

VÝZKUMNÝ ÚSTAV RYBÁŘSKÝ A HYDROBIOLOGICKÝ
VODŇANY

Z. POSPÍŠIL, J. TOMÁNEK a kol.

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

EDICE

METODIK



VÝZKUMNÝ ÚSTAV RYBÁŘSKÝ A HYDROBIOLOGICKÝ

Z. POSPÍŠIL, J. TOMÁNEK a kol.

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

č. 27

VODŇANY
1988

O b s a h :

	strana
1. Úvod	3
2. Vnímavost k infekci	3
3. Etiologie	4
4. Vznik onemocnění a jeho průběh	5
5. Klinické příznaky a patologické změny	7
6. Laboratorní diagnostika IPN	8
6.1 Odběr a zpracování materiálu k izolaci viru	
6.2 Buněčné kultury, jejich kultivace a infekce	9
6.3 Kokultivace buněk	10
6.4 Identifikace viru IPN	10
6.4.1 Imunofluorescenční vyšetření	11
6.4.2 Enzymoimunologická /ELISA/ metoda diagnostiky IPN	12
6.4.3 Elektronová mikroskopie	12
6.5 Průkaz viru IPN v zevním prostředí	12
7. Stanovení diagnózy a diferenciální diagnostika	12
7.1 Hydrochemické příčiny	13
7.2 Otravy	13
7.3 Alimentární příčiny a intoxikace	14
7.4 Parazitární onemocnění	14
7.5 Bakteriální onemocnění	15
7.6 Virová onemocnění	15
8. Léčba IPN	16
9. Prevence	16
10. Dezinfekce	18
11. Opatření při zjištění IPN	18

1. Úvod:

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

Diagnostika onemocnění je založena na zhodnocení klinických a patomorfologických příznaků u nemocných ryb, především však na laboratorním potvrzení výskytu viru IPN. To spočívá buď v přímé izolaci viru na vnímavých rybích buněčných kulturách nebo na průkazu viru imunofluorescenčním /IF/ či enzymoimunologickým /ELISA/ testem, průkazu viru v elektronovém mikroskopu, případně na detekci specifických antivirových protilátek.

Na vypracování metod diagnostiky a prevence infekční nekrózy pankreatu se pod koordinací MVDr. Z. Pospíšila, CSc. a MVDr. J. Tománka, CSc. z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně podíleli: MVDr. M. Hornich, CSc., MVDr. L. Rodák, CSc., MVDr. L. Valíček, CSc., MVDr. T. Obr /všichni VÚVeL Brno/, MVDr. J. Zajíček /inspektor Státní veterinární správy pro ryby, České Budějovice/.

2. Vnímavost k infekci:

Virus infekční nekrózy pankreatu vyvolává typické příznaky onemocnění především u lososovitých ryb. V našem zeměpisném pásmu z nich přichází v úvahu zejména pstruh duhový, pstruh obecný, siven americký, siven alpský a další lososovité ryby. U nás byl virus IPN doposud izolován z pstruha duhového a sivena amerického z umělého chovu a u pstruha obecného a lipana podhorního z volných vod. Jiné druhy ryb a případně i měkkýši mohou být k infekci

virem IPN rovněž vnímavé, ke klinickému onemocnění u nich však nedochází. Virus IPN byl prokázán dokonce i u ptáků a některých savců. Význam viru IPN pro tyto netypické hostitele není dostatečně objasněn, jeho přítomnost u nich však může hrát závažnou roli v šíření, případně v přetrvávání infekce.

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

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

3. Etiologie:

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

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

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

Z epizootologického hlediska mají v Evropě největší význam 2 nejčastěji se vyskytující, sérologicky odlišné

sérotypy Sp a Ab. Subtyp Sp vyvolává u plůdku pstruha duhového vyšší mortalitu, zatímco po infekci subtypem Ab má infekce mírnější průběh. Pro experimentální posouzení virulence viru IPN je důležitý poznatek, že i po relativně nízkém počtu pasáží na buněčných kulturách se virus stává pro pstruží plůdek avirulentním.

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

4. Vznik onemocnění a jeho průběh:

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

Zvláště významným faktorem při vzniku IPN může být samotný výtěr generačních ryb - vironosičů. Cesta přenosu infekce z rodičů na potomstvo byla u ryb potvrzena teprve nedávno a detailně byla studována právě u infekční nekrózy pankreatu. Bylo prokázáno, že jak jikry a ovariální tekutina, tak sperma infikovaných pstruhů obsahují virus IPN, který může přímo infikovat potomstvo. Dosud však nebylo definitivně objasněno, zda je virus lokalizován uvnitř jikry nebo na jejím povrchu. Práce vypracované na rastrovacím mikroskopu však spíše nasvědčují tomu, že je virus IPN lokalizován na povrchu a že se dovnitř dostává při "tvrdnutí" obalu jikry po oplození.

Při vyšetřování v ohnisku IPN byl prokázán virus z jiker pstruha duhového 2 dny po oplození, z živých i odumřelých jiker ve stadiu očních bodů, u vykuleného

váčkového plůdku a u plůdku po rozkrmení při klinickém onemocnění. Virus IPN je tedy prokazatelně přítomen po celou dobu vývoje alespoň u části potomstva vironosičů. Pro plůdek, který je zpočátku prostý viru, mohou být zdrojem nákazy obaly z vykultivovaných jiker, na kterých prokazatelně virus po řadu dnů přežívá.

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

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

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

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

Otázky protilátkové odpovědi ve vztahu k rezistenci a vironosičství nejsou doposud jednoznačně osvětleny. Bylo sice ověřeno, že vironosiči mají buďto nízký titr protilátek, nebo jsou zcela bez protilátek, a že u pstruhů s vysokým titrem virusneutralizačních protilátek nebyl

virus izolován vůbec, nebo jen v nízkém titru. Proč však stejně infikované ryby jednou reagují na virový antigen tvorbou protilátek a jiné nereagují a stávají se vironosiči, nebylo zatím osvětleno. Zdá se pravděpodobné, že je to následkem imunologické tolerance.

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

5. Klinické příznaky a patologické změny:

Onemocnění začíná většinou náhle u rychleji rostoucích jedinců při teplotách vody do 14 °C. Jedním z prvních příznaků onemocnění bývají poruchy v plavání, představované nejčastěji spirálovitým otáčením nemocného plůdku kolem podélné osy. Později leží plůdek na boku a často klesá ke dnu nebo je odtékající vodou přitlačen na mřížku u výtoků.

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

Histopatologické nálezy:

V akutní fázi onemocnění je u plůdku možno na sliznici jícnu, žaludku, přední a zadní části střeva a na pylorických přívěscích zjistit akutní až nekrotický zánět.

V počátečních fázích se zánět projevuje různě výrazným zduřením epiteliálních buněk a silným vylučováním hlenu. V pokročilejším stadiu choroby dochází ke kompletní nekróze spojené s karryorexis jader a k odlupování sliznice. Histologický obraz vykazuje na povrchu sliznice eozinofilní červené nekrotické masy s bazofilními modrými pruhy jaderových zbytků. Infiltraci lamina propria zánětlivými buňkami jsme nikdy nezjistili.

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

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

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

Upozornění:

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

6. Laboratorní diagnostika IPN:

6.1 Odběr a zpracování materiálu k izolaci viru:

Vyšetřování se provádí u plůdku ve 2. - 4. týdnu po začátku rozkrmování a opakuje se po 4 týdnech. Vybírají

se především ryby klinicky nemocné a z konce odchovného žlabu. Početnost vzorku - 10 - 15 ks. Virologicky je možno též vyšetřovat jikry ve stadiu očních bodů, jikry a plodovou vodu jikernaček při výtěru a mlíčí.

Odlov nemocných ryb - u IPN se jedná především o plůdek - se provádí bezprostředně před jejich převozem do laboratoře. Vzhledem k tomu, že nemocné ryby jsou málo odolné, je vhodné je převážet zejména na větší vzdálenosti v plastickém vaku pod kyslíkovou atmosférou. Uhybnulé ryby se k virologickému vyšetření nehodí.

Pokud je možno zajistit sterilní odběr vzorků, lze k vyšetření odebrat a transportovat pouze orgány /slezinu, ledviny a pylorické výběžky s pankreatem/, vložené do některého z kultivačních médií /Hanks, Earle, MEM/ s antibiotiky. Nelze-li vyšetření provést okamžitě, je vhodnější skladovat orgány v médiu maximálně do 3 dnů při teplotě 4 °C, než je zmrazit v mrazničkové teplotě při -15 °C. Další skladování vyžaduje teplotu -60 až -70 °C. Přeprava odebraných vzorků v 50 % glycerinu, jak bylo dříve doporučováno, není vhodná, z diferenciálně diagnostického hlediska znemožňuje případný záchyt jiných virů.

K izolaci viru IPN jsou nejvhodnější ledviny, slezina a případně pylorické výběžky s pankreatem, v indikovaných případech i jikry anebo mlíčí. U plůdku do velikosti 5 cm lze k virologickému vyšetření použít celé tělo bez hlavy a ocasu.

Z odebraných orgánů, případně částí těla se ve třech miskách připraví desetiprocentní suspenze v některém z kultivačních médií /Hanks, Earle, MEM/ bez séra, do kterého se přidá nejméně 5x více antibiotik /500 m.j. penicilínu a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ streptomycinu/. Orgánová suspenze se ponechá po dobu 4 - 6 h v lednici při teplotě 4 °C a poté se odstředí při 3 000 ot.min⁻¹. Takto získaná tekutina se použije k infekci buněčných kultur.

6.2 Buněčné kultury, jejich kultivace a infekce:

K virologickému vyšetření lososovitých ryb lze vhodně využít linie buněčných kultur RTG-2 /linie z varlat pstruha

duhového/, PG /linie z gonád štiky/, CHSE /linie, z embryonálních buněk lososa/ a-BF₂ /linie z ryby slunečnice/, případně další.

Pro správný růst buněk je velmi důležitá teplota kultivace. Nejvhodnější je rozmezí mezi 16 - 20 °C, přičemž rostoucí buňky je vhodné kultivovat při horní hranici, narostlé a infikované kultury při dolní hranici.

Narostlé buněčné kultury, ne starší než 3 - 4 dny, se infikují orgánovou suspenzí v původním ředění 1 : 10 a v případě použití suspenze z celých těl plůdku i v ředění 1 : 100, abychom snížili nebezpečí kontaminace.

Buňky ve zkumavkách se denně po dobu 5 - 6 dnů prohlížení pod mikroskopem s cílem zjistit případný cytopatický efekt. Pokud se objeví cytopatický efekt již v primoizolaci, je vhodné provést další pasáž, aby se vyloučil případný cytotoxický efekt orgánové suspenze.

V případě, že se v 1. pasáži cytopatický efekt neobjeví, provedou se další 2 slepé pasáže, než je vzorek prohlášen za negativní. /Jedna pasáž je sledována po dobu 10 dnů./

6.3 Kokultivace buněk:

Metoda kokultivace umožňuje zvýšenou citlivostí průkaz viru nejen u plůdku, ale i u starších kusů bez klinických příznaků onemocnění, které mohou dlouhodobě vylučovat virus. Její princip spočívá v současné kultivaci vnímavých rybích buněčných linií s buňkami uvolněnými trypsinací z parenchymatózních orgánů. Umožní se tím snažší přestup viru z buněk hostitele do buněk tkáňové kultury a prakticky se odstraní nebezpečí neutralizace sledovaného viru případnými protilátkami.

6.4 Identifikace viru IPN:

Po objevení se cytopatického efektu lze provést první orientační vyšetření v elektronovém mikroskopu /viz kap.

6.4.3/. Jeho výsledek poskytne předběžnou identifikaci

morfologickým určením virové skupiny. Přesná identifikace virových izolátů se provede křížově virusneutralizačním testem nebo imúofluorescencí /viz kap. 6.4.1/ pomocí specifických antisér, připravených proti referenčním kmenům. Tato séra lze využít i při identifikaci v imunoelektronové mikroskopii.

6.4.1 Imunofluorescenční vyšetření:

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

a/ Identifikace viru

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

b/ Přímý průkaz viru v orgánech

K průkazu viru přímo v orgánech se vzorky fixují ve vychlazeném acetonu. Plůdek do velikosti 3 cm se po usmrčení vpichem do hlavy fixuje celý, u většího plůdku se před fixací ustříhne hlava a kaudální část těla. Z větších kusů se odebírají jednotlivé orgány, a to žábry, pylorické přívesky s pankreatem, žaludek a střeva, přední a zadní ledviny. Od doby odběru do doby fixace nesmí uplynout více než 5 min.

U nemocného plůdku se virus v akutních případech prokazuje hlavně v epiteliálních buňkách střevního traktu, u Pd₁₋₂ pak v cytoplasmě epiteliálních buněk primárních ledvinných tubulů a v cytoplasmě epiteliálních buněk acinů pankreatu.

Specifitu fluorescence je nutno prověřovat souběžným kontrolním vyšetřením použitých ingrediencí.

6.4.2 Enzymoimunologická /ELISA/ metoda diagnostiky IPN:

Tento diagnostický postup je založen na průkazu viru IPN v homogenizátech ryb nebo jejich orgánů pomocí imunoenzymatické reakce. Provedení ELISA metody nevyžaduje sterilní podmínky a je možné v běžné sérologické laboratoři.

K vyšetření lze použít orgánovou suspenzi používanou k infekci buněčných kultur /viz kap. 6.1/ nebo si připravit homogenizáty pouze v 5 - 10 objemech pufrovaného fyziologického roztoku bez nároků na sterilitu. Je vhodné homogenizát před použitím zmrazit a po rozmražení zcentrifugovat. K vyšetření se používá supernatant.

6.4.3 Elektronová mikroskopie:

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

6.5 Průkaz viru IPN v zevním prostředí:

Virus IPN lze v bahně zemních rybníčků a kalu z odchovných zařízení izolovat pomocí srážení biologicky aktivních látek síranem hlinitým a následnou infekcí vnímavých buněčných kultur.

Na stejném principu lze izolovat virus i z vody; odpadají však první úkony spojené s resuspendováním kalu či bahna a složitým odstraňováním nečistot. K tomu, aby tuto metodu bylo možno použít v praxi, zbývá ještě stanovit hraniční ředění viru, při kterém je jej možno ještě při izolaci zachytit.

7. Stanovení diagnózy a diferenciatní diagnostika:

Diagnóza se stanoví na základě klinického, patologického, epizootologického a virologického vyšetření zhodnocením výše popsaných příznaků a nálezů, při současném vyloučení jiných příčin.

Chovy lososovitých ryb se po vyšetření rozdělí do 3 skupin:

1. chovy prosté IPN,
2. chovy virologicky pozitivní, ale bez klinických příznaků onemocnění,
3. chovy s výskytem IPN.

Aby mohl být chov uznán jako prostý IPN, musí být každý rok provedeno virologické vyšetření s negativním výsledkem.

Chov virologicky pozitivní, ale bez příznaků onemocnění, je takový, kde je virologické vyšetření jiker nebo ryb pozitivní, ale nedochází ke ztrátám. Úroveň denních ztrát nesmí překročit 1 promile a všechny případné ztráty vyšší musí být odborně posouzeny a zjištěna jejich příčina.

V chovu s výskytem IPN se vyskytují klinické projevy onemocnění potvrzené virologicky.

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

7.1 Hydrochemické příčiny:

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

7.2 Otravy:

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

7.3 Alimentární příčiny a intoxikace:

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

7.4 Parazitární onemocnění:

Mikroskopickým vyšetřením seškrabu kůže a žaber je nutno vyloučit invazi *Ichthyobodo necator*, který se může silně pomnožit zejména ve zhuštěných obsádkách u plůdku oslabeného jinými faktory /nižší pH, nevhodná výživa apod./.

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

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

7.5 Bakteriální onemocnění:

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

7.6 Virová onemocnění:

Z virových onemocnění je nutno vyloučit virovou hemoragickou septikemii /VHS/, která postihuje různé věkové kategorie pstruha duhového a sivena amerického /experimentálně lze infikovat i pstruha obecného/. Původcem je virus zařazený do skupiny rabdovirů. Od původce IPN se liší morfologicky a sérologicky; množí se i v buněčných kulturách FHM. Patologické změny u postižených ryb jsou charakterizovány drobnými krváceninami na serózech i na povrchu těla. Při akutním průběhu u mladších ryb je řada klinických a patologických příznaků obdobná jako u IPN. Při protražovaném onemocnění lze zjistit zduření ledvin, exophthalmus a anémii žaber. Rozhodující pro diagnózu je výsledek virologického vyšetření.

Z dalších virových onemocnění připadá v úvahu infekční hemopoetická nekróza, která postihuje pstruha duhového a další lososovité ryby chované v Severní Americe. Toto onemocnění nebylo doposud ve střední Evropě zjištěno. Původcem

je virus ze skupiny rabdovirů, který se liší od VHS především sérologicky, morfologické rozdíly viru nejsou při běžném vyšetření postřehnutelné. Klinické příznaky mohou být obdobné jako u IPN a VHS, patologické změny postihují zejména krvetvornou tkáň ledvin.

8. Léčba IPN:

Zaručeně účinná léčebná metoda u infekční nekrózy pankreatu není ve světě známa. V literatuře jsou sice údaje o zábraně množení viru IPN v buněčných kulturách po aplikaci dihydroxypropyl adeninu /S-DHPA/ a je zvažována vhodnost jeho použití v rybích sádkách, v praxi však nebyl zmíněný antivirový účinek zatím potvrzen. Další literární prameny uvádějí použití polyvinylpyrolidon jódu pro prevenci IPN v době zvýšeného nebezpečí onemocnění, a to v dávce 1,6 - 1,9 g na 1 kg živé hmotnosti ryb denně po dobu 15 dní; metoda se však v širším praktickém využití zatím neuplatnila.

9. Prevence:

Základem úspěšné prevence je dodržování všech protinákazových opatření již ve zdravých chovech. K převozu a nákupu ryb musí být vystaveno veterinární osvědčení o zdravotním stavu ryb, zvláště pak že pocházejí z prostředí prostého infekčních chorob.

Největší nebezpečí představuje zavlečení nákazy návozem cizích ryb neznámého původu, zdánlivě bez klinických projevů onemocnění. Proto jakékoliv převážené a nakupované ryby musí být umístěny po dobu jednoho roku do karanténních nádrží. V této době je nutno všestranně sledovat jejich zdravotní stav.

Z protinákazového hlediska je nejvhodnější uzavřený obrat hejna, případně podle provozních podmínek turnusový způsob chovu. Při výběru remontních a generačních ryb musí chovatelé vzhledem k vironositvím vycházet pouze z prošetřených, nákazy prostých chovů. Je třeba brát v úvahu,

že ryby, které onemocněly v raném věku a nákazu přežily nebo se s infekcí setkaly až v dospělém věku, mohou být nosiči viru po celý další život, což z nákazového hlediska hraje velmi významnou roli. Vzhledem k tomu, že vironosiči vylučují virus výkaly a dalšími exkrementy, je nutno chovat remontní a generační ryby odděleně od dalšího provozu tak, aby nemohly přijít do styku s vodou vytékající ze žlabů nebo nádrží, ve které mohou být infikované ryby. Kde to vyžaduje situace, zřídí příslušné OVZ na zdroji vody pro tento chov veterinární ochranné pásmo, aby byla záruka, že ryby vysazované do těchto vod nebudou zdrojem nákazy.

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

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

Likvidaci uhynulých ryb provádět buďto v kafilerii nebo v případě menšího množství zakopáním. Jáma musí být dostatečně hluboká i vzdálená od objektů. Dno jámy se vysype nejdříve páleným nebo chlorovým vápnem, poté se do ní uloží uhynulé ryby, které se opět posypou stejným dezinfekčním prostředkem, jáma se zasype hlínou, která se důkladně udusá. Nemocné nebo uhynulé ryby nelze zkrmovat starším ročníkům /virus IPN není ničen ani při pH 3,0/, které se mohou stát vironosiči, aniž klinicky onemocní.

10. Dezinfekce:

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

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

Upozornění:

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

K dezinfekci jiker je z dostupných prostředků nejvhodnější Jodonal, který se používá v dávce 2,85 - 5,7 ml.l⁻¹ vody po dobu 7 - 15 min. Množství dezinfekčního roztoku má být objemově 10krát více než jiker. Jodonal je vysoce účinný i na dezinfekci nářadí apod., ale vzhledem k jeho vyšší ceně se jej pro tyto účely nepoužívá.

11. Opatření při zjištění IPN:

IPN je nákazou zvířat a proto se při jejím zjištění postupuje podle veterinárních předpisů. Jde především o zákaz přesunů všech ryb a jiker z postiženého chovu a do něho. Tržní ryby mohou být přesunovány pouze ke zpracování. V chovu se provádí

dí soustavná ohnisková dezinfekce. K likvidaci nákazy vypracovává chovatel spolu s veterinární službou ozdravovací plán. Chov může být prohlášen za zdravý po provedení závěrečné dezinfekce a jestliže v pozorovací době 2 roků nedošlo k výskytu onemocnění.

Adresa vedoucích autorů:

MVDr. Zdeněk P o s p í š í l , CSc.

MVDr. Josef T o m á n e k , CSc.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství,

Hudcova 70, 621 32 Brno

Schváleno Státní veterinární správou MZVŽ ČSR v srpnu 1987.

Lektorovala:

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

V edici Metodik vydal Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech - Redaktor: R. Berka - Náklad: 500 výtisků - Povolení k tisku: JČKNV, odb. kultury, č. 0330027587 - Tisk: JČ. tiskárny, n.p., provoz Strakonice - Předáno do tisku: prosinec 1987