmiva, které zůstane na dně nádrže, nebo z výkalů ryb). Výrazně spolehlivější aplikace léčiv v krmivu je u lososovitých ryb, které přijímají aplikované krmivo ihned u hladiny, na rozdíl od ryb kaprovitých, které sbírají potravu ležící na dně nádrže.

3. Injekční aplikace léčebných látek je nejpřesnější, ale zároveň nejkomplicovanější vzhledem k nutné manipulaci s rybami, která je pro ně stresující. U ryb je možné provádět injekční aplikaci intraperitoneálně nebo intramuskulárně do hřbetní svaloviny.

Konkrétní možnosti aplikace antibiotik u potravinových ryb v ČR

Pro použití v chovech potravinových a ostatních ryb je v současnosti v ČR registrován antibiotický přípravek **Flumiquil 50% plv. sol. ad us. vet.** (flumequin – ochranná lhůta (OL): 80 stupňodnů; CEVA ANIMAL HEALTH, SK) a antibiotikem medikované krmivo **Rupin Special gran. ad us. vet.** (oxytetracyklin – OL: 378 stupňodnů; UNIVIT s.r.o., CZ) a medikovaný premix **Aquaflor 500 mg.g⁻¹ premix pro medikaci krmiva pro pstruha duhového** (florfenikol – OL: 135 stupňodnů, Intervet International B.V.).

Na základě povolení výjimky ÚSKVBL je možné dovézt a aplikovat v ČR potravinovým rybám antibiotické přípravky registrované pro ryby v dalších zemích EU (tab. 1).

Poděkování

Tato práce byla provedena za finanční podpory MŠMT projektu CENAKVA (CZ.1.05/2.1.00/01.0024), projektu CENAKVA II (LO1205 v rámci programu NPU I).

Tab. 1. Přehled antibiotických léčivých přípravků registrovaných pro potravinové ryby v dalších zemích EU (2015).

název	účinná látka	výrobce	indikace	OL
AQUACIL plv.	amoxicilin (trihydrát)	Novartis Animal Health UK Ltd	furunkulóza	50–80 stupňodně (dle dávky)
AQUATET plv.	oxytetracyklin-hydrochlorid (100% w/w)	Pharmaq Limited, UK	Furunkulóza, flavobakteriόza, yersiniόza, vibriόza, mykobakteriόza	720 stupňodně
BRANZIL vet. plv.	kyselina oxolinová (1000mg.g ⁻¹)	Vetrepharm A/S, DK	furunkulóza, yersiniόza	při teplotě: H ₂ O > 10 °C → 30 dní H ₂ O < 10 °C → 60 dní
BRANZIL vet. premix	kyselina oxolinová (1000mg.g ⁻¹)	Vetrepharm A/S, DK	furunkulóza, yersiniόza	při teplotě: H ₂ O > 10 °C → 30 dní; H ₂ O < 10 °C → 60 dní
FLORAQPHARMA vet medikované pelety	florfenikol (2g.kg ⁻¹ pelet)	Skretting AS, NO	furunkulóza	150 stupňodně
FLOROCOL premix	florfenikol (500mg.g ⁻¹)	Schering-Plough Animal Health	furunkulóza	150 stupňodně
FLUMIQUIL 3% plv.	flumechin (30 mg.g ⁻¹)	CEVA Sante Animale, FR	furunkulóza, yersiniόza, vibriόza	2 dny
FLUMIX 160	flumechin (160 mg.g ⁻¹)	CEVA Sante Animale, FR	furunkulóza, yersiniόza, vibriόza	2 dny
FLUQUICK 50% plv.	flumechin (500 mg.g ⁻¹)	CEVA Sante Animale, FR	furunkulóza, yersiniόza, vibriόza	2 dny
INOXYL Acide Oxoloniqve 240 Salmonides	kyselina oxolinová (240 mg.g ⁻¹)	Laboratories Biove, FR	furunkulóza, yersiniόza	6 dní
MARACYCLINE 100% w/w premix	oxytetracyklin-hydrochlorid (1000 mg.g ⁻¹)	Univet Limited, IE	furunkulóza, flavobakteriόza, yersiniόza, vibriόza, mykobakteriόza	400 stupňodně
MARACYCLINE 500 mg.g ⁻¹ premix	oxytetracyklin-hydrochlorid (500 mg.g ⁻¹)	Univet Limited, IE	furunkulóza, flavobakteriόza, yersiniόza, vibriόza, mykobakteriόza	400 stupňodně
ORIMYCIN vet 200	oxytetracyklin-hydrochlorid (200 mg.g ⁻¹)	Orion Corporation, FI	furunkulóza, flavobakteriόza, yersiniόza, vibriόza, mykobakteriόza	500 stupňodně
OXOLINSYRE vet medikované pelety	kyselina oxolinová (5g.kg ⁻¹)	Skretting AS, NO	furunkulóza, yersiniόza	480 stupňodně
OXOMID Acide Oxoline 240 Salmonides	kyselina oxolinová (240 mg.g ⁻¹)	Virbac, FR	furunkulóza, yersiniόza	6 dní
PS OXYTETRACYCLINE	oxytetracyklin-hydrochlorid (750 mg.g ⁻¹)	Qualian, FR	furunkulóza, flavobakteriόza, yersiniόza, vibriόza, mykobakteriόza	300 stupňodně
AQUACULTURE premix	oxytetracyklin-hydrochlorid (200 mg.g ⁻¹)	Pfizer Oy Animal Health, FI	furunkulóza, flavobakteriόza, yersiniόza, vibriόza, mykobakteriόza	500 stupňodně
TERRAMYCIN vet plv. 55 %	oxytetracyklin-hydrochlorid (200 mg.g ⁻¹)	Intervet, DK	furunkulóza, vibriόza	500 stupňodně
TRIBRISSEN FORTE vet. premix	sulfadiazin (333mg.g ⁻¹), trimethoprim (67 mg.g ⁻¹)			
VETROMOX FISH plv.	amoxicilin (trihydrát) (100% w/w)	Alpharma Animal Health Limited	Gr+ a Gr- bakteriόzy, furunkulóza	500 stupňodně

PROLIFERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ LEDVIN PSTRUHA DUHOVÉHO V PODMÍNKÁCH INTENZIVNÍHO CHOVU: PATOGENEZE, HEMATOLOGICKÉ A IMUNITNÍ PARAMETRY

Miroslava Palíková¹, Ivana Papežíková¹, Zdeňka Marková¹, Stanislav Navrátil¹, Libor Vojtek², Pavel Hyršl²

¹Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav ekologie a chorob zvířete, ryb a včel, Brno, e-mail: palikovam@vfu.cz, papezikovai@email.cz, zdena.13@seznam.cz, navratils@vfu.cz

²Masarykova univerzita Brno, Ústav experimentální biologie, Brno, e-mail: 150465@mail.muni.cz, hyrsl@sci.muni.cz

Souhrn

V podzimních měsících jsme v intenzivním chovu lososovitých ryb zaznamenali zvýšenou mortalitu ryb. U ryb odebraných na vyšetření jsme zaznamenali typický pato-anatomický a histologický nález pro PKD. Histologicky a imunohistochemicky jsme prokázali přítomnost původce choroby. V rámci hematologického vyšetření jsme zaznamenali výrazný pokles červených krvinek, koncentrace hemoglobinu, hematokritové hodnoty a celkového počtu leukocytů. Naopak hodnota komplementu v krevní plasmě, hladina celkových imunoglobulinů, a zejména oxidativní vzplanutí fagocytů, byly výrazně zvýšené, což svědčí o stimulaci imunitní odpovědi organismu. I přes výrazné změny v krevním obraze a pato-anatomický a histologický nález se ryby dokázaly s infekcí vyrovnat a do měsíce vymizely pato-anatomické změny a většina hematologických parametrů se upravila do tří měsíců.

Úvod

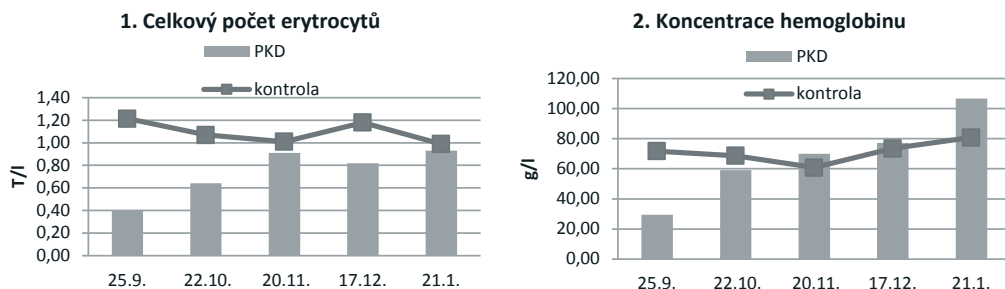
Proliferativní onemocnění ledvin (PKD) je způsobeno původcem *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malakosporea). Hlavním cílovým orgánem původce jsou ledviny, které se následkem infekce až enormně zvětšují, zbudělé ledviny mají mramorovitý vzhled s přítomností šedavých ložisek. Dochází k proliferaci intersticiální tkáně ledvin a k mizení ledvinných kanálků. Nejvíce vnímavý k tomuto onemocnění je právě pstruh duhový, u něhož při uplatnění sekundárních infekcí může mortalita dosáhnout až 95% (Clifton-Hadley a kol., 1984). *T. bryosalmonae* je dvouhostitelským parazitem. Infekční stádia jsou uvolňována z mechovky (Bryozoa) do vody, kde plavou a pronikají do lososovitých ryb přes kůži a zejména přes žábry. U lososovitých ryb jsou popisovány dvě fáze vývoje; v první fázi dochází k transportu původce krví do vnitřních orgánů, zejména do ledvin a sleziny, kde se vyvíjí extrasporogenní stádia způsobující masivní infiltraci a proliferaci intersticia. Druhá fáze nastupuje za 2–3 týdny, kdy původce migruje do ledvinných kanálků a tam vytváří sporogenní stádium. Spóry jsou vylučovány močí. Přítomnost sporogenních stádií byla experimentálně prokázána pouze u pstruha obecného a pstruha duhového, ale zpětná infekce mechovky se podařila pouze přes pstruha obecného a sivena amerického (Grabner a El-Matbouli, 2008). PKD se vyznačuje výraznou sezónností spojenou s teplotou vody. Klinické příznaky onemocnění a zvýšená mortalita se objevuje při teplotě nad 15 °C. Vyskytuje se nejčastěji u jednoletých ryb v měsíci červenci – říjnu což je spojeno s uvolňováním infekčních spór z mechovky a rovněž proliferací parazitů v hostiteli – rybě. Výsledné zvýšení intenzity infekce může poté vést k teplotně závislému zvýšení mortality ryb (Bettge a kol., 2009). Po prodělané infekci bývají ryby imunní vůči reinfekci (Foott a Hedrick, 1987). Smith-Posthaus a kol. (2012) uvádí schopnost pstruha duhového kompletně regenerovat ledvinnou tkáň a eliminovat většinu parazitů.

Materiál a metodika

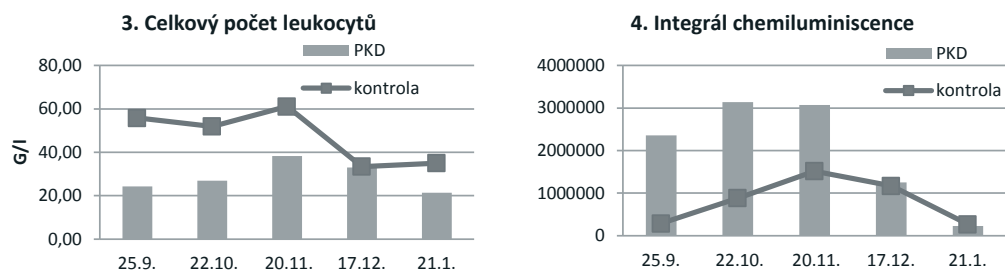
Na základě zjištění zdravotních problémů v chovu lososovitých ryb byly v pěti termínech odebrány ryby vykazující příznaky onemocnění a ryby zdravé jiného původu, ale stejného stáří, jako ryby kontrolní. Celkem bylo vyšetřeno 60 ks ryb nemocných a 45 ks ryb zdravých. Rybám byla odebrána krev z ocasních cév, poté byly ryby usmrčeny a podrobeny pato-anatomickému vyšetření. Ode všech ryb byly odebírány vzorky ledvin, jater a sleziny pro histologické a imunohistochemické vyšetření. V krvi byl stanoven celkový počet erytrocytů, hematokritová hodnota, koncentrace hemoglobinu a hodnoty výpočtové: MCV, MCH a MCHC, dále celkový počet leukocytů a oxidativní vzplanutí fagocytů. Byly zhotoveny krevní nátěry pro stanovení diferenciálních rozpočtů leukocytů. Vzorky krve byly rovněž odstředěny a plasma použita pro stanovení dalších imunologických parametrů: koncentrace celkových imunoglobulinů v plasmě a bakteriolytická aktivita komplementu v plasmě. Stanovení IgM z rybí plasmy bylo provedeno pomocí ELISA metody, bakteriolytická aktivita komplementu v plasmě ryb a intenzita oxidativního vzplanutí fagocytů v plné krvi byly stanoveny chemiluminiscenčně. Jako aktivátor fagocytů byl použit opsonizovaný zymozan. Vzorky na histologické vyšetření byly bezprostředně fixovány v 10% formaldehydu a zpracovány standardním způsobem. Řezy byly barveny klasicky hematoxylin-eosinem a imunohistochemicky za použití monoklonální protilátky Aqua MAb-P01 (Aquatic Diagnostics, Stirling, UK). Index záchyty původce byl počítán z deseti zorných polí při zvětšení 400x. Teplota vody ve sledovaném období byla při odběru t₁ – 14 °C, t₂ – 12,5 °C, t₃ – 8 °C, t₄ – 4 °C, t₅ – 3 °C.

Výsledky a diskuze

Vybrané hematologické a imunologické parametry ryb jsou uvedeny v grafech č. 1–4. Při prvním odběru byl červený krevní obraz charakteristický velice nízkým počtem erytrocytů, nízkou hematokritovou hodnotou a nízkou koncentrací hemoglobinu, což se odrazilo i ve výpočtových hodnotách. Velký objem erytrocytů svědčí o stresovém působení patogenního činitele na organismus. V tomto období docházelo k hynutí ryb. Ryby vykazovaly klinické příznaky onemocnění: apatie, ztráta příjmu potravy. Patologicko-anatomickým vyšetřením jsme zjistili 100% morbiditu vyšetřovaných ryb v různém rozsahu pato-anatomických změn: ryby měly zvětšenou dutinu tělní, jedno nebo oboustranný exoftamus, petechiální krváceniny v kůži, tekutinu v dutině tělní, anemii žaber a vnitřních orgánů, lehce až roletovitě zduřelé ledviny zejména v kaudální části, změněnou konzistenci a barvu ledvin, většinou zvětšenou slezinu, v některých případech rovněž barevně změněnou. Markantní změny byly rovněž patrné v rámci bílého krevního obrazu, infekce způsobila rapidní úbytek leukocytů lymfocytární i myeloidní řady, ačkoliv nemocné ryby nadále vykazovaly lymfocytární charakter krve. Fagocyty se vyznačovaly výrazně vyššími hodnotami oxidativního vzplanutí, což je patrné zejména po přepočtu na určitý počet, kdy byla jejich schopnost uvolňovat kyslíkové radikály více než 15x vyšší oproti rybám zdravým. Rovněž aktivita komplementu a koncentrace celkových imunoglobulinů dosahovala u nemocných ryb vyšších hodnot. Z výsledků je patrné, že původce výrazně stimuloval imunitní odezvu organismu jak v oblasti buněčné nespecifické imunity, tak v oblasti humorální specifické i nespecifické imunity. U PKD je známo, že stimuluje imunitní odpověď organismu. Intenzita a typ této imunitní odpovědi mohou být ovlivněny teplotou prostředí (Bettge a kol., 2009). Histologicky a imunohistochemicky jsme v ledvinách a ve slezině detekovali přítomnost původce PKD, *Tetracapsuloides bryosalmonae*. Histologický nálezy byl charakterizován různým stupněm proliferace a kulatobuněčné infiltrace, u některých jedinců byla přítomna nekrotická ložiska, krváceniny, docházelo k alteraci tubulárních stěn v různém rozsahu od rozpadlé tubulární výstelky po totální destrukci. Rovněž byly nacházeny okrsky s masivní fibroproduktivní proliferací a nové tubulární bazofilně se barvící formace svědčící o neotubulogenezi.



Graf 1 a 2. Vybrané ukazatele červeného krevního obrazu ryb.



Graf 3 a 4. Vybrané imunitní ukazatele ryb.

Při druhém odběru již mortalita ustoupila. Rovněž pato-anatomický nálezn byl mnohem příznivější, ryby nevykazovaly zvětšenou dutinu tělní, ledviny byly, až na 1 výjimku, pouze mírně zvětšené a přetrvávalo mírné zvětšení sleziny. Hematologické vyšetření sice prokázalo statisticky významné snížení erytrocytů, leukocytů a hematokritové hodnoty, avšak byl již patrný trend k normalizaci sledovaných ukazatelů. Zvýšená fagocytární aktivita nadále přetrvávala. Chilmonczyk a kol. (2002) popisují supresi vrozené imunitní odpovědi včetně fagocytózy a oxidačního vzplanutí ledvinných fagocytů, naopak dominující proliferaci IgM negativních lymfocytů. My jsme u infikovaných ryb naměřili silné zvýšení fagocytární aktivity. Toto pozorování je v souladu s poznatkem, že řada infekčních agens, stejně jako některé cytokiny, produkované během akutního nebo chronického zánětu, mění fyziologii neutrofilů a připravují je na setkání s aktivním signálem (tzv. „priming“ neutrofilů). (Hurtado – Nedelec a kol., 2014). Tyto neutrofilny jsou po setkání s aktivátorem schopny produkovat až desetkrát víc reaktivních kyslíkových metabolitů než nepřipravené neutrofilny (Sapey a kol., 2014). K vyrovnání hodnot červeného krevního obrazu došlo rychleji než u bílého krevního obrazu (hodnoty hemoglobinu již při druhém odběru, celkový počet erytrocytů ve třetím odběru), celkové počty leukocytů se vyrovnaly až ve čtvrtém odběru, což korespondovalo i s upravením fagocytární aktivity, která se v tomto odběru rovněž snížila na hodnotu kontrolní skupiny.

Z hlediska daného chovu je důležité, že u ryb i v souvislosti se snižující se teplotou vody ustala mortalita a vymizely klinické příznaky onemocnění a pato-anatomické změny. Ryby jsou schopny regenerovat ledvinný parenchym a dokonce mohou být odolné vůči reinfekci. Otázkou zůstává, zda jsou v chovu přítomny mechovky, a zda se budou problémy s PKD opakovat. Detailní vývoj a možnosti přenosu a uzavření vývojového cyklu nejsou ještě zcela objasněny. Morris a Adams (2008) popisují možnost infekce mechovek (Bryozoa), a tím uzavření celého vývojového cyklu, pouze pstruhem obecným. U něho dochází k formování sekundárně-terciálních dublet, jež představují začátek sporogonie. Parazit poté migruje do lumina ledvinných kanálek, tam se mění v pseudoplasmodium a přichytává se k epitelu tubulu. Uvnitř každého plasmodia se

vyvíjí jednotlivá spora. Infikované ryby pak uvolňují spory moči (Hedrick a kol., 2004). Ačkoliv Grabner a El-Matbouli (2008) píše, že pstruh duhový nepřenáší infekci na mechovky, Hedrick a kol. (2004) prokázaly spory v moči u pstruha duhového, které odpovídaly *Tetracapsuloides bryosalmonae*. Parazitární stádia v ledvinných tubulech byla nalezena u pstruha obecného a pstruha duhového, ale zralé spory s polárními kapsulami byly detekovány pouze v tubulech pstruha obecného.

Literatura

- Bettge, K., Wahli, T., Segner, H., Schmidt-Posthaus, H., 2009. Proliferative kidney disease in rainbow trout: time and temperature-related renal pathology and parasite distribution. *Dis Aquat Org* 83: 67–76.
- Clifton-Hadley, R.S., Bucke, D., Richards, R.H., 1984. Proliferative kidney disease of salmonid fish: a review. *J Fish Dis* 4: 363–377.
- Foott, J.S., Hedrick, R.P., 1987. Seasonal occurrence of the infectious stage of proliferative kidney disease (PKD) and resistance of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to reinfection. *J Fish Biol* 30: 477–483.
- Grabner, D.S., El-Matbouli, M., 2008. Transmission of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) to *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata) by various fish species. *Dis Aquat Org* 79: 133–139.
- Hedrick, R.P., Baxa, D.V., De Kinkelin, P., Okamura, B., 2004. Malacosporean-like spores in urine of rainbow trout react with antibody and DNA probes to *Tetracapsuloides bryosalmonae*. *Parasitol Res* 92:81–88.
- Hurtado-Nedelec, M., Makni-Maalej, K., Gougerot-Pocidallo, M.A., My-Chan Dang, P., El-Benna, J., 2014. Assessment of priming of the human neutrophil respiratory burst. *Meth Molec Biol* 1124: 405–412.
- Chilmonczyk, S., Monge, D., De Kinkelin, P., 2002. Proliferative kidney disease: Cellular aspects of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), response to parasitic infection. *J Fish Dis* 25: 217–226.
- Morris, D.J., Adams, A., 2008. Sporogony of *Tetracapsuloides bryosalmonae* in the brown trout *Salmo trutta* and the role of the tertiary cell during the vertebrate phase of myxozoan life cycles. *Parasitology* 135: 1075–1092.
- Sapey, E., Stockley, R.A., 2014. Red, amber and green: the role of the lung in de-priming active systemic neutrophils. *Thorax* 69: 606–608.
- Schmidt-Posthaus, H., Bettge, K., Forster, U., Segner, H., Wahli, T., 2012. Kidney pathology and parasite intensity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* surviving proliferative kidney disease: time course and influence of temperature. *Dis Aquat Org* 97: 207–218.

Poděkování

Předložená studie je podporována projektem MZe NAZV číslo QJ1210013 „Technologie chovu sladkovodních ryb s využitím necirkulačních systémů dánského typu se zaměřením na metody efektivního řízení prostředí a veterinární péče“.

SEZÓNÍ DYNAMIKA ERGASILÓZY RYB VE VYBRANÝCH VODÁRENSKÝCH NÁDRŽÍCH POVODÍ MORAVY V SOUVISLOSTI S ROZVOJEM ZOOPLANKTONU

Eva Jelínková, Zdeňka Marková, Stanislav Navrátil, Ivana Papežíková, Miroslava Palíková

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Ústav ekologie a chorob zvěře, ryb a včel,
e-mail: H13343@vfu.cz

Souhrn

*Ergasilóza, jejímž původcem je členovec chlopek obecný (*Ergasilus sieboldi*), je velmi časté parazitární onemocnění různých druhů ryb. V průběhu sezóny dochází ke změnám abundance parazita, a to v závislosti na rozvoji zooplanktonu, jehož součástí jsou vývojová stádia parazita. Byla sledována a vyhodnocena sezónní dynamika ergasilózy ryb ve VN Hubenov a VN Koryčany, v souvislosti s rozvojem zooplanktonu, a to za období duben – říjen 2014. Abundance parazita vzrůstala na jaře a na podzim. Výsledky ukazují, že kvalitativní i kvantitativní složení zooplanktonu je ovlivňováno predaním tlakem rybí obsádky, kdy nižší predanční tlak způsobuje nárůst biomasy zooplanktonu a s tím související vyšší invaze parazita.*

Úvod

Ve VN je jedním ze základních problémů udržet žádoucí kvalitu pitné vody. Na zlepšování kvality pitné vody se mohou podílet účelové rybí obsádky v dobrém zdravotním stavu (Lusk, 1983), který je pravidelně sledován v rámci ichtyologického monitoringu. Na základě dlouholetého sledování bylo zjištěno, že velmi častou parazitózou ryb ve VN Povodí Moravy je ergasilóza. Původcem tohoto onemocnění je chlopek obecný (*Ergasilus sieboldi*) napadající žábry ryb. Silně napadené ryby špatně rostou a nemohou tak již dobře plnit svoji funkci v účelové obsádce (Navrátil a kol., 2000). Cílem příspěvku je vyhodnotit sezónní dynamiku ergasilózy ryb ve VN Hubenov (okres Jihlava) a VN Koryčany (okres Kroměříž) v souvislosti s rozvojem zooplanktonu, a to na základě výsledků vyšetření ryb a monitoringu zooplanktonu ve výše uvedených nádržích v období od dubna do října 2014.

Sezónní dynamika zooplanktonu

Zooplankton je nedílnou součástí vodního ekosystému. Společenstvo zooplanktonu v našich podmínkách tvoří tři hlavní skupiny organismů: vířníci (Rotifera), perloočky (Cladocera) a klanonožci (Copepoda) (Lellák a Kubíček, 1991). Během roku dochází ke změnám v druhovém složení planktonu i v jeho kvantitě. Na sezónní dynamiku zooplanktonu mají největší vliv sezónní změny abiotických a biotických faktorů, trofie nádrže a především vyžírání tlakem ryb (Hartman a kol., 2005). Tyto změny se realizují v rámci každoročně opakujícího se cyklu (Sommer a kol., 2012). Pro tento pravidelný cyklus byl sestaven tzv. PEG-model (Plankton Ecology Group model), který slouží jako standard pro vysvětlení sezónních změn v kvalitativním a kvantitativním složení planktonu (Sommer a kol., 2012; Straile, 2015).

Ergasilóza ryb

Součástí zooplanktonu jsou i naupliová a kopepoditová stádia parazita *E. sieboldi*. Tělo parazita, hruškovitého tvaru, dorůstá velikosti až 1,7 mm. U pohlavně zralých samic lze pozorovat po stranách zadní části těla dva podlouhlé vaječné vaky, ve kterých probíhá embryonální vývoj parazita. Přes šest naupliových a pět kopepoditových stádií se vyvíjí pohlavně zralí korýši. Samci po kopulaci hynou, oplozené samičky přecházejí na parazitický způsob života převážně

na žábřácích ryb, kde se živí epitelem a krví. Délka jejich života je až jeden rok. Vnímavé jsou různé druhy ryb. Průběh onemocnění ergasilózou bývá zpravidla chronický. Existuje zde potenciální nebezpečí výrazného zhoršení zdravotního stavu napadených ryb či dokonce jejich úhynu, a to zejména v letních měsících při nižších koncentracích kyslíku ve vodě (Navrátil a kol., 2000). Rozvoj ergasilózy začíná obvykle v dubnu a trvá do listopadu. U dospělých samic, které přezimovaly přichycené na žábřácích ryb, indukuje zvyšující se teplota vody produkci první generace potomků (Tildesley, 2008). Udává se, že během roku se mohou vyvinout až tři generace tohoto parazita. Ve střední Evropě obvykle první jarní generace pohlavně dospívá v polovině června. Druhá generace se objevuje od poloviny srpna do poloviny září. Někdy vzniká i třetí generace do konce sezóny (Piasecki a kol., 2004). V průběhu sezóny dochází ke změnám abundance parazita, především v závislosti na rozvoji zooplanktonu. Složení zooplanktonu je ovlivňováno predacním tlakem ryb. Více vývojových stádií parazita bude v nádržích s nižším predacním tlakem na zooplankton, tj. tam, kde je více dravých ryb, které zooplanktonofágní ryby potlačí (Navrátil a kol., 2000). Podle vědeckých studií abundance parazita vzrůstá obvykle na jaře a na podzim (Tildesley, 2008; Piasecki a kol., 2004).

Metodika

Reprezentativní vzorky obsádek daných nádrží zajišťuje Povodí Moravy s. p., pod jehož správou obě nádrže spadají. Odlovy jsou prováděny pomocí elektrického agregátu a tenatových sítí, a to na základě příslušné metodiky (Kubečka a Prchalová, 2006). Parazitologické vyšetření ryb je prováděno ve spolupráci s VFU Brno, Ústavem ekologie a chorob zvěře, ryb a včel. Metodika laboratorního vyšetření vychází ze standardních postupů uvedených v publikacích věnovaných diagnostice ryb (Ergens a Lom, 1970; Lucký, 1982; Schäperclaus a kol., 1979). Výsledky vyšetření jsou vyhodnoceny pomocí epidemiologických charakteristik jako intenzita infekce, abundance a prevalence. Odběr vzorků zooplanktonu zajišťují pracovníci z oddělení Hydrobiologie Povodí Moravy, s. p. a vzorky jsou následně zpracovány v laboratoři oddělení Hydrobiologie Povodí Moravy, s. p., dle příslušné metodiky (Příkryl, 2006).

Výsledky a diskuze

Celkem bylo v rámci 7 odlovů z každé VN odloveno 189 kusů ryb 10 druhů. Odlovy probíhaly v měsíčních intervalech od dubna do října 2014. Ve VN Hubenov byly nejvyšší hodnoty intenzity infekce a abundance zaznamenány v červnu a v září. Vzhledem k vzrůstu hodnot v červnu pravděpodobně ukazuje na atak 1. generací parazita, v září 2. generací parazita. Ve VN Koryčany byly nejvyšší hodnoty zaznamenány již v květnu, což lze pravděpodobně dávat do souvislosti s vyšší teplotou vody v této VN, vývoj zde bude probíhat rychleji. V září a říjnu opět dochází k nárůstu hodnot, což by mohlo ukazovat na 2. generaci parazita. V obou VN dochází k poklesu těchto hodnot v červenci a srpnu. Prevalence se pohybovala v rozmezí 33,3–100%. Nejvyšší intenzity infekce byly zaznamenány u bolena dravého (*Aspius aspius*) a štiky obecné (*Esox lucius*). Celkově dosahují epidemiologické charakteristiky vyšších hodnot ve VN Hubenov. Z každé VN bylo provedeno rovněž 7 odběrů vzorků pelagiálního zooplanktonu v měsíčních intervalech duben – říjen 2014. Ve VN Hubenov dosahovaly počty jedinců v 1 m³ vody nejvyššího vrcholu v květnu, další dva nižší vrcholy následovaly v červenci a září. Ve VN Koryčany dosáhly počty jedinců v 1 m³ vrcholů v květnu a září.

Lze konstatovat, že každá VN je jedinečným ekosystémem a nedochází zde ke stejnému sezónnímu vývoji ergasilózy. Rozdíly pravděpodobně souvisí s rozvojem zooplanktonu, na jehož formování má zásadní vliv rybí obsádka daných nádrží. Ve VN Hubenov početně převažují dravé druhy ryb, které potlačují ryby zooplanktonofágní, což vede k vyššímu výskytu ergasilózy. Ve VN Koryčany je situace poměrně stabilizovaná.

Závěr

Celkově lze říci, že oproti jiným parazitům ryb se *E. sieboldi* vyskytuje v poměrně vysokých intenzitách a jeho výskyt by se měl i nadále monitorovat.

Literatura

- Ergens, R., Lom, J., 1970. Původci parazitárních nemocí ryb. 1. vyd. Academia, Praha, 359 s.
- Hartman, P. a kol., 2005. Hydrobiologie. 3 vyd. Informatorium, Praha, 359 s.
- Kubečka, J., Prchalová, M., 2006. Metodika odlovu a zpracování vzorků ryb stojatých vod. VÚV TGM, Praha, 22 s.
- Lellák, J., Kubíček, F., 1992. Hydrobiologie. 1. vyd. Karolinum, Praha, 257 s.
- Lucký, Z., 1982. Metodické návody k diagnostice nemocí ryb. 4. vyd. SPN, Praha, 150 s.
- Lusk, S., 1983. Účelové rybí obsádky v údolních nádržích. 1. vyd. Hydroprojekt, Brno, 109 s.
- Navrátil, S. a kol., 2000. Choroby ryb. 1. vyd. VFU, Brno, 2000. 155 s.
- Piasecki, W. a kol., 2004. Importance of Copepoda in Freshwater Aquaculture. Zoological Studies 43: 193–205.
- Přikryl, I., 2006. Metodika odběru a zpracování vzorků zooplanktonu stojatých vod. VÚV TGM, Praha, 14 s.
- Schäperclaus, W. a kol., 1979. Fischkrankheiten. 4. Ed. Akademie Verlag, Berlin, Germany, 1089 pp.
- Sommer, U. a kol., 2012. Beyond the Plankton Ecology Group (PEG) Model: Mechanisms Driving Plankton Succession. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 43: 429–448.
- Straile, D., 2015. Zooplankton biomass dynamics in oligotrophic versus eutrophic conditions: a test of the PEG model. Freshwater Biology 60: 174–183.
- Tildesley, A.S., 2008. Investigations into *Ergasilus sieboldi* (Nordmann 1832) (Copepoda: Poecilostomatoida), in a large reservoir rainbow trout fishery in the UK. University of Stirling, Stirling, UK, 284 pp.

Poděkování

Pracovníkům Povodí Moravy, s. p. za zajištění reprezentativních vzorků ryb a zooplanktonu.

METABOLIZACE PRAZIQUANTELU A FENBENDAZOLU U PSTRUHA DUHOVÉHO PO PERORÁLNÍ APLIKACI

Zdeňka Soukupová¹, Veronika Doubková², Petr Maršálek², Zdeňka Svobodová², Miroslava Palíková¹

¹Ústav ekologie a chorob zvířete, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, e-mail: soukupova.zdenka@centrum.cz, palikovam@vfu.cz

²Ústav veřejného veterinářství, ochrany zvířat a welfare, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, e-mail: marsalekp@vfu.cz, doubkovav@vfu.cz, svobodovaz@vfu.cz

Souhrn

V této studii jsme hodnotili a porovnávali rychlost metabolizace a eliminace perorálně podaných antiparazitik praziquantelu a fenbendazolu u lososovitých ryb. Detekce byla provedena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Získané výsledky jsou v souladu s poznatky o metabolismu a vylučování praziquantelu a fenbendazolu z těla zvířat. Tato léčiva nezanechávají žádná rezidua v různých tkáních organismu ryb. Lze říci, že ochranná lhůta požadovaná zákonem č. 166/1999 Sb., o veterinární péči, by byla v případě léčebného zásahu dodržena.

Úvod

Infekce parazitickými červy (helmintózy) patří k častým onemocněním. Vývoj některých parazitických druhů je jednoduchý, u jiných velmi složitý a probíhá za účasti mezipřehoditelů. Ryby mohou být hlavním hostitelem, ale i mezipřehoditelem parazitů. Hostiteli a mezipřehoditeli bývají také vodní ptáci a jiní vodní živočichové. V důsledku složitosti vývoje je terapie a prevence helmintóz někdy velmi problematická (Svobodová a kol., 2007). Podle zákona o veterinární péči (č. 166/1999 Sb., ve znění pozdějších předpisů) je chovatel ryb povinen sledovat zdravotní stav chovaných zvířat a v odůvodněných případech jim včas poskytnout odbornou veterinární pomoc. Z téhož zákona vyplývá zásada podávání léčivých přípravků, jejichž výdej je vázán na předpis veterinárního lékaře, zvířatům jen se souhlasem veterinárního lékaře a podle jeho pokynů. Vzhledem k náročnosti aplikace a také vzhledem k ekonomické stránce jsou v chovech ryb léčebné zásahy opatřením nouzovým, které nastupuje až v případě neúčinné prevence (Kolářová a Nepejchalová, 2014).

K léčbě ryb jsou v současné době registrovány pouze tři antibiotické léčebné přípravky. Registrované antiparazitikum není k dispozici, ačkoli parazitózy jsou nejčastějšími diagnózami v chovech ryb (Kolářová a Nepejchalová, 2014). Jako vhodné léčivo pro tlumení helmintóz u ryb se jeví použití praziquantelu (Ishimaru a kol., 2013; Sudová a kol., 2010). Farmakokinetické studie mimo jiné poukazují na to, že léčba praziquantelem je vysoce efektivní a relativně bezpečná (Ishimaru a kol., 2013). Při léčbě touto látkou nebyly prokázány vážné krátkodobé ani dlouhodobé vedlejší příznaky. Velkým kladem je možnost podat lék jednorázově orální cestou a relativně nízká cena (Cioli a kol., 1995). S určitou úspěšností lze použít i preparát s účinnou látkou fenbendazolum. Léčivo se podává většinou opakovaně, buď formou koupele nebo perorálně (Noga, 2010). V přípravcích pro veterinární použití se obvykle fenbendazol kombinuje s praziquantelem.

Cílem předkládané studie bylo zhodnotit rychlost metabolizace a eliminace antiparazitik - praziquantelu, fenbendazolu a jejich kombinovaného podání v různých částech organismu lososovitých ryb a z výskytu reziduí zjistit, zda na úplné vyloučení látky z těla postačuje doba

zákonně ochranné lhůty, jež je dána zákonem č. 166/1999 Sb., o veterinární péči. Tento zákon říká, že zvířata, jimž byly podány doplňkové látky, léčivé přípravky a další přípravky zanechávající nežádoucí rezidua v živočišných produktech, mohou být využívána k získávání nebo výrobě produktů určených k výživě lidí až po uplynutí ochranné lhůty stanovené výrobcem nebo schválené příslušným orgánem. Jde-li o léčivé přípravky, které byly použity v případě nepředpokládaném rozhodnutím o jejich registraci, anebo jde-li o neregistrované léčivé přípravky, u kterých není uvedena ochranná lhůta, mohou být zvířata takto využívána po uplynutí nejméně 500 stupňodnů, jde-li o maso ryb, přičemž počet stupňodnů se zjišťuje násobením průměrné denní teploty vody počtem dnů.

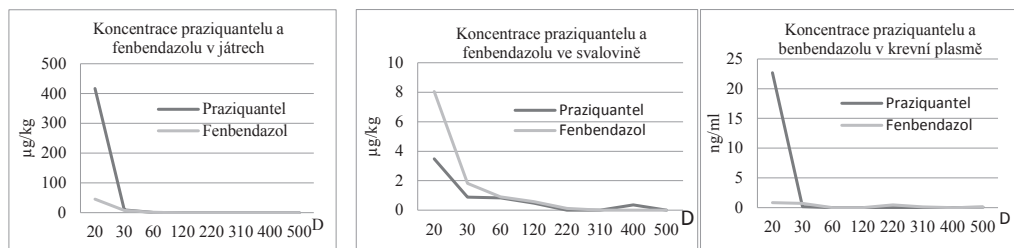
Materiál a metodika

Experiment probíhal v jarním období (duben, květen). Modelovým druhem pro tento experiment byl siven americký (*Salvelinus fontinalis*). Do pokusu byli zařazeni jedinci s hmotností cca 200 g. Celkem bylo pro analýzy použito 158 kusů ryb, které byly rozděleny do čtyř kruhových nádrží. K experimentální terapii byly vybrány přípravky Praziquantel EP 100g v práškové formě (účinná látka praziquantel) – dovezen na výjimku povolenou SVS ČR a Panacur 25 mg.kg⁻¹, p.o. suspenze (účinná látka fenbendazolum). Skupiny byly označeny jako kontrolní, skupina s aplikací fenbendazolu, skupina s aplikací praziquantelu a skupina s kombinovanou aplikací (praziquantel + fenbendazol). Obě léčiva byla aplikována jícnovou sondou do gastrointestinálního traktu, jednorázově v čase t₀, v množství 50 mg.kg⁻¹ živé hmotnosti. U kombinované expozice v množství 25 mg.kg⁻¹ ž.hm. každé látky. V průběhu experimentu byla sledována teplota vody. Pro sledování rychlosti metabolizace byly prováděny odběry po 6 kusech ryb v čase t₂₄ (24 h po aplikaci léčiva), t₄₈, t₁₂₀, t₃₁₂, t₄₈₀, t₆₄₈, t₈₁₆, t₁₀₀₈. Pokusným zvířatům byla odebrána krev. Poté byla zvířata zákonným způsobem usmrcena vykvrvením po předchozím omráčení tupým úderem do hlavy, bylo provedeno parazitologické vyšetření a odebrány vnitřní orgány (játra, ledviny, svalovina) pro další analýzu. Koncentrace praziquantelu a fenbendazolu byly stanoveny metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Příprava vzorku spočívala v extrakci do metanolu a následné extrakci na pevné fázi.

Výsledky a diskuse

Z výsledků testování je patrné, že v případě praziquantelu i fenbendazolu jejich nejvyšší koncentrace v těle dosahují maxima do 24 hodin po podání. V dalších 24 hodinách jejich koncentrace prudce klesají (viz. Obr. 1, 2 a 3). Vrchol koncentrace v séru je u člověka (ale i u opic a potkanů) dosažen za 1–2 hodiny po podání 50 mg.kg⁻¹ tělesné hmotnosti u zdravých dospělých jedinců (Leopold a kol., 1978, Pearson a Guerrant, 1983). Obě látky jsou rychle absorbovány a distribuovány v tělesných tkáních. Praziquantel i fenbendazol jsou u ryb podrobeny výraznému jaternímu metabolismu, do značné míry metabolizovány a vyloučeny ledvinami a účinkem žluči, tak jako u ostatních obratlovců. Poločas rozpadu nezměněné látky je kolem 1,5 hodiny a pro metabolické vedlejší produkty kolem 4–6 hodin (King a Mahmoud, 1989, Pearson a Guerrant, 1986). Z organismu není vylučován prakticky žádný nemetabolizovaný praziquantel (Cioli a kol., 1995). Fenbendazol je u savců vyloučen v nezměněné formě stolicí. Cioli a kol. (1995) uvádí, že kolem 80% celkového praziquantelu bylo odstraněno z léčené krysy během 24 hodin a po 4–5 dnech nebyly po přípravku nalezeny žádné stopy. To, že jsme v našem experimentu detekovali obě látky v krevní plazmě ještě po několika dnech a v krevní plazmě ve velmi malém množství (0,06 ng.kg⁻¹) i na konci experimentu je možno vysvětlit tím, že pokus probíhal v kruhových nádržích s relativně pomalou výměnou vody (viz Tab. 1). Tím pravděpodobně docházelo v určité míře k cirkulaci vylučovaných metabolitů a jejich příjmu

zpět do organismu. Testy na zvířatech dále ukázaly, že toxicita praziquantelu je velmi nízká, jak v akutních tak v dlouhodobých experimentech (Frohberg, 1984). Mutagenními studiemi na bakteriálních, kvasinkových a savčích systémech se neprokázalo žádné riziko genotoxicity (Kramers a kol., 1991, cit. dle Cioli a Pica-Mattocia, 2003). Tento fakt je důležitý zejména pro hodnocení výskytu případných reziduí u potravinových zvířat. Až na výjimku, kdy se vyskytovala stopová množství obou látek v krevní plazmě, došlo k jejich úplnému odbourání a eliminaci z těla. V době ukončení pokusu jsme dosáhli ochranné lhůty odpovídající 497,6 denních stupňů (viz Tab. 1). Lze tedy říci, že doba zákonné ochranné lhůty pro tržní ryby byla v tomto případě dodržena.



Obr. 1, 2, 3. Koncentrace praziquantelu a fenbendazolu v játrech, svalovině a v krevní plazmě.

Tab. 1. Koncentrace praziquantelu a fenbendazolu v játrech, krevní plazmě a svalovině v časech odběrů vzorků v porovnání se souvisejícími denními stupni (D°).

D°	Doba [h]	Játra		Krevní plazma		Svalovina	
		Prazi. [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	Fen. [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	Prazi. [$\text{ng}\cdot\text{m}^{-1}$]	Fen. [$\text{ng}\cdot\text{m}^{-1}$]	Prazi. [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	Fen. [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]
20,24	t24	416,42	45,27	22,67	0,82	3,49	8,05
29,71	t48	9,11	7,64	0,15	0,71	0,88	1,82
59,37	t120	0,18	0,16	0	0	0,84	0,91
132,89	t312	0	0,07	0	0	0,48	0,58
223,79	t480	0	0,03	0	0,43	0	0,13
309,95	t648	0	0,1	0	0,09	0	0
400,77	t816	0	0	0	0	0,36	0
497,6	t1008	0	0	0,06	0,06	0	0

Závěr

K analýze reziduí léčiv byla použita vysoce citlivá metoda HPLC, což nám umožnilo detekci ještě velmi malých množství xenobiotik v tělesných tekutinách i tkáních. Výsledky testu potvrdily předchozí poznatky – praziquantel i fenbendazol vykazují vysokou rychlost metabolizace a eliminace z organismu ryb. Obě látky by se na základě současných znalostí o léčebném účinku daly dobře uplatnit k terapii helmintóz, neboť splňují podmínky ochranné lhůty dle zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči.

Literatura

- Cioli, D. a kol., 1995. Antischistosomal drugs: past, present... and future? *Pharmacology & Therapeutics* 68: 35–85.
- Cioli, D., Pica-Mattocia, L., 2003. Praziquantel. *Parasitology Research* 90: S3–S9.
- Frohberg, H., 1984. Results of toxicological studies on praziquantel. *Arzneimittel-forschung* 31: 555–565
- Ishimaru, K. a kol., 2013. Praziquantel treatment against *Cardicola* blood flukes: Determination of the minimal effective dose and pharmacokinetics in juvenile Pacific bluefin tuna. *Aquaculture* 402–403: 24–27
- King, C.H., Mahmoud, A.A., 1989. Drugs five years later: praziquantel. *Annals of Internal Medicine* 110: 290–296
- Kolářová, J., Nepejchalová, L., 2014. Terapeutické možnosti v chovech ryb v ČR – přehled. *Veterinářství* 7: 533–538.
- Leopold, G., Ungethum, W., Groll, E., Diekmann, H.W., Nowak, H., Wegner, D.H.G., 1978. Clinical pharmacology in normal volunteers of praziquantel, a new drug against schistosomes and cestodes. An example of a complex study covering both tolerance and pharmacokinetics. *European Journal of Clinical Pharmacology* 14: 281–291.
- Noga, E., 2010. Fish disease: Diagnosis and treatment: 286–294.
- Pearson, R.D., Guerrant, R.L., 1983. Praziquantel: a major advance in anthelmintic therapy. *Annals of Internal Medicine* 99: 195–198
- Svobodová, Z., Kolářová, J., Navrátil, S., Veselý, T., Chloupek, P., Tesarčík, J., Čítek, J., 2007. Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb. *Informatorium*, Praha, 264 s.
- Sudová, E., Piačková, V., Velíšek, J., Pijáček, M., Svobodová, Z., 2010. Efficacy Testing of Orally Administered Praziquantel to Common Carp Naturally Infected by Caryophyllidean Tapeworms (Platyhelminthes: Eucestoda). *Acta Veterinaria* 79: 73–78.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA 24/2014/FVHE.

ECIP – SOUČASNOST A PERSPEKTIVY ČESKÉ ICHTYOPARAZITOLOGICKÉ ŠKOLY

Milan Gelnar¹, Tomáš Scholz², Pavel Jurajda³

¹Ústav botaniky a zoologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 637 11 Brno, e-mail: gelnar@sci.muni.cz

²Biologické centrum AV ČR vvi, Parazitologický ústav, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, e-mail: tscholz@paru.cas.cz

³Ústav biologie obratlovců AV ČR, Květná 8, 603 65 Brno, e-mail: jurajda@brno.cas.cz

Úvodem

Česká republika je zemí s velice dobrou reputací v bio-ekologickém výzkumu a některé výsledky se těší širokému mezinárodnímu uznání a respektu. Mezi několik celosvětově respektovaných vědních oborů rozvíjených v naší zemi patří bezesporu studium cizopasníků ryb. Starší a střední generace českých ichtyoparazitologů (Jiří Lom, Radim Ergens, František Moravec, Iva Dyková, Tomáš Scholz a Milan Gelnar) představuje často odborníky, jejichž práce se těší celosvětovému uznání, což se projevuje mimo jiné i vysokým počtem citačních ohlasů a více méně pravidelnými pozvánkami k plenárním přednáškám na mezinárodních parazitologických sympoziích a kongresech (např. ICOPA, EMOP, WAAVP).

Čeští ichtyoparazitologové jsou rovněž zakladateli nejdůležitějších vědeckých setkání v oboru ichtyoparazitologie. (1) První **International Symposium on Fish Parasitology** (Lom, Dyková, Moravec a Ergens) bylo uspořádáno v Českých Budějovicích v roce 1983 a tato tradice do dnešních dnů pokračuje (v roce 1999 opět Parazitologický ústav AV ČR, České Budějovice). V letošním roce se ve španělské Valencii uskuteční již 9. sympozium této řady. (2) Druhým mezinárodním sympoziem, které se zrodilo z iniciativy českých ichtyoparazitologů bylo **International Symposium on Monogenea** (Ergens a Gelnar), které se poprvé uskutečnilo opět v Českých Budějovicích v roce 1988. Česká republika hostila uvedené sympozium podruhé v roce 1997, kdy jejím pořadatel byla brněnská Přírodovědecká fakulta MU a stejné pracoviště bude pořadatelem také příštího již osmého setkání této řady v roce 2017.

Zmínit je potřeba rovněž uspořádání dvou **International Training Course in Ichtyoparasitology**, které se v Parazitologickém ústavu v Českých Budějovicích uskutečnily v letech 1991 až 1992. S odstupem času lze také tuto aktivitu hodnotit pozitivně, neboť z několika zahraničních účastníků těchto kurzů se stali významní odborníci, kteří významně přispěli k rozvoji oboru ichtyoparazitologie.

ECIP – historie vzniku centra a jeho personální management

Centrum **ECIP – Evropské Centrum Ichtyoparazitologie** zahájilo svou činnost v roce 2012 jako centrum excelence podporované Grantovou agenturou ČR pro období 2012 až 2018. Stejně jako v případě předchozího projektu nazvaného **Centrum základního výzkumu ichtyoparazitologie** (LC522) pracujícího díky financování MŠMT v letech 2005-2011 (MŠMT), byly jeho zakladateli stejné tři instituce: (1) **Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity**, Brno, (2) **Parazitologický ústav AV ČR** v Českých Budějovicích a (3) **Ústav biologie obratlovců AV ČR** v Brně. V současné době pracuje na všech třech pracovištích centra téměř **45 pracovníků** z těchto 13 zemí (Alžírsko, Austrálie, Belgie, Bulharsko, Česká republika, Holandsko, Indie, Mexiko, Nový Zéland, Slovensko, Ukrajina, Rakousko, Rusko). Především se jedná o studenty **doktorských** studijních programů a **post doky**.

ECIP Scientific Board

Centrum ECIP je koncepčně řízeno mezinárodní 12člennou vědeckou radou, která se účastní výročních workshopů týmu ECIP. Úkolem Rady vždy je zhodnotit výsledky dosažené v daném roce a schválit rámcový plán na rok následující. Složení rady centra je následující:

Interní členové: **Milan Gelnar** (PřF MU, Brno), **Andrea Vetešníková-Šimková** (PřF MU, Brno), **Iva Dyková**, (PřF MU, Brno), Tomáš Scholz (PaU AV ČR ČBu), **Astrid JHolzer** – Rakousko (PaU AV ČR ČBu), **Aneta Kostadinova** – Bulharsko (PaU AV ČR ČBu), **Pavel Jurajda** (UBO AV ČR, Brno), **Martin Reichard** (UBO AV ČR, Brno).

Externí členové: Petr Horák (PřF UK, Praha), Kurt Buchmann (University of Copenhagen, Dánsko), Bernd Sures (Universitat Duisburg-Essen, Esen, Německo), Carl Smith (University of St. Andrews, St. Andrews, UK).

V průběhu prvních tří let trvání projektu se výroční workshopy týmu ECIP postupně uskutečnily v Šatově (2012), v Hradci nad Moravicí (2013) a na Starém Mlýně u Blanska v roce 2014.

Základní moduly projektu

Vědecký program centra je vymezen rámcem čtyř vědeckých modulů, které určují hlavní směry prováděného výzkumu:

- **Diverzita parazitů a jejich adaptace k parazitismu**
- **Fylogenetika a molekulární taxonomie**
- **Parazito-hostitelské vztahy a interakce**
- **Evoluční epidemiologie a behaviorální ekologie cizopasníků a ryb**

Veškerý doposud prováděný výzkum má povahu základního výzkumu a lze konstatovat, že bylo získáno a publikováno velké množství originálních vědeckých poznatků. Dosavadní vědecký výkon Centra za první tři roky lze **doložit celkem 123 publikacemi** v mezinárodních časopisech s IF a několika kapitolami v zahraničních monografiích (viz Mašová a Gelnar, 2014).

Modelové skupiny cizopasníků a ryb

Díky expertize svých členů tým ECIP pokrývá většinu velkých skupin rybích cizopasníků včetně řady skupin hostitelských ryb. Šířka tohoto odborného a metodického záběru činí tým ECIP celosvětově zcela unikátní.

- **Amfizoické améby** (FLA – free living amoebae – Dyková, Tylm)
- **Apicomplexa mořských bezobratlých** (Valigurová)
- **Myxozoa** (Holzer)
- **Monogenea** (Gelnar, Řehulková, Přikrylová, Vetešníková-Šimková, Kašný, Scholz)
- **Cestoda** (Scholz, Kuchta)
- **Trematoda** (Kostadinova)
- **Nematoda a Acanthocephala** (Moravec, Mašová)
- **Parazitičtí korýši** (Dávidová, Kuchta)
- **Hostitelské ryby** (Jurajda, Reichard, Ondračková)

Multidisciplinární charakter

Centrum ECIP má výrazně multidisciplinární charakter, neboť při studiu cizopasníků a ryb je využívána mimořádně široká škála nejrůznějších biologických oborů a disciplín, např. parazitologie, protistologie, helmintologie, taxonomie a systematika, ichtyologie, ekologie, biostatistika, matematické modelování, evoluční biologie, imunologie, genetika, molekulární biologie, behaviorální, evoluční a molekulární ekologie, evoluční parazitologie, imunogenetika a imunoekologie.

Ke studiu širokého spektra cizopasníků jsou využívány také velice rozmanité metodické postupy, např. kontrastní mikroskopie (FC, DIC) epifluorescenční mikroskopické techniky, konfokální a elektronová mikroskopie (CLSM, SEM, TEM), rozsáhlý komplex metod molekulární biologie a genetiky, metody evoluční ekologie a epidemiologie včetně histologie, studia ultrastruktury a imunohistochemie, stejně jako metody kultivační a tkáňových kultur. Ke své činnosti Centrum využívá následujících laboratoří, které umožňují v řadě případů studium cizopasníků na špičkové úrovni.

- **Laboratoř evoluční epidemiologie a parazitologie**
- **Laboratoř molekulární parazitologie**
- **Laboratoř speciální mikroskopie**
- **Laboratoř elektronové a konfokální mikroskopie**
- **Laboratoř biochemická**
- **Laboratoř histologická**
- **Laboratoř protistologická**
- **Zařízení pro držení a chov ryb**

Literatura

Mašová, Š., Gelnar, M. (Eds), 2014. 3rd Workshop of European Centre of Ichtyoparasitology, Hotel Skalní Mlýn, 24–26 November, 2014, Programme and Abstracts. MUNI PRESS, Brno, 91 s.

Poděkování

Finanční podpora byla projektu Centrum Excellence ECIP číslo: P505/12/G112 poskytnuta Grantovou Agenturou České republiky.

KDO MÁ NA SVĚDOMÍ ZÁNĚT PLYNOVÉHO MĚCHÝŘE U PLŮDKU KAPRA OBECNÉHO? – MOLEKULÁRNÍ METODY ŘEŠÍ PROBLÉMY S IDENTIFIKACÍ U MYXOZOÁRNÍCH PARAZITŮ

Astrid Holzer¹, Ashlie Hartigan¹, Pavla Bartošová¹, Edit Eszterbauer² a Ivan Fiala¹

¹Laboratoř rybí protistologie, Parazitologický ústav, Biologické centrum Akademie věd České republiky, České Budějovice, Česká republika, e-mail: astrid.holzer@paru.cas.cz

²Oddělení rybí parazitologie, Výzkumný ústav veterinární medicíny, Maďarská akademie věd, Budapešť, Maďarsko, e-mail: eedit@vmri.hu

Akutní zánět plynového měchýře (SBI) je významné onemocnění plůdku kapra ve Střední Evropě. V roce 1980, byla jeho etiologie připisována proliferativní fázi parazita *Sphaerospora dykovae* (dříve *S. renicola*) ze skupiny Myxozoa (rybomorky). *S. dykovae* byla zaznamenána v krvi a v močovém měchýři před infekcí ledvin, kde dochází ke tvorbě spor. Vzhledem k častějším případům přítomnosti proliferativních myxosporeových krevních stádií v chovech kapra v posledních letech jsme zavedli detekci SBI pomocí molekulární diagnostiky.

Těžké případy infekce byly v naší studii charakterizovány velkými mnohobuněčnými stádií v plynových měchýřích nakažených ryb. Zjistili jsme, že tato stádia patří parazitu *S. dykovae*, nicméně v krevním řečišti jsme detekovali převážně druh *S. molnari*. Tento parazit napadá různé orgány a způsobuje zánětlivé změny i v nepřítomnosti *S. dykovae*. Jeden případ s lehčím projevem SBI byl patrně způsoben i vzdáleně příbuznou rybomorkou z rodu *Buddenbrockia*, kterou jsme zaznamenali v různých orgánech a způsobovala zde granulomatózní reakce. Etiologie SBI může být ovlivněna nejen množstvím parazita *S. dykovae*, ale i přítomností *S. molnari* v krvi, který představuje významný kofaktor nebo je i předpokladem pro vznik SBI.

Česká republika má pro odchov ryb k dispozici plochu o velikosti 52 000 ha, z čehož přibližně 90 % představuje chov kapra obecného, *Cyprinus carpio carpio*, s průměrným výnosem 19 000 t/rok. Avšak ne každý kapr doroste do prodejní velikosti. Největší ztráty v chovech kapra jsou zaznamenány u mladých ryb v průběhu prvního léta, kdy se zvyšuje teplota a snižuje hladina kyslíku prostředí. Kromě toho je kapří plůdek, který nemá dostatečně vyvinutou imunitu, v rybnících bombardován širokou škálou parazitů, bakterií a virových patogenů.

Za jedno z hospodářsky významných onemocnění kapřího plůdku O+ je ve střední Evropě považován akutní a těžký zánět plynového měchýře (swim bladder inflammation, SBI) kapra obecného, který byl původně popsán Hoferem v roce 1905. Prvními známkami SBI jsou rozšířené cévy a výskyt krevních sraženin kolem velkých cév, které jsou viditelné na povrchu plynového měchýře. V akutní SBI fázi dochází k zesílení epitelu měchýře, k vakuolizaci epitelových buněk a edematóznímu prosáknutí pojivové tkáně. S postupující nemocí infiltrují lymfocyty stěnu měchýře a jeho okolí a často můžou nastoupit sekundární infekce. V extréměch může docházet až k 100 % úhynům kapřího plůdku.

Už v roce 1980 vyslovil maďarský vědecký pracovník Prof. Kálmán Molnár svou domněnku o původci SBI, za nějž označil vývojová stádia myxozoi. Myxozoa, česky rybomorky, jsou rozmanitá a široce rozšířená skupina mnohobuněčných mikroparazitů, jejichž životní cyklus zahrnuje dva typy hostitelů žijících převážně ve vodním prostředí: obratlovci (typicky ryby) a bezobratlí (máloštětinatci, mnohoštětinatci a mechovky). Charakteristickými infekčními stádii myxozoi jsou vícebuněčné spory, jejichž morfologie se tradičně používá pro rozlišení jednotlivých druhů. Jako původce onemocnění ledvin u kapra byl označen druh *Sphaerospora dykovae* (Lom a Dyková, 1982) (dříve *S. renicola*). V roce 1980 byla proliferativní, presporogonická stadia tohoto parazita identifikována jako původce SBI. Kromě proliferativních stádií v plynovém měchýři dochází k namnožení parazita taky v krvi hostitele. Nicméně taxonomická příslušnost

různých vývojových stadií k druhu *S. dykoveae* nalezených u kapra byla potvrzena jenom experimentálně, a to s ne vždy úspěšnými výsledky, např. krevní stadia přenesené do pokusné ryby ne pokaždé vyvolaly infekci *S. dykoveae* v ledvinách. Navíc, z ledvin kapra, závojnky (*Carassius auratus auratus*) a karase stříbřitého (*Carassius gibelio*) byla také popsána *S. angulata* Fujita, 1912, která je morfologicky podobná *S. dykoveae*. Proto pro spolehlivou identifikaci různých druhů parazitů a rozlišení morfologicky rozmanitých vývojových stadií vyskytujících se v různých orgánech je velmi důležité vyvíjet spolehlivé moderní molekulární metody.

Hlavní výzkum zaměřený na rybomorku *S. dykoveae* probíhal před 30 lety, a to převážně v laboratořích dvou evropských institucí: na Oddělení rybí parazitologie na Výzkumném ústavu veterinární medicíny Maďarské akademie věd a v Laboratoři rybí protistologie Parazitologického ústavu současného Biologického centra Akademie věd České republiky. Rozhodli jsme se spojit své síly, abychom pomocí molekulárních metod ozřejmili nejasnosti týkající se identifikace etiologického původce SBI.

SBI vykazuje silnou korelaci se sezónností, protože etiologický původce onemocnění je schopný rychlejší proliferace se zvyšující se teplotou prostředí. Výzkum kaprů pocházejících z Maďarských farem, který probíhal letos v létě, byl zaměřen na vyšetření plynových měchýřů vykazujících patologické změny působené parazity. Podstatou výzkumu bylo zjištění druhového zastoupení parazitů pomocí specifické PCR a *in-situ* hybridizace s využitím značených sond vázajících DNA parazita v histologických řezech tkání. Druhá ze zmíněných metod umožnila určit totožnost a lokalizaci myxozoi v plynových měchýřích ryb v průběhu infekce. Zjistili jsme, že SBI není způsobována jenom jedním druhem rybomorky, ale má více druhovou etiologii. Pomocí molekulární diagnostiky, která byla vůbec poprvé použita pro identifikaci SBI, jsme dokumentovali výskyt patologických původců SBI. Díky této metodice jsme byli schopni objasnit nejasnosti a nesprávné identifikace proliferativní etapy myxosporeové infekce, které se objevily v minulosti, kdy původci SBI byly determinovány výhradně na základě jejich morfologie a na základě experimentálních přenosů. Určili jsme významnou korelaci mezi vysokými počty *S. molnari* v proliferativním stupni vývoje a mírným až těžkým projevem SBI patologie. Zatímco jen těžké případy byly spojeny s velkými proliferativními stádii *S. dykoveae* v močovém měchýři, druhu, který byl dříve výhradně spojen s nemocí plynového měchýře u kapra. Zaznamenali jsme zvyšující se počet *S. molnari* v krvi na různých lokalitách spojených s produkcí kapra. Tento nárůst výskytu parazita může souviset s rostoucími teplotami vody. Ze zjištěných poznatků můžeme předpokládat zvýšený opětovný výskyt případů SBI ve střední Evropě v blízké budoucnosti. Dále nemůžeme vyloučit další problémy v souvislosti se zvyšujícím se výskytem *S. molnari*, který může mít důsledky související s patologickými projevy na žábrech, očích a kůži u kapra obecného. Je tedy mimořádně důležité, abychom rozšířili naše poznatky o životním cyklu, přenosu a vývoji *S. molnari* u kapra obecného.

V současné době se snažíme zintenzívnit výzkum zaměřený na SBI kapra, poněvadž globální oteplování a měnící se klimatické podmínky mohou způsobit opětovné objevení se tohoto onemocnění v důsledku zvýšené rychlosti množení parazitů za vyšších teplot. Spolupráce mezi českými a maďarskými výzkumnými týmy je soustředěna na hledání definitivního bezobratlého hostitele zahrnutého v životním cyklu *S. dykoveae*, aby bylo možné navrhnout vhodné strategie pro management chovu kaprů ve středoevropských rybnících, který by také v budoucnosti zajistily produkci kaprů.

Poděkování

Rádi bychom na tomto místě poděkovali Dr. Jacky Cossonovi, FROV JU, Vodňany za pomoc při pořizování video dokumentace pohyblivých stadií parazitů. Děkujeme také všem rybářům, kteří byli vždy ochotni spolupracovat a poskytli vzorky ryb. Poděkování patří také Grantové agentuře České republiky za poskytnutí finanční podpory (P505/12/G112).

VYUŽITÍ PESTICIDŮ NA BÁZI PYRETHROIDŮ K LÉČENÍ PARAZITÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ KAPRA OBECNÉHO

Josef Velíšek, Eliška Zusková, Alžběta Stará, Dalibor Koutník, Jitka Kolářová

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Fakulta rybníkářství a ochrany vod, Výzkumný ústav rybníkářský a hydrobiologický, Vodňany, email: velisek@frov.jcu.cz

Souhrn

Cílem této studie bylo ověření účinnosti pesticidů na bázi pyrethroidů k léčbě parazitárních onemocnění ryb způsobených žábrolísty (monogenea). Byly vybrány dva přípravky k testování léčebného účinku na rybí parazity s účinnou látkou deltamethrin (50 g.l⁻¹) a cypermethrin (250 g.l⁻¹). Testy aplikace léčebných koupelí u plůdku kapra obecného infikovaného žábrolísty byly provedeny v provozních podmínkách Rybníkářství Pohořelice a.s., líheň Velký Dvůr. Provozním testům předcházely laboratorní testy akutní toxicity a bezpečnosti vybraných přípravků pro kapra obecného na základě stanovení biochemického a hematologického profilu a histopatologických změn.

Úvod

Efektivní hospodaření akvakulturních chovů v ČR je přímo závislé na zdravotní kondici chovaných ryb. Podle zákona o veterinární péči (zákon č. 166/1999 Sb.) je chovatel povinen sledovat zdravotní stav chovaných zvířat a v odůvodněných případech poskytnout odbornou veterinární pomoc. Akvakulturní chovy se neobejdou bez preventivních a léčebných opatření, která jsou součástí technologických postupů.

Léčba infekčních a parazitárních onemocnění ryb v ČR se však jen z malé části může opírat o přípravky registrované pro ryby. Současná paleta v ČR registrovaných přípravků (Registrované veterinární léčivé přípravky, 2014) pro ryby zahrnuje pouze léčiva s antimikrobiálním účinkem. K léčbě parazitárních onemocnění není v ČR k dispozici registrovaný přípravek pro ryby. Pro potenciálního výrobce léčiv je z ekonomického hlediska příprava podkladů pro registraci léčivého přípravku, určeného pro minoritní cílovou skupinu jako jsou ryby, nevýhodná, neatraktivní a nereálná nejen v podmínkách ČR. Jedinou možnou cestou léčebného zásahu v chovech ryb je použití léčiv „off label“, tedy léčiv druhé a třetí volby, tj. léčiv určených pro jiný druh zvířete, humánních léčiv, případně léčiv připravených „magistra liter“ (Kolářová a Svobodová, 2009). Při takovémto použití odpovědnost za bezpečné použití nese veterinární lékař aplikující léčbu. Cílem naší práce je dodat podklady pro účinné a bezpečné použití přípravků neregistrovaných pro ryby pro jejich praktické použití v terénu.

Na základě sumarizace výsledků vyšetření ryb z posledních let v ČR bylo zjištěno, že nejčastějším zdravotním problémem v chovech kaprovitých ryb, který způsobuje významné ztráty a je léčebně těžko řešitelný, jsou ektoparazitózy, zejména infekce vyvolané žábrolísty (monogeneózy). Cílem této práce bylo ověřit možnost použití dvou insekticidních přípravků na bázi pyrethroidů dostupných na našem trhu s účinnou látkou deltamethrin a cypermethrin k léčbě monogeneóz plůdku kapra obecného. Obě tyto účinné látky jsou již velice úspěšně využívány v zahraničí k léčbě parazitárního onemocnění způsobeného *Lepeophtheirus salmonis* u lososovitých ryb ve Skandinávii (Boxaspen a Holm, 2001). Parazit *L. salmonis* je svojí strukturou a vývojovým cyklem velice podobný žábrolístům, a proto se jeví použití těchto látek jako velice perspektivní i v chovech kaprovitých ryb.

Metodika a materiál

Testované přípravky

Testovaný přípravek na bázi deltamethrinu (50 g.l^{-1}), byl použit v koncentraci 19 a $65 \text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$. Přípravek ve formě emulze olej ve vodě je dobře rozpustný ve vodě.

Testovaný přípravek na bázi cypermethrinu (250 g.l^{-1}) byl použit v koncentraci 13 a $45 \text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$. Přípravek ve formě emulgovaného koncentrátu je dobře rozpustný ve vodě.

Laboratorní testy

Koncentrace obou pesticidů pro provozní testy byla zvolena na podkladě předchozích testů akutní toxicity provedených na plůdku kapra obecného v laboratorních podmínkách VÚRH FROV JU. Testy byly prováděny dle směrnice OECD č. 203. Stanovena byla 96hLC_{50} , 24hLC_{50} a 5hLC_{50} . Současně byla v laboratorních podmínkách testována bezpečnost pro cílový organismus (pro ryby) na základě hematologického (dle Svobodová a kol., 2012), biochemického (dle Kolářová a Velíšek, 2012) a histopatologického vyšetření.

Ověření účinnosti pyrethroidů v provozních podmínkách.

Ověření účinku pesticidů na bázi pyrethroidů k léčbě parazitárních onemocnění kapra obecného bylo provedeno v provozních podmínkách Rybníkářství Pohořelice a.s., líheň Velký Dvůr na plůdku kapra obecného. Byly provedeny dva časově oddělené testy na rybách přirozeně infikovaných žábrolísty. Před zahájením každého testu bylo provedeno parazitologické vyšetření žaber a kůže plůdku kapra. Po expozici ryb léčebné koupeli (test č. 1: 24 h; test č. 2: 5 h) byla vyhodnocena mortalita a bylo opět provedeno parazitologické vyšetření s vyhodnocením prevalence a intenzity infekce žábrolísty.

Test č. 1

Parazitologickým vyšetřením žaber a kůže plůdku kapra před testem (množství vyšetřených ryb = 50 ks) byla prokázána infekce žábrolísty rodu *Dactylogyrus* sp. ve 100% prevalenci a intenzitě 10–20 ks na 1 rybu. Plůdek kapra o průměrné délce 58,1 mm napadený žábrolísty byl rozdělen do 6 žlabů (300 ks plůdku do každého žlabu). Do 2 pokusných žlabů byl aplikován přípravek na bázi deltamethrinu v koncentraci $65 \text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$, do 2 pokusných žlabů byl aplikován přípravek na bázi cypermethrinu v koncentraci $45 \text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$ a další 2 žlaby byly ponechány jako kontrolní bez přídatku jakékoliv látky. Doba expozice testu č. 1 byla 24 hodin.

Test č. 2

Parazitologickým vyšetřením žaber a kůže plůdku kapra obecného před zahájením testu (množství vyšetřených ryb = 50 ks) byla prokázána 98% prevalence žábrolísta rodu *Dactylogyrus* sp. v intenzitě 15–22 ks na 1 rybu. Plůdek kapra obecného o průměrné délce 61,3 mm napadený žábrolísty byl rozdělen do 10 žlabů (100 ks plůdku do každého žlabu). Do 4 pokusných žlabů byl aplikován ve dvou koncentracích (19 a $65 \text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$) přípravek na bázi deltamethrinu, do 4 pokusných žlabů ve dvou koncentracích (13 a $45 \text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$) přípravek na bázi cypermethrinu a ve 2 žlabech byla umístěna kontrola bez přídatku jakékoliv látky. Doba expozice testu č. 2 byla 5 hodin.

Výsledky a závěry

1. Aplikace přípravku na bázi cypermethrinu.

V koncentraci $45 \mu\text{g.l}^{-1}$ při délce koupele 24 hodin a 5 hodin se snížila míra infekce žábrolísty o 38,2–45,2 %, ale během této léčebné koupele došlo k vysoké mortalitě ryb (45–85 %). Nebezpečnost pro ryby potvrdily u této koncentrace také výsledky biochemického vyšetření krevní plazmy a histopatologické vyšetření tkání.

Při použití nižší koncentrace, $13 \mu\text{g.l}^{-1}$ při délce koupele 5 hod se intenzita parazitů snížila o 26,9 % s mortalitou 9 % během koupele. Takto nízké snížení míry intenzity parazitů po léčebném zákroku se nepovažuje za dostatečně léčebně efektivní. Tato koncentrace neměla vliv na hematologický profil a nezpůsobila žádné histopatologické změny v tkáních, ale způsobila signifikantní změny v biochemickém profilu kapra obecného při 96hodinové expozici.

Testovaný přípravek na bázi cypermethrinu v koncentracích 45 a $13 \mu\text{g.l}^{-1}$ proti žábrolístům se jeví jako neperspektivní., protože jeho použití ve vyšších koncentracích k léčení parazitárních chorob je nebezpečné v důsledku vysoké toxicity a použití v nižších koncentracích je z hlediska léčebného efektu nedostatečné.

2. Aplikace přípravku na bázi deltamethrinu. V koncentraci $65 \mu\text{g.l}^{-1}$ při délce léčebné koupele 24 hodin a 5 hodin se snížila míra infekce žábrolísty o 42,2–66 %, ale během této léčebné koupele došlo k vysoké mortalitě ryb (42–80 %). Nebezpečnost této koncentrace pro ryby potvrdily i změny v hematologickém a biochemickém profilu kapra obecného. Tato koncentrace však nezpůsobila žádné histopatologické změny v tkáních kapra obecného. Při použití nižší koncentrace $19 \mu\text{g.l}^{-1}$ při délce koupele 5 hodin se intenzita parazitů snížila o 42,2 % s mortalitou 3 % během koupele. Toto snížení intenzity napadení žábrolísty lze už považovat za léčebně efektivní a tento léčebný postup by po opakovaném ověření mohl být doporučen k léčbě parazitárních onemocnění způsobených žábrolísty u plůdku kapra obecného. Terapeutický index je ale nízký (3,5), to znamená, že práh toxicity je blízko účinné léčebné dávce a při nedůsledné aplikaci zde hrozí riziko předávkování. V koncentraci $19 \mu\text{g.l}^{-1}$ neměl přípravek vliv na hematologický profil a nezpůsobil žádné histopatologické změny v tkáních, ale způsobil mírné změny v biochemickém profilu kapra obecného při 96hodinové expozici.

Přesné aplikační schéma pro ryby vykazující v důsledku infekce vyšší citlivost vůči pyrethroidům je předmětem dalšího testování. Předpokládáme, že opakovaně prováděné kratší expozice by mohly žábrolísty zcela eliminovat bez jakýchkoli ztrát ryb. S jistou modifikací by pak tato léčba byla využitelná i během krátkodobých transportů infikovaných ryb v přepravních nádobách.

3. Při aplikaci přípravků na bázi pyrethroidů k léčení parazitárních onemocnění ryb je potřeba dodržovat přesně dané postupy a koncentrace léčebné látky, a to z důvodu aplikace velice malých množství (terapeutický index 3,5), které v některých případech mohou být letální pro ryby napadené žábrolísty. Je vždy výhodnější volit větší objemy s nižší koncentrací účinné látky, aby nedošlo k náhlému střetu ryb s koncentrovanou látkou „toxickou vlnou“. Toto je možné považovat za nevýhodu, ale při obezřetné manipulaci a řádném proškolení aplikujícího personálu by toto negativum mělo být sníženo na minimum.

Literatura

- Boxaspen, K., Holm, J.C., 2001. The development of pyrethrum-based treatments against the ectoparasitic salmon lice *Lepeophtheirus salmonis* in sea cage rearing of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research* 32: 701–707.
- Kolářová, J., Svobodová, Z., 2009. Léčebné a preventivní postupy v chovech ryb. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 88, 29 s.
- Kolářová, J., Velíšek, J., 2012. Stanovení a vyhodnocení biochemického profilu krve ryb. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 135, 54 s.
- Registrované veterinární léčivé přípravky 2014: ÚSKVBL Brno, 1200 s.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Modrá, H., 2012. Metody hematologického vyšetřování ryb. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 122, 38 s.

Poděkování

Výsledky byly získány za finanční podpory MŠMT projektu CENAKVA I (CZ.1.05/2.1.00/01.0024) CENAKVA II (LO1205 v rámci programu NPU I), projektu GAJU 018/2014/Z a OP Rybářství CZ.1.25/3.4.00/12.00453.

TESTOVÁNÍ ÚČINNOSTI PRAZIQUANTELU PŘI LÉČBĚ VYBRANÝCH HELMINTÓZ RYB

Eliška Zusková, Josef Velíšek, Latifeh Chupani, Jana Máchová

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury biodiverzity a hydrocenóz, Fakulta rybářství a ochrany vod, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Vodňany, email: zuskova@frov.jcu.cz

Souhrn

*Cílem pokusu bylo ověření účinnosti antiparazitárního přípravku praziquantelu, podávaného v krmivu, na vývojová stadia motolice oční (*Diplostomum spathaceum*) u amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*). V rámci pokusu byly v provozních podmínkách rybářství Hluboká CZ s.r.o. provedeny 2 krmné testy – první v prostoru sádek, druhý na modelových rybníčcích, kde lze předpokládat výskyt mezihostitelů. Provozním testům předcházely laboratorní testy toxicity. Úplné vymizení metacerkárií motolic *Diplostomum spathaceum* bylo zaznamenáno u dvou testovaných skupin, kdy neúčinnější a ekonomicky nejefektivnější léčbou bylo šestinásobné opakované podávání 0,5% MK (medikované krmivo s obsahem PQ 1,25 g.kg⁻¹ krmiva) (obden) proložené 14ti denní pauzou, kdy bylo předkládáno jen krmivo KP1.*

Úvod

Zdravotní problematiku řeší téměř všichni chovatelé ryb. Někteří se přiklánějí k důslednější prevenci, na podkladě které pak mohou řadě závažných onemocnění předejít. V některých chovech však i zaběhnutá preventivní opatření ztrácí účinek, a to v důsledku narůstající rezistence patogenních činitelů a jejich rychlé adaptace ztíženým životním podmínkám. U parazitárních onemocnění dále často znesnadňují eradikaci složité vývojové cykly, kde nestačí eliminovat samotného parazita, ale je nutné se zaměřit i na mezihostitele, ve kterých probíhá část vývojového cyklu a kteří po dlouhou dobu zamořují chovné prostředí. Mezi častá parazitární onemocnění ryb, způsobující vysoké ztráty, patří helmintózy (infekce způsobené červy). Jedna z nejfrekventovanějších helmintóz je diplostomóza, infekce ryb vyvolaná vývojovými stadii motolic. Výskyt tohoto onemocnění může být limitní pro úspěšný odchov kvalitní násady.

V současné době nejsou k dispozici žádná registrovaná léčiva proti endoparazitům hospodářských ryb. Pro chovatelskou a veterinární praxi je zvláště citelná absence registrovaného léčiva proti tasemnicím a motolicím ryb. Chovatelé ryb používají necílová endoparazitika, nedostatečně ověřená na rybách, připravená dle receptu „magistra-liter“, nebo primárně určená jiným cílovým druhům zvířat (Kolářová a Nepejchalová, 2005).

Účinnost námi testovaného preparátu – praziquantelu, v boji proti helmintózám ryb, byla již prokázána v řadě publikací (Iles a kol., 2012; Sudová a kol., 2010; Voutilainen a kol., 2009). Mechanismus účinku tohoto léku spočívá v narušení neuromuskulárního systému parazita a zabránění přichycení tasemnice prostřednictvím háčků a přísavek k střednímu epitelu hostitele. Taktéž narušuje propustnost tegumentu parazita, což způsobuje nadměrné ztráty glukózy a umožňuje působení proteolytických enzymů. Účinné množství aplikovaného praziquantelu se pohybuje v širokém rozmezí 5–100 mg.kg⁻¹ ž. hm., podle druhu parazita (Trevés-Brown, 2000). Cílem naší práce bylo odzkoušet účinnost praziquantelu na vývojová stadia motolic a následně vytvořit vhodné aplikační schéma pro napadené ryby.

Materiál a metodika

Testy toxicity

Byly provedeny testy toxicity na vodních organismech (*Daphnia magna* a *Poecilia reticulata*). Jako testovaná látka byl použit přípravek praziquantel (praziquantel powder (C19H24N2O2 – Ecological Laboratories inc.). Testy byly prováděny dle směrnic OECD v laboratoři akreditované Českým institutem pro akreditaci o.p.s. pro testy akutní toxicity na vodních organismech. Metodicky bylo postupováno podle standardního operačního postupu, který vychází z norem:

- ČSN EN ISO 6341 Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea), OECD 202 Part 1 – the 24h EC 50 Acute Immobilisation Test
- ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod - Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby /(*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)/ Část 2: Obnovovací metoda a OECD 203 Fish, Acute Toxicity Test. Stanovení letální koncentrace (LC50) bylo provedeno probitovou analýzou s využitím počítačového programu EKO-TOX 5.1 (Ingeo Liberec, ČR).

Ověření účinnosti praziquantelu v provozních podmínkách

Ověření účinnosti praziquantelu k léčbě infekce způsobené parazitem *Diplostomum spathaceum* u amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*) bylo provedeno v provozních podmínkách rybářství Hluboká CZ s.r.o. Zde byly provedeny dva testy na rybách přirozeně infikovaných motolicí oční – první v prostředí sádek, druhý v prostředí modelových rybníčků, kde lze předpokládat výskyt mezipřenositelů. Před, po a v průběhu každého testu byla prováděna parazitologická vyšetření oka, kde byla hodnocena prevalence a intenzita infekce *Diplostomum spathaceum*.

Test 1

Celkem 2000 ks amura bílého (průměrná hmotnost 47 g) bylo rozesazeno do 10ti sádek, vždy 200 ks na sádku. Ryby byly po dobu 14 dní aklimatizovány a bylo jim předkládáno krmivo KP1 v množství 4% hmotnosti obsádky. Iniciálním parazitologickým vyšetřením 20 ks ryb byla v oční čočce u amurů zjištěna 100% prevalence metacerkárií *Diplostomum spathaceum*. Po aklimatizační době byly vždy 2 sádky tvořící jednu skupinu po dobu sedmi týdnů krmeny takto:

Skupina P1: obden KP1 + 1x týdně medikované krmivo (MK) s obsahem PQ 0,5% (4 dávky).

Skupina P2: obden KP1 + 1x týdně medikované krmivo s obsahem PQ 1% (4 dávky).

Skupina P3: obden KP1 + 4. týden testu obden medikované krmivo s obsahem PQ 0,5% (4 dávky).

Skupina P4: obden KP1 + 4. týden testu obden medikované krmivo s obsahem PQ 1% (4 dávky).

Skupina K: kontrolní skupina krmena obden KP1.

Krmné schéma bylo stanoveno na podkladě testů provedených ve výzkumném subjektu, kde bylo zjištěno, že dávka 50 mg.kg ž. hm⁻¹ je již účinná na tasemnici *Atractolytococestus huronensis*, patří rovněž mezi helmintózy, ale pro úplnou eradikaci by se měla opakovat. Parazitologické vyšetření bylo prováděno u skupin K, 1 a 2 vždy týden po aplikaci MK (bezprostředně před následujícím zakrmením MK) – tedy v týden č. 2, 3, 4 a 5. U skupin 3 a 4 bylo vyšetření provedeno den po aplikaci poslední, 4. dávky MK – tedy v týden č. 5. Všechny skupiny byly ještě jednou vyšetřeny 14 dní po poslední aplikaci (týden č. 7) s cílem zjistit, zda trend intenzity a prevalence přetrvával. Pro každé parazitologické vyšetření bylo odebráno

vždy 10ks ryb ze skupiny (5ks z každé sádky). Byla vyhodnocena prevalence (%) a intenzita (průměrný počet nalezených parazitů na rybu) infekce *Diplostomum spathaceum*.

Test 2

Celkem 60 000 ks Ab_0 bylo nasazeno do 4 parcelových rybníčků (cca 1,3 ha) v areálu Ostrov u obce Čejkovice. Po 30ti denní aklimatizaci ryb, během které si již přivykly na příjem krmiva KP1, bylo rybám předkládáno medikované krmivo s obsahem praziquantelu 1% a 0,5%, dle schématu uvedeného v tabulce 1. Rybám bylo předkládáno krmivo v množství 4% hmotnosti obsádky. Před první aplikací a na závěr testu (10 dní po poslední aplikaci MK) byla vyhodnocena prevalence a intenzita infekce metacerkárií *Diplostomum spathaceum* v oční čočce u 20ks amurů z každého rybníčka a na podkladě výsledků bylo zvoleno nejefektivnější aplikační schéma na likvidaci tohoto parazita.

Tab. 1. Schéma aplikace 0,5% a 1% MK a krmiva KP1 do rybníčků číslo 1–4.

č.	18.8	20.8	22.8	25.8	27.8	29.8	1.9	3.9	5.9	8.9	10.9	12.9	15.9	17.9	19.9	22.9	24.9	27.9
1	MK 1%	MK 1%	MK 1%	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1	MK 1%	MK 1%	MK 1%	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1
2	MK 5%	MK 5%	MK 5%	MK 5%	MK 5%	MK 5%	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1	MK 5%	MK 5%	MK 5%	MK 5%	MK 5%	MK 5%
3	MK 1%	MK 1%	MK 1%	MK 1%	MK 1%	MK 1%	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1	MK 1%	MK 1%	MK 1%	MK 1%	MK 1%	MK 1%
4	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1	KP1

Výsledky

Na podkladě provedených testů a z hlediska speciálních rizik lze praziquantel dle zákona č. 356/2003 Sb., o chemických látkách a přípravcích ve znění pozdějších předpisů a jeho prováděcí vyhlášky č. 389/2008 Sb. označit větou R52: škodlivý pro vodní organismy.

U testovaného organismu *Poecilia reticulata* byl testováním zjištěn vysoký terapeutický index praziquantelu vyjadřující měřítko bezpečnosti léčiva. Terapeutický index je poměr dávky léčebné látky, která vyvolává léčebný účinek, k dávce způsobující úhyn. Je výhodné mít u léčiva co nejvyšší terapeutický index (aby práh toxicity byl co nejvyšší oproti účinné léčebné dávce, a tím se minimalizovaly negativní účinky náhodného předávkování), což praziquantel bezvýhradně splňuje.

Test 1

Po aplikaci došlo k mírnému snížení parazitární prevalence u skupin P1 a P2, které je však pro účely eliminace infekce naprosto nedostačující. Perspektivněji se jeví intenzivní prokrmení ryb MK, kde po 4 dávkách došlo ke snížení prevalence u skupin P3 a P4 o 50% a 70%.

Test 2

Iniciální prevalence motolic dosahovala u všech rybníčků 10%. Intenzivní prokrmení MK 0,5 a 1% v šesti za sebou následujících dávkách se projevilo jako efektivní a likvidační pro metacerkárie motolice oční. Naproti tomu šest přerušovaných dávek pouze snížilo prevalenci, ale k úplné likvidaci parazita nestačilo. U kontrolní skupiny došlo během testu k úplnému rozvoji sledované infekce – prevalence 95%.

V prvním testu bylo jasně prokázáno, že týdenní interval aplikace PQ v krmivu je nevhodný a nezajistí adekvátní využití léčebné dávky, která je zapotřebí pro úspěšnou léčbu diplostomózy. I čtyřnásobná aplikace MK v 2 denních intervalech vedla jen ke snížení intenzity a prevalence infekce, ne však k úplné eliminaci parazitů. Medikované krmivo (MK) 0,5% a 1% má skutečné, navzdory klamnému procentuálnímu označení, udané množství účinné látky 1,25 a 2,5 g PQ/kg krmiva. Z toho plyne, že při dávce medikovaného krmiva 4% hmotnost obsádky ryby přijmou 50 a 100 mg PQ . kg ž.hm.⁻¹ (pro 0,5% a 1% medikované krmivo) při jednom krmení. Vzhledem k absenci mezihostitelů a tudíž snížené možnosti reinfekce v prostorách sádek, byla do dalšího pokusu v rybníčcích aplikace medikovaného krmiva zintenzivněna a rybám bylo předkládáno MK v 2-3 denních intervalech dle schématu uvedeného v tabulce 1. Při terénní léčbě je ještě nutné počítat s tím, že ryby v krmivu nepřijmou ideální terapeutickou dávku, která je pro léčbu důležitá, proto je nutné zajistit opakovanou aplikaci v rozmezí max. 2–3 dnů, aby dosažená plasmatická koncentrace léčebné látky nestačila v důsledku delšího prodloužení klesnout. Vzhledem ke spotřebě PQ byla rybám v rybníčcích 1, 2 a 3 předložena celková dávka PQ 600 mg.kg⁻¹ ž. hm. (1), 600 mg.kg⁻¹ ž. hm. (2) a 1200 mg.kg⁻¹ ž.hm. (3). Úplné vymizení metacerkárií motolic *Diplostomum spathaceum* bylo dosaženo u ryb z rybníčku 2 a 3, z čehož vyplývá, že nejúčinnější a ekonomicky nejefektivnější léčbou bylo šestinásobné opakované podávání (obden) 0,5% MK (!obsah PQ 1,25g.kg⁻¹ krmiva!), proložené 14denní pauzou, kdy bylo předkládáno jen krmivo KP1. Budeme-li vycházet z předpokladu, že všechny ryby z testu přijaly ideální množství MK, pak nevhodnější aplikační schéma pro eradikaci metacerkárií přepočteného na kg ž.hm. je: 6 x 50 mg.kg⁻¹ PQ (obden) – 14 dní pauza – 6 x 50mg.kg⁻¹ PQ (obden). Pro úspěch takto formulované léčby je zapotřebí, aby ryby přijímaly krmivo a v případě rybníků byly naučeny na krmené místo. Rovněž je nutno zmínit, že podávání PQ lze v ČR provádět u potravinových zvířat pouze v odůvodněných případech za kontroly veterinárního lékaře.

Literatura

- Iles, A.C., Archdeacon, T.P., Bonar, S.A., 2012. Novel Praziquantel Treatment Regime for Controlling Asian Tapeworm Infections in Pond-Reared Fish. *North American Journal of Aquaculture* 74: 113–117.
- Kolářová, J., Nepejchalová, L., 2005. The Process of the Application of European Union Pharmaco-vigilance Regulation in the Conditions of Aquacultures in the Czech Republic. *Folia Veterinaria* 49: 77–81.
- Sudová, E., Piačková, V., Velíšek, J., Pijáček, M., Svobodová, Z., 2010. Efficacy Testing of Orally Administered Praziquantel to Common Carp Naturally Infected by Caryophyllidean Tapeworms (Platyhelminthes: Eucestoda). *Acta Veterinaria Brno* 79: S73–S78.
- Treves-Brown, K.M., 2000. *Applied Fish Pharmacology*. Kluwer Academic Publishers, London, UK, 309 p.
- Voutilainen, A., Saarinen, M., Suonpaa, A., Taskinen, J., 2009. In vitro efficacy of praziquantel against the cercariae of *Diplostomum* sp., *Rhipidocotyle fennica* and *R-campanula*. *Journal of Fish Diseases* 32: 907–909.

Poděkování

Výsledky byly získány za finanční podpory MŠMT projektu CENAKVA I (CZ.1.05/2.1.00/01.0024), projektu CENAKVA II (LO1205 v rámci programu NPU I), projektu GAJU 018/2014/Z a OP Rybářství CZ.1.25/3.4.00/12.00453.

MOŽNOSTI LÉČBY PARAZITÓZ V CHOVECH RYB V ČR

Jitka Kolářová¹, Leona Nepejchalová²

¹Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Vodňany e-mail: kolarova@frov.jcu.cz

²Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Brno, e-mail: nepejchalova@uskvbl.cz

V ČR není zaregistrován žádný antiparazitární veterinární léčivý přípravek pro potravinové ryby a veterinární lékař v terénu musí velmi často používat léčiva „off label“. Cílem příspěvku je poskytnout přehled o možnostech léčby parazitóz ryb především v produkčních chovech v České republice.

U ryb určených k lidskému konzumu (potravinových ryb) je možné v rámci celé EU, ČR nevyjímaje, použít k léčbě pouze veterinární léčivé přípravky, jejichž farmakologicky účinné látky jsou klasifikovány z pohledu maximálních limitů reziduí podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 470/2009, to znamená, že jsou zařazeny do přílohy 1 nařízení Komise (EU) č. 37/2010. Jednorázově lze dovézt a použít v množství potřebném k léčbě jednoho případu u nás neregistrovaná léčiva, která jsou však registrována pro ryby v jiných státech EU. Pro takový dovoz je nutné žádat o výjimku Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv (ÚSKVBL). V odůvodněných případech mohou veterinární lékaři na vlastní odpovědnost aplikovat „off label“ léčivý přípravek určený pro jiný druh zvířete či pro jinou indikaci nebo léčivo humánní, případně léčivo připravené dle receptu „magistraliter“. Pokud takovýto přípravek bude použit pro chov potravinových ryb, je nutné dodržet „standardní“ ochrannou lhůtu (OL), tzn. nejméně 500 stupňodnů (Z. č. 166/1999 Sb.). Použití veterinárního léčivého přípravku neregistrovaného v EU a povolení dovozu se provádí prostřednictvím žádosti o výjimku u Státní veterinární správy ČR, jak je upraveno zákonem č. 378/2007Sb. § 9 (následně § 46) a zákonem č. 166/1999 Sb. § 19. Jednodušší situace je při ošetřování v zájmových chovech ryb (akvarijní a okrasné ryby). Za účelem léčby je zde možné použít léčivé přípravky, které nemají stanoven maximální limit reziduí (MRL).

V chovech ryb přicházejí v úvahu tři způsoby aplikace antiparazitik:

1. Aplikace léčebných látek do vodního prostředí (léčebné koupele ryb) se provádí při zejména při diagnostice ektoparazitóz – léčebná látka působí na infekci na zábrách a kůži, ale léčivo se může zároveň vstřebávat kůží a žábry do těla ryby a působit také na endoparazitární infekci. Při léčebné koupeli je dobře zajištěno dávkování a skutečnost, že se léčebná látka dostane ke všem kusům ryb stejně. Problémem ve vztahu k životnímu prostředí je likvidace léčebných koupelí.
2. Perorální aplikace – provádí se podáváním léčebných látek v krmivu (medikovaná krmiva), případně aplikací pomocí sondy zavedené do jícnu ryby. Tento způsob aplikace je zaměřen především na léčbu endoparazitóz. Medikovaný premix s obsahem antiparazitika pro ryby není v ČR registrován, a tak se používají pro výrobu medikovaného krmiva buď premixy s povolenou výjimkou (SVS, ÚSKVBL), nebo se medikace provádí „off label“ přímo na místě chovu ryb obsluhujícím personálem, který krmivo připravuje podle instrukcí veterinárního lékaře. Při této aplikaci není zajištěno stejné dávkování jednotlivým rybám a také se často stává, že nemocné ryby již nepřijímají potravu. Výrazně spolehlivější aplikace léčiv v krmivu

je u lososovitých ryb, které přijímají aplikované krmivo ihned u hladiny, na rozdíl od ryb kaprovitých, které sbírají potravu ležící na dně nádrže.

3. Injekční aplikace léčebných látek se při léčbě parazitárních onemocnění používá jen zřídka. Tato aplikace je nejpřesnější, ale zároveň nejkomplicovanější vzhledem k nutné manipulaci s rybami, která je pro ně stresující. U ryb se antiparazitika tímto způsobem aplikují pouze ve výjimečných případech, vždy „off label“, a to do dutiny tělní (intraperitoneálně) nebo intramuskulárně do hřbetní svaloviny.

Možnosti antiparazitární léčby ryb v ČR

V ČR není k dispozici žádný registrovaný antiparazitární léčivý přípravek pro ryby. Přitom zdolání některých parazitárních infekcí bývá limitujícím faktorem zejména při odchovu juvenilních stádií ryb. Veterinární lékař může použít pouze léčivý přípravek povolený na výjimku (SVS, ÚSKVBL), což je v současnosti Prazicest (účinná látka praziquantel, medikovaný premix vyráběný na výjimku SVS Pharmagalem), nebo pak léčivo „off label“ s nařízením ochranné lhůty minimálně 500 stupňodňů.

Na základě povolení výjimky ÚSKVBL lze jednorázově dovézt a použít antiparazitární léčivý přípravek registrovaný pro ryby v jiné zemi EU (Tab. č. 1).

Litera zákona však umožňuje použití nejrůznějších látek (přípravků), které nespádají do kategorie léčivých přípravků a mají také prokázaný antiparazitární účinek. Jedná se zejména o nejrůznější desinfekční látky, které se používají formou koupele (kuchyňská sůl, hypermangan, jodové preparáty, kyselina peroctová – peroxid vodíku, chloramin T, formaldehyd, akriřlavin apod), vždy je však třeba ověřit, jak jsou klasifikovány z hlediska setrvávání možných reziduí v tkáních ošetřených ryb (nařízení č. 37/2010). Bezpečností jejich podání rybám a jejich ekotoxikologickými efekty se dlouhodobě zabývají pracovníci VÚRH Vodňany.

Poděkování

Tato práce byla provedena za finanční podpory MŠMT projektu CENAKVA (CZ.1.05/2.1.00/01.0024), projektu CENAKVA II (LO1205 v rámci programu NPU I) a GACR P503/11/1130

Tab. 1. Přehled léčivých antiparazitárních přípravků pro ryby registrovaných v některých zemích EU (2015).

název	účinná látka	výrobce	indikace	OL
ALPHA MAX	deltamethrin (10 mg.m ⁻¹)	Pharmaq, NO	koryš tř. <i>Copepoda Lepeophtherius salmonis</i> (sea lice)	5 stupňodnů
BETAMAX vet.	cypermethrin (50 mg.m ⁻¹)	Novartis Animals Vaccines Ltd., UK	koryš tř. <i>Copepoda Lepeophtherius salmonis</i> (sea lice)	20 stupňodnů
CALICIDE premix	teflubenzuron (1000g.kg ⁻¹)	Trow Ltd., UK	koryš tř. <i>Copepoda Lepeophtherius salmonis</i> (sea lice)	7 dní
EKTOBANN vet. sol.	teflubenzuron (50 mg.m ⁻¹)	Skretting AS, NO	koryš tř. <i>Copepoda Lepeophtherius salmonis</i> (sea lice)	96 stupňodnů
EXCIS sol.	cypermethrin (10 mg.m ⁻¹)	Novartis Animal Health UK Ltd	koryš tř. <i>Copepoda Lepeophtherius salmonis</i> (sea lice)	24 hod po posledním podání
PARAMOVE konc.	peroxid vodíku (49,5% w/w)	Solvay Chemicals International, UK	koryš tř. <i>Copepoda Lepeophtherius salmonis</i> (sea lice) nebo <i>Caligus</i>	bez OL
RELEEZE (dříve Lepsidon) vet. medik. pelety	diflubenzuron (0,6 g.kg ⁻¹)	EWOS, NO	koryš tř. <i>Copepoda Lepeophtherius salmonis</i> (sea lice)	105 stupňodnů
SALMOSAN plv.	azamethiphos (50% w/w)	Novartis Animal Health UK Ltd	koryš tř. <i>Copepoda L. salmonis</i> (sea lice)	24 hod
SLICE premix pro lososa	emamektin-benzoát (2mg.g ⁻¹ KD) (odpovídá 1,76 mg emamektinu)	Schering-Plough Animal Health	koryš tř. <i>Copepoda L. salmonis</i> (sea lice)	60 dní po posledním ošetření
SLICE premix pro pstruha duhového	emamektin-benzoát (2mg.g ⁻¹ KD) (odpovídá 1,76 mg emamektinu)	Schering-Plough Animal Health	koryš tř. <i>Copepoda L. salmonis</i> (sea lice)	372 stupňodnů

ZNEČIŠTĚNÍ VODNÍHO PROSTŘEDÍ CIZORODÝMI LÁTKAMI A JEJICH VLIV NA VODNÍ ORGANISMY

Tomáš Randák, Roman Grabic, Vladimír Žlábek

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Vodňany, e-mail: randak@frov.jcu.cz

Souhrn

Tento příspěvek je zaměřen na identifikaci hlavních zdrojů znečištění vodního prostředí České republiky cizorodými látkami, následně je nejvíce rozvíjena problematika spojená se znečištěním pocházejícím z komunálních odpadních vod. I když je v naší republice většina těchto odpadních vod čištěna v čistírnách odpadních vod (ČOV), neznamená to, že v procesu čištění dojde k odstranění všech cizorodých látek. Bylo prokázáno, že přes tyto technologie prochází široké spektrum chemických sloučenin, které člověk každodenně používá (např. farmaka a další chemikálie pro osobní potřebu člověka – Pharmaceuticals and Personal Care Products – PPCP), a které finálně kontaminují vodní prostředí, kde mohou ovlivňovat přítomné organismy. Identifikovat ty nejnebezpečnější sloučeniny z hlediska negativního působení na necílové organismy je velmi složité. Na organismy v prostředí totiž nepůsobí cizorodé látky jednotlivě, ale v celém komplexu, vzniká tzv. „koktejl“ efekt. Intenzita působení tohoto „koktejlu“ na exponované organismy závisí na finálních koncentracích přítomných sloučenin ve složkách vodního prostředí po naředění výtoků z ČOV vodou toku či nádrže (tzv. recipientů), do kterých jsou tyto výtoky zaústěny. Z hlediska negativních vlivů na vodní organismy není nejhorší situace pod velkými aglomeracemi nacházejícími se na velkých tocích, ale pod běžnými obcemi situovanými na malých tocích, kde podíl „vyčištěných“ odpadních vod představuje více než cca 10–15 % celkového průtoku daného recipientu.

Přítomnost cizorodých látek ve vodním prostředí je významným faktorem ovlivňujícím zdravotní stav ryb a dalších vodních organismů, jejich přirozenou reprodukci i chování. Spektrum chemických látek, které člověk vyrábí a používá, se neustále rozšiřuje. V současné době je běžně používáno kolem 100 000 chemických látek a většina z nich se nějakým způsobem dostane i do životního prostředí. V minulosti se na znečišťování vodního prostředí nejvíce podílela průmyslová výroba, ze které se do toků dostávala řada chemických sloučenin – např. toxických kovů (Hg, Cd, Pb atd.), i organických polutantů (PCB, HCB, PCDD/F, PAH). Díky zavedení dokonalejších čistírenských technologií, zákazu výroby a používání řady nebezpečných látek došlo k významnému omezení tohoto typu znečištění. Problémem je spíše dlouhodobé přetrvávání (tzv. perzistence) většiny těchto sloučenin v životním prostředí a tedy i možnost jejich negativního působení (zejména prostřednictvím potravních řetězců) na exponované organismy. Např. z hlediska konzumace masa ryb z volných vod jsou stále problematické zvýšené koncentrace rtuti v rybách v některých lokalitách ČR – především v nádrži Skalka a na středním toku řeky Labe (Červený a kol., 2014).

Významným zdrojem znečištění vodního prostředí je i zemědělská výroba. Kromě splachůrné půdy, havárií souvisejících s aplikacemi kejdý či úniky silážních šťáv, to v minulosti bylo zejména nadměrné využívání průmyslová hnojiv (často kontaminovaných např. kadmíem) a perzistentních pesticidů (např. HCH, DDT). V současné době se sice používají moderní pesticidy, které jsou poměrně rychle odbouratelné, nicméně i rezidua těchto pesticidů a jejich metabolitů jsou velmi často nacházena jak v povrchových, tak i v podzemních vodách. Výskyt

reziduí pesticidů ve vodách představuje v současnosti významný problém, a to dokonce i na vodárenských nádržích. I v bezprostředním okolí vodních zdrojů je často provozována intenzivní zemědělská výroba využívající aplikaci pesticidů. Tyto látky a jejich metabolity pak často procházejí i technologií úpravy pitné vody a nalézáme je tedy i v pitné vodě.

Významným zdrojem znečištění vodního prostředí cizorodými látkami jsou komunální odpadní vody. V důsledku plošné výstavby čistíren odpadních vod (ČOV) se sice výrazně zlepšila kvalita vody v našich tocích, především však z hlediska zatížení organickými látkami a živinami, nikoli však z pohledu kontaminace chemickými látkami a jejich vlivu na necíleně exponované organismy. I v našich podmínkách bylo prokázáno, že stávající čistírenské technologie nedokáží zcela eliminovat široké spektrum potenciálně biologicky aktivních sloučenin (Golovko a kol., 2014). Tyto sloučeniny, mezi které řadíme především humánní a veterinární léčiva (hormonální přípravky, léky na snižování vysokého krevního tlaku, antibiotika, antidepresiva, analgetika, antirevmatika, antiepileptika, statiny atp.), složky kosmetických přípravků, parfémy, saponáty, atp., a jejich degradační produkty či metabolity, se prostřednictvím „vyčištěných“ odpadních vod vypouštěných z ČOV dostávají do vodního prostředí, kde mohou ovlivňovat přítomné organismy. Osud těchto sloučenin v technologiích ČOV není ještě dostatečně prozkoumán. Část z nich je deponována v čistírenských kalech, část přeměněna ve stupni biologického čištění, ale naopak, některé sloučeniny jsou uvolňovány do vody v aktivní formě v důsledku rozrušení jejich obvykle biologicky neaktivních komplexů v organické hmotě. Z hlediska populací ryb ve volných vodách již samo téměř úplné odstraňování nutrientů – a především dusíku v technologiích ČOV není zcela ideální řešení. V mnoha tocích výrazně poklesla jejich úživnost, což se promítlo i ve významném snížení biomasy ryb v těchto tocích a zpomalení jejich růstu. Významné snížení trofie je považováno v současné době i za jeden z klíčových faktorů poklesu populací lososovitých ryb v pstruhových vodách. Odstranění živin, či lépe řečeno vytváření živinové nerovnováhy (běžně čističky eliminují dusík, ale nedokáží již tak úspěšně eliminovat fosfor), nutně musí ovlivňovat nejen ryby, ale samozřejmě i nižší organismy a mikroorganismy tvořící klíčové složky potravních řetězců ve vodním prostředí. Velmi pravděpodobně jsou také ovlivněny i tzv. samočistící procesy, které ve vodním prostředí, a zejména v recipientech odpadních vod, probíhají.

Organismy žijící v recipientech „vyčištěných“ odpadních vod jsou dále vystaveny působení širokého spektra sloučenin, což je spojeno s výskytem negativních účinků, které se u těchto organismů mohou projevat. Bylo již publikováno mnoho studií popisujících negativní vlivy výskytu PPCP v životním prostředí. Nejvíce publikací je zaměřeno na farmaka, což jsou obecně biologicky vysoce účinné látky ovlivňující organismy již ve velmi nízkých koncentracích. Mezi biologicky nejvíce účinné patří steroidní léčiva (např. 17β -estradiol (E2), 17α -ethinylestradiol (EE2), diethylstilbestrol (DES) atp.). Tato farmaka jsou z hlediska jejich působení na necílové organismy řazena do skupiny tzv. endokrinních disruptorů (EDCs), což znamená, že v těle organismů narušují přirozené hormonální funkce. V humánní medicíně se steroidní hormony využívají k léčbě hormonálních poruch, syntetické steroidy jsou běžně předepisovány jako orální antikoncepce. V největších koncentracích jsou steroidní látky obvykle nalézány v komunálních odpadních vodách, ale i ve výtocích z ČOV a v nízkých koncentracích (řádově v jednotkách $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$) jsou detekovány i v povrchových vodách (Kolpin, 2002). Ve vodních ekosystémech mohou tyto látky negativně působit na úspěšnost reprodukce vodních organismů a krajním projevem přítomnosti např. látek s estrogením účinkem může být až feminizace samců a vznik hermafroditismu. Přestože běžně dostupné technologie čištění odpadních vod do značné míry hladiny steroidních látek redukuje, konečná koncentrace těchto látek přesto může snadno překračovat koncentrace, při nichž lze předpokládat negativní vliv na exponované organismy, zejména ryby. V případě 17β -estradiolu byly příznaky feminizace pozorovány dokonce již při koncentracích nižších než $1 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ (Dorabawilla a Gupta, 2005). Další

skupinou látek, které mohou potenciálně ovlivňovat vodní organismy, jsou tzv. psychoaktivní sloučeniny. Do této skupiny zahrnujeme např. léky proti depresivním stavům (antidepresiva), léky proti epilepsii (antiepileptika), léky proti bolesti (analgetika), atp. Je možné sem zařadit i drogy. Výskyt těchto látek byl prokázán v různých složkách vodního prostředí – jak ve vodě, tak v potravním řetězci (Fedorová a kol., 2014; Grabicová a kol., 2014a,b). Tyto látky mají schopnost ovlivňovat chování exponovaných organismů. Např. Brodin a kol. (2013) prokázali vliv reálných koncentrací oxazepamu vyskytujících se v říční vodě na sociální chování okouna říčního. V důsledku působení těchto látek mohou např. ryby ztrácet plachost, či může docházet ke snižování rychlosti jejich reakce na predátory.

Je zřejmé, že i zdánlivě bezvýznamné zdroje znečištění, jako jsou ČOV běžných obcí, významně zatěžují vodní prostředí biologicky aktivními cizorodými sloučeninami. Vliv těchto sloučenin na vodní organismy narůstá se snižujícím se naředěním vypouštěných vod z ČOV vodou toku, do kterého jsou zaústěny. Jak vyplývá z dosavadních sledování – nejhorší situace tedy není – jak by se mohlo na první pohled zdát – na dolních tocích velkých řek (např. ve Vltavě pod Prahou), ale na menších tocích, kde jsou nižší průtoky a voda vypouštěná do nich z ČOV se tam ředí méně (Li a kol., 2011). Identifikovat ty sloučeniny, které jsou zodpovědné za nejvýznamnější z hlediska účinku na exponované organismy, je velice složité. Jednotlivé sloučeniny nepůsobí individuálně, ale ve směsi – výsledkem je tzv. „koktejl“ efekt, tzn. celkový vliv přítomného znečištění na organismus v kontextu dalších biotických a abiotických faktorů působících v konkrétní lokalitě. Tento komplexní vliv prakticky není možné studovat v laboratorních podmínkách. Aby bylo možno podchytit a pochopit celkový vliv tohoto typu znečištění na vodní ekosystémy, je nutno tuto problematiku studovat v reálných podmínkách a co nejkompexněji.

Závěr

Působení různých dosud minimálně sledovaných biologicky účinných sloučenin vstupujících do vodního prostředí prostřednictvím byt vyčištěných komunálních odpadních vod je ve světě v současnosti předmětem intenzivního výzkumu. Je pravděpodobné, že právě tyto dosud opomíjené skupiny látek působí na vodní organismy významněji, než neustále se snižující koncentrace běžně sledovaných průmyslových polutantů.

Literatura

- Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., Klaminder, J., 2013. Dilute Concentrations of a Psychiatric Drug Alter Behavior of Fish from Natural Populations. *Science* 339: 814–815.
- Cervený, D., Zlabek, V., Velisek, J., Turek, J., Grabic, R., Grabicová, K., Fedorová, G., Rosmus, J., Lepic, P., Randák, T., 2014. Contamination of fish in important fishing grounds of the Czech Republic. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 109: 101–109.
- Dorabawila, N., Gupta, G., 2005. Endocrine disrupter – estradiol – in Chesapeake Bay tributaries. *Journal of Hazardous Materials* 120: 67–71.
- Fedorová, G., Randák, T., Golovko, O., Kodeš, V., Grabicová, K., Grabic, R., 2014. A passive sampling method for detecting analgesics, psycholeptics, antidepressants and illicit drugs in aquatic environments in the Czech Republic. *Science of the Total Environment* 487: 681–687.
- Golovko, O., Kumar, V., Fedorová, G., Randák, T., Grabic, R., 2014. Removal and seasonal variability of selected analgesics/anti-inflammatory, anti-hypertensive/cardiovascular pharmaceuticals and UV filters in wastewater treatment plant. *Environmental Science and Pollution Research* 21: 7578–7585.

- Grabicova, K., Grabic, R., Bláha, M., Kumar, V., Červený, D., Fedorova, G., Randák, T., 2014a. Presence of pharmaceuticals in benthic fauna living in a small stream affected by effluent from a municipal sewage treatment plant, *Water Research*, DOI: 10.1016/j.watres.2014.09.018 (in press)
- Grabicová, K., Lindberg, R.H., Östman, M., Grabic, R., Randák, T., Larsson, D.G.J., Fick, J., 2014b. Tissue-specific bioconcentration of antidepressants in fish exposed to effluent from a municipal sewage treatment plant. *Science of the Total Environment* 488–489: 46–50.
- Kolpin, D.W., 2002. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams 1999–2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science and Technology* 36: 1202–1211.
- Li, Z.H., Žlábek, V., Turek, J., Velíšek, J., Pulkrabová, J., Kolářová, J., Sudová, E., Beránková, P., Hrádková, P., Hajšlová, J., Randák, T., 2011. Evaluating environmental impact of STPs situated on streams in the Czech Republic: An integrated approach to biomonitoring the aquatic environment. *Water Research* 45: 1403–1413.

Poděkování

Výsledky byly získány za finanční podpory MŠMT projektu CENAKVA (CZ.1.05/2.1.00/01.0024) a projektu CENAKVA II (LO1205 v rámci programu NPU I).

ÚHYN RYB V RYBNÍCE JAKO DŮSLEDEK DEFICITU KYSLÍKU – POPIS PŘÍPADU (ŘÍJEN 2014)

Marie Ševčíková¹, Zdeňka Svobodová¹, Richard Faina²

¹Ústav veřejného veterinářství, ochrany zvířat a welfare, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno,
e-mail: sevcikovam@vfu.cz; svobodovaz@vfu.cz

²ENKI O.P.S., Třeboň, e-mail: faina@enki.cz

Souhrn

V měsíci říjnu 2014 došlo na rybníce v obci Poštorná (okres Břeclav) k hromadnému úhynu ryb. Při místním šetření byla naměřena kritická hodnota kyslíku ve vodě 0,3 mg.l⁻¹. I přes snahu zvýšit koncentraci kyslíku ve vodě provzdušňováním a přítokem z druhého rybníka, se hodnota kyslíku pohybovala v rozmezí 3,2–4,6 mg.l⁻¹. Všechny dravé druhy ryb v rybníce uhynuly během několika málo dnů. Fyzikálně chemický rozbor vody prokázal vyšší obsah organických látek, přítomnost jedinců hrubého zooplanktonu (*Daphnia* sp.) a snížené množství jednobuněčných zelených řas. Situaci vyřešila až jednorázová aplikace superfosfátu pro podporu rozvoje fytoplanktonu. Kyslíkové poměry se v rybníce upravily až na konci listopadu 2014. Deficit kyslíku byl pravděpodobně způsoben kombinací několika faktorů, a to především přemnožením hrubého zooplanktonu a nedostatkem disponibilního fosforu pro fytoplankton.

Úvod

Deficit kyslíku je častou příčinou úhynu ryb v rybnících a pro chovatele představuje vysoké ekonomické ztráty. Příčinou snížené koncentrace kyslíku ve vodě je nejčastěji velké množství snadno rozložitelných organických látek, nedostatečný přístup světla na hladinu či přítomnost nadměrného množství filtrujícího zooplanktonu. Především v jarních a letních měsících dochází v eutrofních a hypertrofních rybnících k přemnožení hrubého zooplanktonu za současného poklesu koncentrace fytoplanktonu a tedy i poklesu intenzity fotosyntézy a produkce kyslíku. Pokles fytoplanktonu může být způsoben také snížením koncentrace dostupného fosforu (Faina a kol., 2011). Pokud není situace nijak řešena, kyslíkový deficit se prohlubuje a může docházet k masivním úhynům ryb. V případě narůstajícího deficitu kyslíku se doporučuje zvýšit přítok vody, zastavit příkrmování ryb, instalovat aerační systémy, případně v opodstatněných případech použít fosforečná hnojiva. V minulých letech bylo také možné v kritických situacích aplikovat biocidní přípravky (Soldep, Diazinon 60 EC) pro potlačení nadměrného množství hrubého zooplanktonu. Bohužel v dnešní době není žádný takový biocidní přípravek v České republice registrován a tedy ani povolen k použití (Svobodová a kol., 2008).

Popis případu

K úhynu ryb došlo na rybníce v obci Poštorná (okres Břeclav). Jednalo se o soustavu dvou rybníků se smíšenou rybí obsádkou. Do menšího rybníka (2 486 m²) vede přítok z potoka Včelínek, menší rybník je s druhým větším (6 416 m²) spojen podzemním potrubím. Průměrná hloubka v obou rybnících je přibližně 1,5 m. Dalším zdrojem vody v rybnících je několik drobných prameništ podzemní vody, které byly objeveny při posledním kompletním čištění rybníků. Oba rybníky byly před čtyřmi lety zcela vypuštěny, odbahněny a opětovně napuštěny. Rybníky slouží k rekreačním účelům. Kromě ryb se zde vyskytuje několik kusů labutí, hus a kachen. Celý areál je oplocen. V době úhynu se zde vyskytovaly tyto druhy ryb: štika obecná, bolen

dravý, candát obecný, jeseter velký, kapr obecný, lín obecný, amur bílý a karas obecný. Ryby jsou pravidelně v malém množství přikrmovány namočeným obilím. Původ ryb je Rybníkářství Pohořelice. V okolí rybníků se nachází několik různých druhů stromů a travnatá plocha, které jsou pravidelně udržovány.

Dne 20. října 2014 ráno byly při náhodné kontrole pozorovány první uhynulé ryby, jednalo se o štiky obecné. Zároveň majitelé pozorovali kapry u hladiny, lapající po dechu a další štiky apaticky plující u břehu. Kamenné břehy rybníku, které jsou normálně potažené zeleným nánosem, měly hnědou barvu. Problém se týkal pouze většího rybníku, na menším nebyly pozorovány žádné abnormality ani úhyny. Majitelé okamžitě změřili koncentraci kyslíku ve vodě. V menším rybníce byla naměřena koncentrace kyslíku 12–15 mg.l⁻¹, ve větším kritická hodnota 0,3 mg.l⁻¹. Byly odebrány vzorky vody z obou rybníků a byly zaslány do laboratoře Brněnských kanalizací a vodáren s požadavkem vyšetření fyzikálně-chemických parametrů vody. Výsledky jsou zobrazeny v Tab. 1. Jako okamžité opatření pro zvýšení obsahu kyslíku ve větším rybníce byl zvýšen přítok vody z menšího rybníka. Zároveň bylo upraveno přečerpávání vody tak, aby docházelo k lepšímu prokysličování vody a byla zapojena i dmýchadla. Ještě ten stejný den večer už nebyli pozorováni kapři u hladiny, nicméně k hladině postupně vyplavávaly mrtvé kusy dravých druhů ryb. V následujících 7 dnech došlo k úhynu v podstatě celé obsádky všech druhů dravých ryb. Větší rybník byl postupně vypuštěn o 35 cm a doplněn vodou z menšího rybníka. Provdzdušňováním a neustálým doplňováním vody ve větším rybníce se zde podařilo zvýšit koncentraci kyslíku na 3,2–4,6 mg.l⁻¹.

Úhynům nepředcházela žádná výrazná zásah do ekosystému rybníků, pouze před 14 dny byly oba rybníky vápněny chloraminem v doporučené dávce, stejně jako v minulých letech a došlo k ořezu některých stromů na březích. Ryby byly kontrolovány naposledy 18. 10. 2014, kdy se majitelům zdálo, že méně přijímají nabízenou potravu. Incidentu nepředcházela ani žádná výrazná změna počasí.

Tab. 1. Výsledky fyzikálně-chemického vyšetření vody z obou rybníků.

Ukazatel	Větší rybník	Menší rybník
BSK ₅ (mg.l ⁻¹)	23	12
CHSK _{Cr} (mg.l ⁻¹)	60	51
pH	7,18	7,71
KNK _{4,5} (mmol.l ⁻¹)	3,71	2,75
NH ₄ ⁺ (mg.l ⁻¹)	< 0,10	2,09
NO ₃ ⁻ (mg.l ⁻¹)	0,24	< 0,20
NO ₂ ⁻ (mg.l ⁻¹)	0,04	< 0,02
PO ₄ ³⁻ (mg.l ⁻¹)	0,54	< 0,05
P-PO ₄ ³⁻ (mg.l ⁻¹)	0,18	< 0,02
Mn (mg.l ⁻¹)	0,17	< 0,02
počet jednobuněčných zelených řas (jedinci/ml)	880	7 600
abioseston %	3	3
<i>Daphnia</i> sp.	+	-

Na základě fyzikálně-chemického rozboru vody bylo vysloveno podezření, že příčinou kyslíkového deficitu je přemnožení hrubého dafniového zooplanktonu a jeho predace

na fytoplanktonu. Jako vhodné řešení situace se jevílo použití superfosfátu pro podporu růstu fytoplanktonu. S aplikací superfosfátu se však muselo počkat zhruba jeden týden kvůli ochlazení. Superfosfát byl aplikován jednorázově na začátku listopadu 2014 v rozpuštěné formě z lodky v dávce 6 mg.l^{-1} . Koncentrace kyslíku se ve vodě zvyšovala postupně. Na konci měsíce listopadu již byly hodnoty srovnatelné v obou rybnících (cca 12 mg.l^{-1}). Také kamenné břehy většího rybníku se opět zbarvily do zelena.

Diskuze

K přemnožení zooplanktonu dochází typicky především na jaře a v létě z důvodu vysokého obsahu živin a následného rozvoje fytoplanktonu. Pokud rybí obsádka není optimální, nestačí redukovat narůstající zooplankton a může tak dojít k jeho přemnožení za současného poklesu koncentrace fytoplanktonu. V popisovaném případě však k přemnožení zooplanktonu došlo netypicky na podzim. Nicméně průměrné denní teploty zejména v první polovině měsíce října byly v dané lokalitě nadstandardně vysoké ($14,8 \pm 1,3 \text{ }^\circ\text{C}$).

Další příčinou snížené koncentrace fytoplanktonu mohl být nedostatek disponibilního fosforu, který nemusí být odhalen ani stanovením fosforečnanů při chemickém rozboru vody. V řadě případů bylo prokázáno, že fosfor v podobě fosforečnanů i v relativně vysoké koncentraci (setiny až desetiny $\text{mg.l}^{-1} \text{ P-PO}_4^{3-}$), není z nějakého důvodu dostupný pro přítomný fytoplankton (Faina a kol., 2011). Tuto domněnku potvrzuje i fakt, že po aplikaci superfosfátu došlo k úpravě koncentrace kyslíku v postiženém rybníce. Jako další přitěžující okolnost může být zvažováno vápnění rybníků 14 dní před prvními úhyny a určité organické znečištění vody při ořezu okolních stromů.

V popisovaném případě bylo k aplikaci superfosfátu přistoupeno až po selhání jiných metod. Rozhodně by se k ní nemělo přistupovat paušálně a preventivně. Účinnosti této metody v našem případě napomohlo i přetrvávající na podzim poměrně teplé počasí, které představovalo dobré podmínky pro rozvoj fytoplanktonu. Je třeba také zdůraznit, že i když se jedná o aplikaci nízkých dávek fosforečného hnojiva, jedná se o opatření, jehož použití upravuje Zákon č. 254/2001 Sb. o vodách, ve znění pozdějších předpisů (§ 39, Příloha I).

Závěr

Příčinou úhynu ryb byl kritický deficit kyslíku, k němuž pravděpodobně došlo kombinací několika faktorů, které samy o sobě nepředstavovaly vážnou hrozbu, ale dohromady způsobily úhyn všech dravých druhů ryb v rybníce.

Literatura

Faina, R., Máchová, J., Valentová, O., 2011. Možnosti řešení kritických deficitů kyslíku v rybníčním chovu ryb pomocí aplikace nízké dávky superfosfátu. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 116, 14 s.

Svobodová, Z. Máchová, J., Kroupová, H., 2008. Otravy ryb, Veterinární toxikologie v klinické praxi, Profi Press, Praha, s. 201–217.

Zákon č. 254/2001 Sb., o vodách, ve znění pozdějších předpisů.

Poděkování

Autoři děkují manželům Chytkovým, majitelům postiženého rybníka, za ochotu a poskytnutí podrobných informací k případu.

ZAVZDUŠNĚNÁ VODA JAKO PŘÍČINA ÚHYNU RYB

Jana Máchová, Tomáš Randák, Richard Faina, Olga Valentová, Christoph Steinbach

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity a hydroceóz, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Vodňany, e-mail: jmachova@frov.jcu.cz

Souhrn

V předložené práci jsou shrnuty poznatky místního šetření, které bylo provedeno v souvislosti s opakovanými úhyny lososovitých ryb (siven americký a pstruh duhový o hmotnosti 100 až 150 g) v nově instalovaných kruhových nádržích, které byly napájeny vodou ze stejného zdroje, jako původní venkovní nádrž rybníčního charakteru, kde odchov ryb probíhal bez problémů. Při místním šetření bylo zjištěno, že příčinou úhynů ryb bylo výrazné zavzdušnění vody a s tím související nasycení vody kyslíkem (136 %). Příčina úhynu byla potvrzena mikroskopickým vyšetřením žaber uhynulých ryb, při kterém byla prokázána přítomnost vzduchových bublin uvnitř žaberních lístků i na jejich povrchu. Po realizaci nápravných opatření, díky kterým se snížilo zavzdušnění vody, probíhá odchov ryb bez problémů.

Přítomnost kyslíku rozpuštěného ve vodě je základní podmínkou pro život ryb a většiny vodních organismů. Výše koncentrace kyslíku rozpuštěného ve vodě je dána rovnováhou mezi kyslíkem, který do vody vstupuje (přestupem z atmosféry, fotosyntetickou asimilací vodních rostlin), a kyslíkem, který je spotřebováván (respirací vodních živočichů, aerobním bakteriálním rozkladem organických látek přítomných ve vodě). Problémy s nízkými koncentracemi ve vodě rozpuštěného kyslíku se objevují nejčastěji ve vodách zatížených snadno rozložitelnými organickými látkami (jejich zdrojem jsou např. komunální odpadní vody, odpadní vody z potravinářského průmyslu, odpady z živočišné výroby apod.), ale existují i další příčiny (Svobodová a kol., 1993; Herbst, 2000; Pitter, 2009).

Za určitých podmínek dochází k přesycení vody kyslíkem, které může být pro ryby stejně nebezpečné, jako jeho nedostatek. K přesycení vody kyslíkem může dojít např. v důsledku intenzivní asimilační činnosti vodních rostlin nebo při transportu v polyetylenových vácích pod kyslíkovou atmosférou. Za kritické nasycení vody kyslíkem jsou považovány hodnoty 250 až 300 %. Při vyšších hodnotách může dojít k poškození ryb. Žábry takto poškozených ryb mají nápadně světle červenou barvu a konce žaberních lamel jsou roztřepené. Po vysazení takových ryb může dojít k sekundárnímu zaplísnění a v některých případech i jejich úhynu. Tento stav by ale neměl být zaměňován se zavzdušněním vody, které může vyvolat tzv. „gas bubble disease“. K přesycení vody vzduchem dochází v případech, kdy tlak rozpuštěného vzduchu je vyšší než atmosférický tlak. K tomuto jevu dochází v případech, kdy se rovnováha vody a atmosféry ustavuje za zvýšeného tlaku, např. na dně jezer nebo nádrží, v podzemních vodách, nebo když je voda v kontaktu se vzduchem při jejím nasávání (čerpání). K zavzdušnění vody dochází také v případech, kdy je rovnováha voda vzduch ustavena při nízké teplotě vody a poté dojde k jejímu zahřívání. Při zvýšení teploty vody klesá rozpustnost plynů ve vodě a plyny přítomné ve vodě se z vody uvolňují. Taková voda se v nádobách jeví jako zakalená a lze pozorovat, jak ode dna stoupají drobné až mikroskopické bubliny, nebo výskyt větších bublin na stěnách nádob (Alabaster a Lloyd, 1980; Svobodová a kol., 1993).

Jestliže jsou ryby při nižším atmosférickém tlaku vystaveny zavzdušněné vodě, jejich krev se vyrovnává s vyšším tlakem vzduchu ve vodě. V krvi se tvoří bublinky vzduchu, které mohou omezit průchodnost krve kapilárami; v sub-akutních případech mohou být ovlivněny hřbetní a ocasní ploutve a mezi ploutevními paprsky se mohou objevit bublinky. Někdy dokonce dojde nekróze a celkovému narušení ploutví. V některých případech dojde v důsledku blokace hlavních tepen k velmi rychlému úhynu ryb. Bohužel, úhyny ryb vyvolané „zavzdušněnou vodou“ nejsou v praxi úplně vzácné a díky nedostatečným zkušenostem a znalostem ošetřujícího personálu může docházet k úhynům ryb opakovaně. Hledání příčin úhynu potom může trvat i několik měsíců. Jeden takový případ jsme řešili na našem pracovišti v průběhu roku 2014.

Anamnéza: v květnu 2014 se na naše pracoviště obrátil majitel jedné nejmenované firmy ze severních Čech s žádostí o pomoc při řešení problémů s odchovem sivenů amerických a pstruhů duhových o hmotnosti 100 až 150 g. Jak vyplynulo z předběžných jednání, jednalo se o drobný zájmový chov lososovitých ryb v malé venkovní nádrži, který byl rozšířen o další 2 nádrže umístěné v hale bývalé továrny. Zatímco odchov ryb ve venkovní nádrži probíhal zcela bez problémů, ryby v nových nádržích v hale uhynuly vždy řádově během několika hodin po vysazení. Ryby byly chovány v průtočném systému a voda přiváděná do všech nádržích pocházela ze stejného zdroje.

Naše pozornost se proto zpočátku soustředila na kyslíkové poměry v jednotlivých nádržích a na případnou toxicitu materiálu nových (vnitřních) nádržích. Pokud jde o kyslíkové poměry, byli jsme pracovníky firmy ubezpečeni, že koncentrace kyslíku v nádržích byly měřeny, a že kyslíku je dostatek. Abychom vyloučili případný negativní vliv materiálu nových nádržích, doporučili jsme jejich dlouhodobý průplach. Přes toto opatření nepřežily ryby vysazené do v nových nádržích déle než 10 hodin. Chovatel si v různých laboratořích nechal provést základní fyzikálně chemické analýzy přiváděné vody. Výsledky analýz potvrzovaly vysokou kvalitu vody a žádný ze sledovaných parametrů neindikoval možné ohrožení ryb.

Místní šetření: vlastní místní šetření bylo provedeno dne 13. 11. 2014. Pracovníci chovatelské firmy byli požádáni, aby den před naším příjezdem vysadili do jedné z vnitřních nádržích ryby, abychom mohli pozorovat klinické příznaky poškození a případně provést pitvu uhynulých ryb. Proto bylo 12. 11. do nádrže v hale vysazeno 10 ks sivena amerického. Tyto ryby však uhynuly ještě též den (do 6 hodin po vysazení). Proto jsme požádali o vysazení dalších ryb do druhé vnitřní nádrže s tím, že je pravděpodobné, že v průběhu naší cesty na místo šetření se také u těchto ryb objeví klinické příznaky poškození. Ihned po příjezdu na místo byla provedena pitva uhynulých ryb a byly odebrány vzorky žaber na mikroskopické vyšetření. Rovněž byl zkontrolován stav ryb ve druhé nádrži. Poté bylo provedeno šetření v terénu.

Zdrojem vody pro rybochovný objekt je prameniště nacházející se cca 50 výškových metrů nad chovatelským zařízením na protilehlém břehu řeky Ohře ve vzdálenosti cca 4 km od tohoto zařízení. Voda z prameniště je soustředěna v podzemní betonové nádrži, odkud odtéká přepadem v podobě sacího koše do plastové roury. Voda je dále vedena plastovým potrubím do chovatelského objektu. Zde je v prvním podlaží vybudována retenční nádrž, ze které voda odtéká samospádem do dolního podlaží. Zde se rozděluje na větev zásobující venkovní nádrž ve vzdálenosti cca 200 m od haly a na větev zásobující odchovné nádrže v hale. V jednotlivých místech (tj. prameniště, venkovní nádrž, vnitřní nádrže), byly pomocí přístroje WTW multiline P4 měřeny hodnoty pH, teplota vody, koncentrace rozpuštěného kyslíku a odebrány vzorky vody na hydrochemická vyšetření. V rybníčku pod prameništěm a ve venkovní rybochovné nádrži byly odebrány vzorky zooplanktonu.

Výsledky

Fyzikálně chemické vlastnosti vody: ve vzorcích vody odebraných přímo v prameništi (vz. č. 1), dále v odchovném rybníčku (vz. č. 2) a ve vnitřní odchovné nádrži, kde došlo k úhynu ryb (vz. č. 3) byly stanoveny základní ukazatele kvality vody s následujícími výsledky: CHSK_{Cr} (u všech vzorků $< 10 \text{ mg.l}^{-1}$), $\text{P}_{\text{celk.}}$ (vz. č. 1 a 2 – $< 0,05 \text{ mg.l}^{-1}$, vz. č. 3 – $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$ P), $\text{NH}_4^{+}\text{-N}$ (vz. č. 1 – $0,04 \text{ mg.l}^{-1}$, vz. č. 2 – $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$, vz. č. 3 – $0,06 \text{ mg.l}^{-1}$), NO_2^{-} (vz. č. 1 – $0,005 \text{ mg.l}^{-1}$, vz. č. 2 – $0,006 \text{ mg.l}^{-1}$, vz. č. 3 – $< 0,005 \text{ mg.l}^{-1}$), Cl^{-} (u všech vzorků $6,4 \text{ mg.l}^{-1}$), $\Sigma\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$ (u všech vzorků $1,8 \text{ mmol.l}^{-1}$). Teplota vody na všech odběrových místech se pohybovala mezi $9,5$ a $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$, hodnoty pH v rozmezí $7,56$ až $7,80$. Koncentrace rozpuštěného kyslíku v prameništi $8,34 \text{ mg.l}^{-1}$ (nasycení 77%), v chovném rybníčku $10,50 \text{ mg.l}^{-1}$ ($96,7 \%$), v nádrži s živými rybami $13,65 \text{ mg.l}^{-1}$ ($127,7 \%$) a v nádrži s uhynulými rybami $14,9$ (136%). V nádrži s uhynulými rybami byly pozorovány na ploutvích ryb, na dně nádrže a jejích stěnách drobné bublinky. Bylo vysloveno podezření, že příčinou opakovaných úhynů ryb je s velkou pravděpodobností „gas bubble disease“, a proto byla v nádrži č. 2 provedena drobná technická opatření (viz odstavec výsledky a doporučení) a během dalších dvou hodin pokleslo nasycení vody kyslíkem na 110% .

Zooplankton: ve vzorku vody odebraném v rybníčku u prameniště byla zjištěna přítomnost plazivek (*Canthocamptus staphylinus*) a buchanek (*Cyclops insignis*), ve venkovní odchovné nádrži přítomnost buchanek (*Cyclops insignis*).

Vyšetření ryb: uhynulé ryby z vnitřní nádrže č. 1 – makroskopické vyšetření: uhynulé ryby měly široce rozevřené skřele a otevřené tlamy, kůže byla mírně zahleněná, světlejší barvy. Žábry ryb byly světlejší barvy, okraje žaberních lístků bělavé. Dutina tělní beze změn. Mikroskopickým vyšetřením žaber byla prokázána přítomnost vzduchových bublin uvnitř žaberních lístků i na jejich povrchu. Živé ryby z vnitřní nádrže č. 2 nejevily ani v následném období známky poškození.

Závěry a doporučení

- 1) Mikroskopickým vyšetřením vzorků vody odebraných v rybníčku pod prameništěm a v rybníčku v odchovném objektu byl prokázán výskyt oligosaprobního zooplanktonu o velmi nízké biomase. To prakticky vylučuje případnou kontaminaci vody organickým znečištěním, kovy, pesticidy, či jinými cizorodými látkami.
- 2) Výsledky chemických analýz vody přiváděné do rybochovného objektu potvrdily její velmi dobrou kvalitu. Voda nebyla zatížena organickými látkami a vykazovala minimální koncentrace (nebo pod mezí detekce) amoniaku, dusitanů, chloridů a celkového fosforu. Výsledky hydrochemického vyšetření velmi dobře korelovaly s výsledky biologického vyšetření a prokázaly nízkou saprobní i trofickou úroveň vody.
- 3) Ve vodě v prameništi bylo zjištěno 75% nasycení kyslíkem. Voda v odchovných nádržích umístěných v hale však vykazovala velmi významné přesycení kyslíkem (maximální naměřená hodnota 136%). K tomuto přesycení (nejen kyslíkem, ale i dalšími plyny přítomnými ve vzduchu) docházelo v důsledku přísávání vzduchu do potrubí v místě odběru vody v prameništi. Během relativně dlouhého transportu se vzduch mísil s vodou a tvořily se různě velké bubliny, včetně mikroskopických. K dalšímu zavzdušnění vody docházelo i v samotném rybochovném objektu, kde byla voda opět obdobným způsobem přepouštěna z neodvětrávané zásobní nádrže v horním patře budovy do odchovných nádrží umístěných v její dolní části. V důsledku tehdy fungujícího technického řešení odběru vody a jejího přívodu do odchovných nádrží docházelo k vysokému zavzdušnění vody a tím i k tvorbě bublinek mikroskopických rozměrů.

Tyto bublinky pronikaly do žaberního aparátu ryb a byly příčinou vzniku embolií v krevním oběhu ryb (prokázáno mikroskopickým vyšetřením žaber uhynulých ryb). Stejná voda byla sice přiváděna do venkovní nádrže, ale vzhledem k přirozenému charakteru nádrže a jejímu většímu objemu (tedy delší době zdržení vody v ní) a také možnosti intenzivnějšího rozstříku vody nad hladinou, zde nebylo zavzdušnění vody kritické (nasycení vody kyslíkem zde činilo 97 %) a nepůsobilo rybám zdravotní problémy.

4) Na základě provedených sledování, měření a vyšetření bylo konstatováno, že příčinou úhynů ryb ve vnitřních odchovných nádržích bylo výrazné přesycení vody vzdušnými plyny, ke kterému docházelo v důsledku výše uvedených skutečností.

5) Pro další odchov ryb byly doporučeny jednoduché úpravy přítoku vody tak, aby se voda před vtokem do nádrže zbavila mikrobublinek (na přítok vody byla nasazena molitanová houba a po průchodu houbou byla voda přiváděna na povrch mírně nakloněné desky, po kterém stékala do nádrže). Tímto způsobem se snížilo zavzdušnění vody a nasycení vody kyslíkem kleslo na 110 %. S cílem ještě více omezit zavzdušnění vody bylo doporučeno provést technické úpravy čerpání vody přímo v prameništi a realizovat odvětrání zásobní nádrže v horním patře budovy. Po zavedení těchto jednoduchých opatření probíhá odchov ryb ve vnitřních bazénech již bez problémů.

Literatura

Alabaster, J.S., Lloyd, R., 1980. Water quality criteria for freshwater fish. Butterworths, Toronto, 127–142.

Herbst, V., 2000. Water pollution, self purification and restauration measures. Deutche Tierarztliche Wochenschrift, 107. 339–342.

Pitter, P., 2009. Hydrochemie. VŠCHT, Praha, 579 s.

Svobodová, Z., Lloyd, R., Máchová, J., Vykusová, B., 1993. Water quality and fish health. EIFAC Tech. Paper, FAO Rome, No. 54, 59 s.

Poděkování

Výsledky byly získány za finanční podpory MŠMT projektu CENAKVA (CZ.1.05/2.1.00/01.0024) a projektu CENAKVA II (LO1205 v rámci programu NPU I).

ZDRAVOTNÍ PROBLEMATIKA NA PSTRUŽÍ FARMĚ V HYNČICÍCH A JEJÍ ŘEŠENÍ Z POHLEDU PRAXE

Miroslav Kulich

Pstruží líheň Hynčice

Souhrn

Příspěvek stručně popisuje celou škálu zdravotní problematiky na pstruží farmě vlastněnou veterinárním lékařem.

Choroby způsobené neinfekčními faktory

Nízká teplota vody, nebo její náhlé výkyvy mohou způsobit u plůdků či slabších násad **syndrom silně prochlazené vody**. Ryby se při nízkých teplotách zpravidla pod 4 °C, začnou motat, případně i hynout. Tento jev jsme pozorovali v předjaří nad ránem, na malých kruhových nádržích u plůdku Pd ve vynikající kondici, kdy odpolední teplota vody dosahovala při jarním sluníčku k 7–8 °C a ranní teplota po nočním vyjasnění a mrazu se snížila na 3 °C. Stejný jev jsme pozorovali po vlně silných mrazů, které přišly náhle z teplého podzimu u slabších násad púlročků Pd, kdy při teplotě vody pod 3 °C došlo k motání a úhynu části obsádky ryb. Celý problém vyřešilo pouze zvýšení teploty vody alespoň nad 4 °C.

K intoxikaci amoniakem došlo u púlročka sivena amerického cca 3 dkg, kdy jsme na provizorní recirkulaci s ještě hlinitým, nerovným dnem a bez odkalování, opomněli na obrovské nánosy exkrementů v hluchých místech. Ryby dobře přijímaly krmivo zhruba do půlky srpna, pak se náhle příjem krmné dávky snížil, ryby postávaly v koutech, ztmavly a měly nefyziologicky syté červené žaberní lístky. Po nasazení antibiotické léčby a restrikci krmné dávky se stav nezměnil a ryby dokonce začaly hynout. Patologický nález na rybách byl negativní, zaznamenáno bylo ztučnění dutiny tělní. Po odhalení příčiny bylo provedeno vyčištěním nádrže za provozu při velkém letním nedostatku vody. Po vyčištění nádrže začaly ryby opět přijímat krmivo a bez významného zhoršení stavu. Ojedinelé úhyny však pokračovaly ještě další cca 1 měsíc, než se stav úplně stabilizoval.

Otrava Chloraminem T. Zhruba 120 000 kusů rozkrmené násady Pd o délce cca 6 cm ve 160 m³ vody o teplotě 14 °C se začalo lekat a příjem krmiva se snížil. Přistoupil jsem k aplikaci Chloraminu T do celého objemu vody v dávce 1,6 kg, tedy 1 dkg na 1 m³, při ponechaném přítoku čerstvé vody cca 3 l/s, za stálé recirkulace vody nízkotlakým aerliftem. Takto to v rámci technologického postupu preventivně děláme běžně. Ryby byly na počátku koupele velmi neklidné, ale po 10 min se uklidnily a vše vypadalo v pořádku. Hodinu po aplikaci koupele došlo k úhynům ryb. Se záměrem snížit koncentraci účinné látky v koupeli jsem snížil stávající hladinu koupele a zvýšil přítok. Celkově dosáhly ztráty výše 100 000 kusů násady Pd. Proto v situaci kdy jsou ryby prokazatelně nemocné je třeba postupovat opatrněji a koupel v Chloraminu T provádět na nižší hladině vody v nádrži abybylo možné efektivně ředit koncentraci v případě problému rychlým dopuštěním.

Otrava hašeným vápnem na nádrži s přírodním dnem po spuštění aerace. Nádrž jsme po vyskladnění zdezinfikovali páleným vápnem v množství 25 kg na 60 m². Cca po 3 týdnech jsme nádrž napustili a naskladnili do ní Si púlročka (asi 6 dkg) v množství 20 000 kusů na 80 m³

vody. Několik dní byl stav úplně v pořádku. Přišlo výrazné oteplení a tak jsme spustili v té době ještě provizorní recirkulaci provzdušňovacím dmychadlem. Během hodiny roztočení vody v nádrži způsobilo rozvíření kalu s hašeným vápnem. Voda se mírně zbarvila do bíla a ryby začaly hynout. Nebylo kam ryby odlovit vatkou a pouhé zastavení aerace nepomohlo. Začali jsme vodu ředit, ale bez úspěchu. Poleptání žaber a pH přes 9 dokonalo zkázu.

Uvolnění reziduí malachitové zeleně (MZ) z rybníčního sedimentu po částečném odbahnění a aeraci

V areálu zemních rybníčků v Heřmánkovicích se dříve používala MZ k dlouhodobým koupelím proti kožovci. V roce 2013 jsem podal trestní oznámení na neznámého pachatele, protože u tržních ryb z mého chovu pocházejících ze zemního rybníčku, které zrovna v létě dorostly, a byl od nich odebrán úřední vzorek, byla nalezena hodnota $0,7 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ LeukoMZ. Tyto ryby byly do částečně odbahněného zemního rybníčku převezeny na podzim z Hynčic z betonových sádek, kde není používána MZ. Shodou okolností byly ryby na přání zákazníka, kterému jsme jich část prodávali, vyšetřeny na přítomnost MZ i LeukoMZ s negativním výsledkem. Tyto ryby pocházely z výše zmiňovaného zemního rybníčku, odběr byl proveden na jaře, kdy ryby již 5 měsíců (přes zimu) pobývaly v tomto zemním rybníčku. Ke kontaminaci došlo tedy až po spuštění aerátorů na jaře a v létě, které začaly vířit sediment, protože v jiných nádržích, ani u chovatele nad hospodářstvím a u ryb v toku, nebyla rezidua MZ a LeukoMZ prokázána. V případě, že by někdo aplikoval MZ do zemního rybníčku úmyslně, hodnoty by byly určitě mnohem vyšší.

Virové choroby

Virová hemorrhagická septicémie

V roce 2014 proběhla tato nákaza i na mé farmě v Hynčicích. K zavlečení do chovu došlo z 99 % candátem obecným (*Sander lucioperca*), který byl v období vánočního prodeje ryb přidán k obsádce. První příznaky nemoci se objevily u zbytku vánočních tržních ryb, které byly v přímém kontaktu s dovezenými candáty, ve 2. polovině ledna. Tyto ryby byly zlikvidovány a manipulační sádka s okolím byla důsledně dezinfikována. Další 2 měsíce byl na farmě klid, až do třídění šarže ročků, kdy se začal objevovat úhyn ryb, který se nepodařilo zastavit ani koupelemi, ani antibiotiky. Úhyn se zvyšoval den ze dne a během pár dní jsem byl nucen oznámit podezření z nákazy, které bylo následně potvrzeno, přestože aktuální vzorky ryb a ovariální tekutiny z jarního monitoringu byly negativní. Od ohlášení do likvidace uběhlo 14 dní. Během této doby uhynula perakutně asi polovina obsádky (40 000 kusů) bez typických klinických i patologických příznaků popisovaných v literatuře. Ryby byly zpravidla světlejší, bez exoftalmu, ascitu i anemie. Motaly se, nechaly se unášet proudem vody. Do poslední chvíle ryby dobře přijímaly krmivo a i přes cca 5% denní úhyn se zdravý zbytek hejna prodíral aktivně mezi mrtvolami za granulami. Při pitvě mělo hodně ryb potravu v žaludku. Krváceniny na orgánech, játrech, svalovině i tukové tkáni byly markantní jen u některých ryb a jejich výskyt se zvyšoval. Typická byla třešňově červená barva sleziny, která na sebe upozornila při pitvě snad každé ryby.

Zjistilo se, že se virus na farmě rozšířil v zápětí úplně všude, protože k úplné likvidaci ohniska došlo až v červenci a u odebraných vzorků z oddělených nádrží i líhně byl diagnostikován virus jak u plůdku pstruha obecného, lipana podhorního, tak i u generačních ryb a jiker pstruha duhového. Nic však již dál nehynulo.

Jako veterinář jsem velmi zápasil s ohniskovou i závěrečnou dezinfekcí, protože neexistuje návod čím a v jaké koncentraci dezinfekci po výskytu VHS provést a proto bych doporučil vytvořit nějakou smysluplnou metodiku. Já jsem použil k hrubé dezinfekci chlorové vápno v dávce $50 \text{ kg}/100\text{m}^3$ vody, dále 2–3% roztok chloraminu T na dezinfekci stěn nádrží po tlakovém

vystříkání a na závěrečné umytí všech pomůcek. Na některé předměty a odkalovací kužely jsem použil 2% formaldehyd. Nejdůležitější částí dezinfekce však bylo úplné zastavení vody, vypuštění a odčerpání zbytků vody, vysušení a letnění přes 2 měsíce.

Komplex bakteriálních nemocí a jejich léčba:

Anemický syndrom plůdku pstruha duhového, flavobakteriíza žaber lososovitých, furunkulóza, yersinióza, vředovitost, kolumnaróza a cytofagóza.

Původcem je několik mnohdy současně působících bakterií (*Flavobacterium branchiophylum*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Flavobacterium columnare*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri*).

Nejčastější příčina ztrát. Pro praxi není podstatné, jak se která nemoc jmenuje. Každý chov je něčím promořen a mnohdy se jedná o kombinované infekce. Úspěch léčby závisí na jejím včasném zahájení a dobrém směřování.

Ošetřovatel při krmení z ruky nejdříve pozná počátek sníženého zájmu ryb o krmivo, nemusí ještě docházet ke ztrátám, ryby se ještě ani nelekají, ani nepostávají v koutech... První indicií je vždy snížená dravost o potravu, byť zpočátku nepatrná a „rozcuchání hejna“ - dalo by se to nazvat „**Tady je něco špatně, ale nevím co**“. Když se zahájí správná léčba hned následující den, tak nemusí dojít ke ztrátám. Postup léčby: neprodleně koupel v chloraminu T, půldenní hladovka a opětovný pokus o standardní nakrmení. Pakliže dravost a „učesanost“ hejna není ideální, tak je nutno přerušit krmení a zopakovat koupel v chloraminu T a hned druhý den nasadit antibiotika do poloviční dávky krmiva a zároveň s tím odebrat vzorky z ještě neléčených ryb na bakteriologii pro stanovení původce a jeho citlivosti na ATB.

Odběr vzorků pro bakteriologické vyšetření: Není nutno vozit do SVÚ živé ryby. Stačí udělat stěry z orgánů, dutiny břišní, eventuálně patologických lézí do transportního média a zaslat poštou či svoznou linkou z okresních inspektorátů SVS. Do žádanky uvést žádost o vyšetření citlivosti původce na florfenikol, enrofloxacin, flumequinum, potencované sulfonamidy, ... event. další ATB)

Díky možnosti použití léků v rámci tzv. kaskády je lékem první volby u plůdků a násad na naší farmě florfenikol 20 mg.kg⁻¹ ž.hm./den – 7 dní (Floron 10% perorální roztok). Lékem pro případ neúspěchu je enrofloxacin 10 mg.kg⁻¹ ž.hm./den – 7 dnů (Enrobioflox 10% perorální roztok) anebo potencované sulfonamidy 60 mg.kg⁻¹ ž.hm./den – 7–10 dnů (Trimazin 90% pulvis). Tyto léky zpravidla nasazujeme již po diagnostice původce a stanovení citlivosti, nebo i při podobnosti již léčeného onemocnění z minulosti. U všech těchto léků je OL 500 stupňodnů, protože nemají stanovený MRL u ryb, ale vzhledem k tomu, že se jedná o mladé kategorie, tak to nevadí.

Lékem první volby u ryb dosahujících tržní velikost je flumequinum 12mg.kg⁻¹ ž.hm./den po dobu 6 dnů (Flumiquil 50%). Tento lék je jediným registrovaným antibiotickým preparátem pro lososovité ryby a má OL pouze 80 stupňodnů. Samozřejmě lze použít na základě testů citlivosti i jiná antibiotika (neomycin, amoxycilin.trihydrát, amoxycilin clavulanát, oxytetracyclin...).

Denní dávku ATB spočítáme: počet ryb x průměrná hmotnost (kg) x mg účinné látky na 1kg a den. To vše povýšíme zhruba o 10% (oplach, nepřesnost odhadu), abychom opravdu zajistili účinnou koncentraci. Po zjištění množství mg účinné látky na 1 den pro danou šarži ryb odměříme či odvážíme lék dle jeho koncentrace a potřebné množství naředíme vodou do optimálního množství, které zaručí po aplikaci do krmiva za důkladného, rychlého a několik minut trvajících míchání, rovnoměrné nasáknutí do potřebného množství granulí. Nutno vyzkoušet s vodou bez léčiva, protože sací schopnost granulí záleží na jejich velikosti

a tukování. 1. den léčby předkládáme 1/3–1/2 obvyklého množství denní dávky krmiva, další dny při chuti k přijímání krmiva můžeme použít i větší množství krmiva. Používáme krmivo, na které jsou ryby zvyklé. První aplikaci celodenní dávky léku se snažíme dostat do 1/3 až poloviční dávky běžně zkrmovaného krmiva a zkrmit ji pokud možno najednou, aby došlo k nárazovému vytvoření účinné hladiny antibiotik v krvi ryb. Přitom dbáme na to, aby si pokud možno „zobla“ každá ryba.

Během antibiotické terapie zpravidla zvyšujeme frekvenci dezinfekčních koupelí na každý den a střídáme účinné látky (persteril, chloramin T, peruhličitan). Snažíme se vyměňovat i část vody v nádrži s nemocnými rybami. Pakliže je zahájena léčba včas a trefíme se ihned napoprvé, tak je patrný pozitivní efekt již po několika hodinách. V případě neúspěchu léčby vyměníme po 3-5 dnech antibiotika za jiná, dle testu citlivosti. V případě opakovaného neúspěchu přehodnotit diagnostický postup.

Infekce kožovcem (*Ichthyophthirius multifiliis*)

Přestože líheň i areál v Hynčicích leží na vodoteči s prakticky kojeneckou vodou bez eutrofizace, tak se s infekcí tímto nálevníkem potýkáme. V oblasti pramenů potoka je několik extenzivně obhospodařovaných rybníčků v majetku Lesů ČR, s.p., ve kterých jsou různé plevelné i kaprovité ryby. V letním období při bouřkách dochází k výtoku vody do napájecího potoka a „kožovcová polévka“ doteče až k nám, kde zhruba po 14 dnech od těchto bouřek začínáme řešit problém s infekcí.

Vyozorovali jsme následující. Nejméně citlivé jsou malé násady, do cca 6-8 cm, které jsou krmeny drobným krmivem. Tyto ryby pravděpodobně dokáží aktivně vyžít uvolněné dospělce z ryb záměnou za krmivo a tím nedochází k masivní invazi, protože se nemá v nádrži co dělit na tomity. U ryb kde krmíme krmivo 1,5 mm a větší už k tomuto jevu asi nedochází a množení kožovce je mnohem rychlejší. Naopak u ryb nad 14 cm o hmotnostech 6–10 dkg infekce probíhá bez větších ztrát, protože jsou ryby již velké, rychle rostou a při optimalizování životních podmínek infekci dobře zvládnou.

Nejnáchylnější jsou násady pstruhů od 8-14 cm.

Signálem pro začátek preventivně-léčebných opatření je výskyt ojedinělých jedinců parazita na některých rybách pouhým okem. V této době se snažíme upravit aeraci a proudění vody z přerušované na kontinuální, snažíme se provádět častější výměny části vody, pravidelně odkalujeme kužely. Zároveň zvyšujeme frekvenci koupelí v persterilu, kdy do celé kubatury aplikujeme 7–8 ml 15% persterilu. Zpočátku 1x denně. Když se kožovec pomnoží víc, ryby začínají být neklidné, otírají se o dno nádrže o hladinu a v nádrži je pozorovatelný velký neklid. Ryby zpravidla zpočátku velmi dobře žerou. Při masivnější invazi a při předpovědi teplého počasí zpravidla nasadíme preventivně-léčebně antibiotickou kůru potencovanými sulfonamidy v dávce 60 mg.kg⁻¹ ž.hm./den – 7–10 dnů (Trimazin 90% pulvis). Toto antibiotikum volím záměrně z důvodu, že nejenže pomůže přeléčit bakteriální infekci a tím u ryb snížíme z důvodu multiinfekce počet patogenů se kterými ryba bojuje, ale také proto, že se mně suspektně jeví použití potencovaných sulfonamidů dobré i pro oslabení infekce kožovcem, přestože se to nikde nepopisuje. Sulfonamidy mají vynikající afinitu ke kůži a jsou účinné na mnohá protozoa, takže určitý negativní účinek by mohly mít i na kožovce. Při masivním výskytu frekvenci koupelí v persterilu zvýšíme na 2x denně a občas místo persterilu použijeme peruhličitan sodný (Aqua-blue, Biocare) v dávce 100 g/1 m³. Po určité době dochází až k odlupování částí epidermis a někdy se až divíme, co ryby vydrží a přežijí.

Někdy souhra všech faktorů způsobuje rozsáhlé úhyny ryb. Zajímavé je, že zdolávání této infekce je individuální. Některé ryby s masivní intenzitou infekce přežívají, jiné nemají na těle nic a paradoxně a přesto hynou.

Závěr

Každá farma, každá nádrž v rámci jedné farmy má specifické prostředí a podmínky pro rozvoj infekce. Při dodržování zoohygienických opatření a optimalizaci životních podmínek, lze zpravidla úspěšně zvládnout jak bakteriální infekci, tak infekci kožovcem. Důležité je však neustále porovnávat stav předešlý se současným a všimnout si včas i sebemenších změn. Proto preferuji zejména u odchovu ruční krmení, protože nejrychleji odhalím změnu a mohu začít s léčbou včas.

Literatura

Kolářová, J., Nepejchalová, L., 2014. Terapeutické možnosti v chovech ryb ČR – přehled. Veterinářství 7: 533–538.

Navrátil, S., Svobodová, Z., Lucký, Z., 2000. Choroby ryb. VFU, Brno, 155 s.

Svobodová, Z., Kolářová, J., Navrátil S., Veselý T., Chloupek, P., Tesarčík, J., Čítek, J., 2007. Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb. Informatorium, Praha, 264 s.

Seznam účastníků

- Bernáškova Markéta, MVDr., Městská veterinární správa v Praze Státní veterinární správy, Městská veterinární správa v Praze Státní veterinární správy, Na Kozačce 3, 120 00 Praha 2, m.bernaskova.kvsa@SVSCR.CZ
- Brávek Pavel, MVDr., Krajská veterinární správa Státní veterinární správy pro Kraj Vysočina, Rantířovská 22, 586 05 Jihlava, p.bravek.kvsj@svschr.cz
- Bzdil Jaroslav, Ph.D., MVDr., Státní veterinární ústav Olomouc, Jakoubka ze Stříbra 1, 779 00 Olomouc, jbdzil@svuol.cz
- Česánková Eva, MVDr., Krajská veterinární správa Státní veterinární správy pro Jihočeský kraj, pracoviště Strakonice, Palackého náměstí 1090, 386 01 Strakonice, e.cesankova.kvsc@svschr.cz
- Čížek Alois, prof. MVDr., CSc., Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, cizeka@vfu.cz
- Dorn Dalibor, Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Hudcova 56 A, Brno, 621 00, detašované pracoviště Pod Nemocnicí 2381, 440 01 Louny, uskvbl@uskvbl.cz
- Dvořák Jindřich, MVDr., Krajská veterinární správa Státní veterinární správy pro Liberecký kraj, Ostašovská 521, 460 01 Liberec, j.dvorak.kvsl@svschr.cz
- Fiala Ivan, RNDr., Ph.D., Parazitologický ústav BC AVČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, fiala@paru.cas.cz
- Filášová Lucie, MVDr., Krajská veterinární správa Státní veterinární správy pro Jihočeský kraj, Severní 9, 370 10 České Budějovice, l.filasova.kvscvschr.cz
- Gelnar Milan, doc. RNDr., CSc., Přírodovědecká fakulta Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, gelnar@sci.muni.cz
- Grabic Roman, Mgr., Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, rgrabic@frov.jcu.cz
- Hřebíková Milena, MVDr., Městská veterinární správa v Praze Státní veterinární správy, Městská veterinární správa v Praze Státní veterinární správy, Na Kozačce 3, 120 00 Praha 2, m.hrebikova.kvsa@SVSCR.CZ
- Jakoubek Jaroslav, MVDr., KVSE, Tykačova 1247, 562 01 Česká Třebová, j.jakoubek.kvse@svschr.cz
- Jaroš Jaroslav, MVDr., Krajská veterinární správa Státní veterinární správy pro Liberecký kraj, Ostašovská 521, 460 01 Liberec, j.jaros.kvsl@svschr.cz
- Jelínková Eva, Bc., Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, jelinkovae@vfu.cz
- Jurajda Pavel, Ing., Ph.D., Ústav biologie obratlovců AV ČR, v.v.i., Květná 8, 603 65 Brno, jurajda@brno.cas.cz
- Kepr Tomáš, Ing., Jihočeský územní svaz Českého rybářského svazu, Rybářská 237, 373 82 Boršov nad Vltavou, kepr@crsrb.cz
- Kienast Petr, Povodí Ohře, s. p., Povodí Ohře, s. p., Bezručova 4219, 430 03 Chomutov
- Kolářová Jitka, MVDr., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, kolarova@frov.jcu.cz
- Kopečná Markéta, MVDr., Ph.D., Městská veterinární správa v Praze Státní veterinární správy, Na Kozačce 3, 120 00 Praha 2, m.kopečna.kvsa@SVSCR.CZ
- Koutecká Lenka, MVDr., CSc., Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Hudcova 56 A, Brno, 621 00, detašované pracoviště Pod Nemocnicí 2381, 440 01 Louny, louny@uskvbl.cz
- Krametbauer Karel, MVDr., Krajská veterinární správa Státní veterinární správy pro Jihočeský kraj, pracoviště Strakonice, Palackého náměstí 1090, 386 01 Strakonice, k.krametbauer.kvsc@svschr.cz
- Kruml Jiří, MVDr., Ministerstvo zemědělství, Těšnov 17, 117 05 Praha, jiri.kruml@mze.cz
- Kulich Miroslav, MVDr., Pstruží líheň Hynčice, privátní MVDr., Suchý Důl 98, 54962 Suchý Důl, m.kulich@c-box.cz
- Linhartová Jana, MVDr., Krajská veterinární správa Státní veterinární správy pro Kraj Vysočina, Rantířovská 22, 586 05 Jihlava, j.linhartova.kvsj@svschr.cz
- Máchová Jana, Ing., Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, machova@frov.jcu.cz
- Marková Zdeňka, Mgr., Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, H05079@vfu.cz
- Mašková Zlata, Ing., Krajský úřad Jihočeský kraj, Krajský úřad Jihočeského kraje, U Zimního stadionu 1952/2, 370 76 České Budějovice, maskova@kraj-jihocesky.cz
- Matěcha Martin, DiS., Povodí Ohře, s. p., Bezručova 4219, 430 03 Chomutov

Mravcová Karolína, MVDr., Krajská veterinární správa Státní veterinární správy pro Karlovarský kraj, Kpt. Jaroše 318/4, 360 06 Karlovy Vary, epodatelna.kvsk@svschr.cz

Nágl Ivan, MVDr., Státní veterinární ústav Praha, Sídlíštní 24, 165 03 Praha 6 – Lysolaje, Ivan.nagl@svupraha.cz

Navrátil Stanislav, prof. MVDr., CSc., Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, navratils@vfu.cz

Nepejchalová Leona, MVDr., Ph.D., Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Hudcova 56a, 621 00 Brno, nepejchalova@uskvbl.cz

Novák Milan, MVDr., Krajská veterinární správa Státní veterinární správy pro Kraj Vysočina, Rantířovská 22, 586 05 Jihlava, m.novak.kvsj@svschr.cz

Ouředník Robert, Krajský úřad Jihočeský kraj, Krajský úřad Jihočeského kraje, U Zimního stadionu 1952/2, 370 76 České Budějovice, ourednik@kraj-jihocesky.cz

Palíková Miroslava, doc. MVDr., Ph.D., Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, palikovam@vfu.cz

Papežíková Ivana, MVDr., Ph.D., Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, papezikovai@vfu.cz

Piačková Veronika, MVDr., Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany vod, Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, piackova@frov.jcu.cz

Pijáček Martin, MVDr., Státní veterinární ústav Olomouc, Jakoubka ze Stříbra 1, 779 00 Olomouc, mpijacek@svuol.cz

Pojezdal Lubomír, MVDr., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 00 Brno

Pokorová Dagmar, MVDr., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 00 Brno, pokorova@vri.cz

Poláček Václav, MVDr., Krajská veterinární správa Státní veterinární správy pro Plzeňský kraj, Družstevní 1846/13, 301 00 Plzeň, v.polacek.kvsp@svschr.cz

Randák Tomáš, doc. Ing., Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany vod, Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, randak@frov.jcu.cz

Řehulka Jiří, doc. Ing., DrSc., Slezské zemské muzeum, Nádražní okruh 31, 746 01 Opava, re hulka@szm.cz

Řezníček Karel, Český rybnářský svaz územní svaz města Prahy, Rybnářská 3/5, 147 00 Praha 4 – Podolí, reznicek@rybaripraha.cz

Scholz Tomáš, prof. RNDr., CSc., Parazitologický ústav BC AV ČR, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, tscholz@paru.cas.cz

Skřivánek Miloslav, MVDr., CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 00 Brno, skrivanek@vri.cz

Slepícková Ilona, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany vod, Ústav komplexních systémů, Zámek 136, 373 33 Nové Hradky, slepickova@frov.jcu.cz

Stará Alžběta, Ing., Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany vod, Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, staraa01@frov.jcu.cz

Struhár Viktor, MVDr., Krajská veterinární správa Státní veterinární správy pro Liberecký kraj, Ostašovská 521, 460 01 Liberec, v.struhar.kvsl@svschr.cz

Svoboda Marek, MVDr., Krajská veterinární správa Státní veterinární správy pro Plzeňský kraj, Družstevní 1846/13, 301 00 Plzeň, m.svoboda.kvsp@svschr.cz

Svobodová Zdeňka, prof. MVDr., DrSc., Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, svobodovaz@vfu.cz

Šatrán Petr, MVDr., Ph.D., Státní veterinární správa, Slezská 7/100, 120 56 Praha 2, p.satran@svschr.cz

Švihel Michal, MVDr., Krajská veterinární správa Státní veterinární správy pro Liberecký kraj, Ostašovská 521, 460 01 Liberec, v.svihel.kvsl@svschr.cz

Uzlová Eva, MVDr., Krajská veterinární správa Státní veterinární správy pro Kraj Vysočina, Rantířovská 22, 586 05 Jihlava, e.uzlova.kvsj@svschr.cz

Váagnerová Marie, MVDr., Státní veterinární správa, Slezská 7/100, 120 56 Praha 2, m.vagnerova@svschr.cz

Velíšek Josef, dr hab. Ing., Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany vod, Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, velisek@frov.jcu.cz

Veselý Tomáš, Ing., CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 00 Brno, vesely@vri.cz

Zusková Eliška, MVDr., Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany vod, Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, zuskova@frov.jcu.cz



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

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

ISBN 978-80-7514-029-6

Vydání a tisk sborníku je uskutečněno za finanční podpory projektu
OP Rybnářství 2007–2013:



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ RYBNÁŘSKÝ FOND
„Investování do udržitelného rybolovu“