

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybnářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický

Bakalářská práce

**Hematologické vyšetření ryb po antiparazitární
léčbě**

Autor: Jan Janík

Vedoucí bakalářské práce: MVDr. Eliška Zusková, PhD.

Konzultant bakalářské práce: MSc. Bernard Erasmus

Studijní program a obor: Rybnářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: 3.

České Budějovice, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci na téma “Hematologické vyšetření ryb po antiparazitární léčbě” vypracoval samostatně pouze na základě níže uvedených pramenů a literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 7.5.2019

podpis studenta

Poděkování

V první řadě bych rád poděkoval své vedoucí bakalářské práce MVDr. Elišce Zuskové, PhD., za ochotu, odbornou pomoc a čas, který mi poskytla při zpracování mé práce. Dále děkuji svému konzultantovi MSc. Bernardu Erasmovi za odborné vedení. Děkuji také své rodině a přátelům, kteří mi byli při psaní bakalářské práce velkou oporou.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta rybářství a ochrany vod
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jan JANÍK**
Osobní číslo: **V16B006P**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Hematologické vyšetření ryb po antiparazitární léčbě**
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Péče o dobrý zdravotní stav ryb je jedním z limitujících faktorů kvalitního odchovu. V současné době nejsou k dispozici žádná registrovaná endoparazitární léčiva pro hospodářské druhy ryb. Pro rybářskou praxi je zvláště citelná absence registrovaného léčiva proti motolicím ryb. Léčiva používaná v akvakultuře jsou podrobována přísnému posuzování, zejména s ohledem na jejich bezpečnost použití a účinnost. Avšak vzhledem k legislativnímu systému Evropské Unie jsou náklady spojené s registrací nových léčiv příliš vysoké a pro farmaceutické firmy je registrace a výroba léčivých přípravků pro tak úzce zaměřenou odbytovou skupinu, jako jsou ryby, neekonomická (Treves-Brown, 1999). Cílem práce je posoudit a ověřit vliv vybraného antiparazitika - fenbendazolu na zvolené hematologické ukazatele amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*) nakaženého motolicí oční. Na podkladě zjištěných výsledků pak bude navrženo a zdůvodněno aplikační schéma fenbendazolu pro ryby.

Metodický postup: Ryby budou vystaveny odlišným koncentracím fenbendazolu. Po několikaleté opakovaně prováděné expozici fenbendazolu bude rybám odebrána krev na hematologické vyšetření a ryby budou parazitologicky vyšetřeny. Na podkladě hematologického a parazitologického vyšetření bude posuzován vliv aplikovaného fenbendazolu na zdravotní stav ošetřených ryb.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby (do 10 stran)**

Rozsah pracovní zprávy: **30-50 stran**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Treves-Brown KM. 2000: Applied Fish Pharmacology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht , 310 s.

Svobodová Z., Gelnarová J., Justýn J., Krupauer V., Máchová J., Simanov L., Valentová V., Vykusová B., Wohlgemuth E. 1987: Toxikologie vodních živočichů. Vydavatelství MZVŽ a CSR, Praha, 231s.

Svobodová Z. 2007: Nemoci sladkovodních a akvariálních ryb. 4. vyd., Informatorium, Praha, 264 s.

Svobodová Z., Pravda D., Paláčková J. 1986: Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb. Edice metodik, VÚRH Vodňany 22, 36 s.

Kouřil J, Svobodová Z, Vykusová B, Hamáčková J. 1984: Antiparazitární a protiplísňové koupele raného plůdku kapra, býložravých ryb a sumce. Edice metodik, VÚRH Vodňany 8 s.

Noga EJ. 1995: Fish Disease. Diagnostic and Treatment. Mosby-Year Book, St. Louis, 367 s.

Řehulka J 2006: Hematologická a biochemická charakteristika krve ryb při zdravotních poruchách a změnách výživy. habilitační práce (http://oldwww.upol.cz/fileadmin/user_upload/PrF-dokumenty/Vedecka_rada/Habilitace_a_profesury/Rehulka_Jiri/hab.prace-Rehulka.pdf)

Vedoucí bakalářské práce: **MVDr. Eliška Zusková, Ph.D.**


Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant bakalářské práce: **MSc. Bernard Erasmus**


Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání bakalářské práce: **5. ledna 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. května 2019**


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Začíslí 728/II
389 25 Vodňany (2)


prof. Ing. Tomáš Randák, Ph.D.
ředitel

Obsah

1	ÚVOD	7
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
2.1	ZDRAVOTNÍ STAV RYB	8
2.2	AMUR BÍLÝ (<i>CTENOPHARYNGODON IDELLA</i>)	9
2.3	MNOHOBUNĚČNÍ – METAZOA.....	10
2.4	MOTOLICE	10
2.5	MOTOLICE OČNÍ (<i>DIPLOSTOMUM SPATHACEUM</i>)	13
2.5.1	<i>Diplostomóza</i>	15
2.5.2	<i>Možnosti léčby</i>	16
2.5.3	<i>Léčivé přípravky</i>	18
2.5.4	<i>Prevence</i>	21
2.6	DIAGNOSTIKA.....	23
2.6.1	<i>Parazitologické vyšetření</i>	23
2.6.2	<i>Hematologické vyšetření</i>	24
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1	MATERIÁL A METODIKA	30
4	VÝSLEDKY	39
5	DISKUZE	43
6	ZÁVĚR	46
7	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	47
8	SEZNAM TABULEK	53
9	SEZNAM OBRÁZKU A GRAFŮ	53
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	54
11	ABSTRAKT	55

1 Úvod

Cílem předkládané bakalářské práce je posoudit a ověřit vliv fenbendazolu a praziquantelu (antiparazitika) na zvolené hematologické ukazatele u zástupců ryb čeledi kaprovitých (*Cyprinidae*) - amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*), nakaženého motolicí oční (*Diplosotomu spathaceum*). Hlavní přínos spočívá v analýze hematologických ukazatelů a vyvození poznatků o léčbě tohoto častého parazitárního onemocnění. Dále bude posuzován vliv aplikovaného fenbendazolu a praziquantelu na zdravotní stav ošetřených ryb. Na podkladě zjištěných výsledků poté bude navrženo a zdůvodněno aplikační schéma těchto léčiv pro ryby.

Téma bakalářské práce jsem si vybral, protože zdravotní stav ryb považuji za jeden z nejvíce limitujících a velmi podstatných faktorů v odchovu ryb. Na území ČR není v současnosti registrováno žádné parazitární léčivo pro hospodářské druhy ryb, proto je velmi důležité zjišťovat účinnost, využití a dopady aplikace léčivých přípravků působících na problematické infekce cílových druhů zvířat, v našem případě ryb. Rovněž jsem se chtěl seznámit se způsoby diagnostiky a následné léčby parazitárních onemocnění u ryb.

2 Literární přehled

2.1 Zdravotní stav ryb

Pod pojmem zdraví ryb si lze představit normální fyziologickou činnost jednotlivých orgánů a potažmo i celého organismu. Zdravotní stav ryb je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících chov ryb, který je třeba důsledně sledovat a kontrolovat. Zdravotní stav ryb hodnotíme v jejich přirozeném prostředí a posuzujeme zejména vzhled žaber, kůže, očí a všech částí viditelných pouhým okem (*Branson, 2008*).

Zhoršením zdravotního stavu ryb, na základě snížení odolnosti organismu, výživové kondice nebo vlivem fyzikálních (teplota, pH), chemických (výskyt těžkých kovů či kyselin) a mechanických (poškození kůže, jiná poranění) faktorů, může dojít k onemocnění ryb (*Lotocki, 2011*). Nemoci ryb pak můžeme definovat jako abnormální stav, charakterizovaný postupnou degenerací rybí schopnosti udržovat normální fyziologické funkce (*Noga, 1996*). Nemoci ryb jsou nejzávažnějším omezujícím faktorem v akvakultuře. Vzhledem ke stále zvětšující se snaze o vyšší výtěžnost v akvakultuře, narůstá hustota obsádek a snadno se tak přenáší patogeny z jedné ryby na druhou (*Brasard a kol., 1982*). Podle Rolbieckiho (*2006*) se druhotnost a hojnost onemocnění mění s věkem ryb a s kvalitou prostředí. Každá kategorie ryb je tedy vystavena jiným druhům onemocnění.

Z důvodu vysokých hospodářských ztrát způsobených právě nemocemi ryb, došlo v posledních desetiletích k pokroku ve znalostech především rybích parazitů, kteří mají špatný vliv na celkový zdravotní stav ryb (*Barassa a kol., 2003*). Těmto hospodářským ztrátám je nutné předcházet správnou a pravidelnou péčí o zdraví ryb (*Woo, 1998*).

2.2 Amur bílý (*Ctenopharyngodon idella*)

Amur bílý (*Ctenopharyngodon idella*) se řadí do třídy ryby (*Osteichthyes*), nadřádu kostnatí (*Teleostei*), řádu máloostní (*Cyprinyformes*) rodu *Ctenopharyngodon*, a čeledi *Cypriniae*.

Původním areálem rozšíření tohoto druhu je východní Asie, blíže tedy okolí měst Ning-po, Shanghai, jezero Tungling nebo Hunan. V této geografické rovině zaujímá Amur přední příčky v celosvětové produkci sladkovodní akvakultury. V celkovém objemu chovu přes 5 milionů tun je tato ryba nejvýznamnější chovaná ryba světa (*Lusk a kol., 2008*). V Rusku se nachází v povodí řeky Amur až po Kumary u Blagověščenska (*Baruš a Oliva, 1995*). Na naše území se dostal v 60. letech 20. století.

Amur bílý (*Ctenopharyngodon idella*) je typickou rybou žijící v hejnech, která ve volných vodách obývá převážně střední či dolní úseky toků řek nebo pomalu proudících vod, odkud podniká potravní migrace do vegetací zarostlých ramen. Je velmi plachým reofilním druhem (*Krupauer, 1989*). Potravu také vyhledává v litorální oblasti nádrží a vodních toků. Ideální potravní a pohybovou aktivitu vykazuje při teplotě 20-28 °C. Náhlou změnou teploty vody může dojít k dočasně omezenému příjmu potravy. Amur je velmi odolným druhem ryby. Je tolerantní vůči poklesu obsahu kyslíku ve vodě (0,5-0,9 mg. l⁻¹) a vyšší salinitě. Tyto vlastnosti mu umožňují přežít i v brakických vodách (*Hanel a Lusk, 2005*).

Amuří plůdek přijímá potravu v podobě jemného zooplanktonu, zoobentosu nebo řas, které postupně nahrazuje makrovegetací. Pro příjem tohoto druhu potravy je dokonale vybaven typickými požerákovými zuby.

Tělo má protáhlé až torpédovité, pokryté cykloidními šupinami. Širokou hlavu doplňují středně postavená ústa bez přítomnosti zubů a nízko posazené oči se zlatou barvou duhovky. Hřbetní část těla po celé délce lemuje tmavě zelená barva, přecházející do stříbřité barvy šupin až po světle bílé břicho.

Amur je typickým pelagofilním druhem ryby. V našem prostředí se nedokáže přirozeně vytrít, proto je jeho výskyt podpořen umělým výtěrem. Samci pohlavně dospívají ve staří 3 až 4 let, jikernačky o rok později. Ve výtěrovém období (červen) je u ryb patrný pohlavní dimorfismus. U mlíčáků je typická zdrsňená pokožka na prsních ploutvích. Jikernačky mají objemnou břišní partii. Jikry jsou silně bobtnavé a nelepivé, vznášející se ve vodním sloupci (*Dubský a kol., 2003*).

V akvakultuře se amur vysazuje do rybníků jako doplňková ryba v polykultuře s kaprem a línem. Ve vodním prostředí potlačuje rozvoj nežádoucí makrovegetace. V monokultuře se chová jen jako plůdek (*Hartman a Regenda, 2014*).

2.3 Mnohobuněční – Metazoa

V našich podmínkách se můžeme setkat se širokou škálou parazitárních onemocnění ze skupiny mnohobuněční - Metazoa. Mezi tyto mnohobuněčné parazity ryb spadají zástupci kmenů: ploštěnci (*Platyhelminthes*) – jednorodí (*Monogenea*), tasemnice (*Cestoda*), motolice (*Trematoda*), hlístice (*Nematoda*), vrtějši (*Acenthocephala*) a kroužkovci (*Annelida*) – pijavice (*Hirudinea*).

Všechny tyto kmeny ze skupiny mnohobuněčných (*Metozoa*) spojuje složitý vývojový cyklus zahrnující až několik mezihostitelů. Mezihostitele můžeme charakterizovat jako hostitelský organismus, kde daný parazit prochází přeměnou ve vývojovém stádiu. Všechny vývojové cykly mnohobuněčných končí v definitivním hostiteli. Definitivního hostitele můžeme charakterizovat jako organismus, ve kterém parazit dokončí svůj vývojový cyklus, pohlavně dospívá a začíná se rozmnožovat. Definitivní či finální hostitel se pak druhově liší podle jednotlivých zástupců kmenů (*Woo, 2006*).

2.4 Motolice

Motolice patří do třídy bezobratlých prvoústých živočichů, spadajících do kmene ploštěnců (*Platyhelminthes*). Vyznačují se složitým nepřímým vývojovým cyklem. Ve všech případech je první mezihostitel měkkýš, v dalších cyklech svého vývoje už se hostitel mezidruhově liší. Proto můžeme považovat měkkýše za velmi podstatný druh pro život motolic. Motolice dokáží být pomocí svých fyziologických, biochemických a vývojových vlastností úspěšnými cizopasníky s velkou variabilitou hostitelů. Ať už se jedná o ptáky, savce, člověka, plazi, paryby a ryby. Jsou zastoupeny ve všech typech ekosystémů napříč celým světem (*Kearn, 1998*).

Motolice jsou převážně hermafroditi s dvěma až třemi mezihostiteli. Dospělý jedinec produkuje až 300 vajíček denně. Vajíčka jsou tmavě hnědě zbarvená

s typickým silnostěnným oválným tvarem. Každé vajíčko obsahuje embryo (miracidium), které vyplňuje téměř celý jeho vnitřní prostor. Rýhování vajíčka probíhá už v děloze motolice nebo až ve vodním prostředí (Horák a Scholz, 1998). Hlavní úlohou vajíček je projít přes krevní řečiště do střeva nebo do močového měchýře, aby se mohla s exkrementy hostitele dostat do vodního prostředí (Toledo a Fried, 2014). Vajíčka nejsou u všech motolic stejná. Zástupci čeledi Notocotylidae mají na obou pólech vajíčka filameny neboli dlouhá vlákna (Ryšavý a kol., 1982). Vajíčka se ve vodním prostředí otevřou za pomoci víčka zvaného operculum (Volf a Horák, 2007). Výjimkou jsou zástupci motolic čeledi Schistomatidae, které otvírají vajíčko prasknutím stěny. Předčasnému otevření či prasknutí vajíčka zabraňují složité mechanismy vývojového cyklu (Horák a Scholz, 1998). Hlavními faktory, které spouští líhnutí vajíček, je změna osmotického tlaku, ale také teplota vody, světelná perioda, množství kyslíku a oxidu uhličitého ve vodě nebo pH (Toledo a Fried, 2014, Bernes, 1988). K vyloučení vajíčka z těla hostitele do vodního prostředí dochází močí, trusem nebo přes žábry (Toledo a Fried, 2014). Po tomto cyklu se objeví na povrchu vajíčka mnoho řasinek tzv. cilií z epidermálních destiček. Z vajíčka motolice se tak stává obrněná larva miracidium, která se aktivně pohybuje. Miracidie reagují na světlo, mají oční skvrny a pohárky s pigmentovými granulemi nebo čočkami (Horák a Scholz, 1998). Po vylíhnutí z vajíčka miracidie aktivně vyhledává mezihostitele-měkkýše. Tento proces trvá maximálně 12 hodin. Když v této době miracidie mezihostitele nenajde, dojde k vyčerpání energetických zásob glykogenu a miracidium umírá (Toledo a Fried, 2014). Ne všechna miracidia jsou schopna najít včas hostitele. Určité množství měkkýšů je vůči napadení imunní. To znamená, že miracidium do mlže nepronikne a dál pokračuje ve vyhledávání hostitele (Duras, 2014). Když maracidium ve vodním prostředí svého hostitele nalezne, vyhledává na jeho těle měkké tkáně - svalnaté nohy měkkýše. Tak je průnik motolic do těla měkkýšů co nejméně energeticky náročný. Pomocí proteolytických enzymů z hlavových žlázek i činností apikální papily (Horák a Scholz, 1998) trvá vstup do vnitřních tkání jen několik málo minut (Toledo a Fried, 2014). Opakované napadení stejného měkkýše je už mnohem jednodušší, protože měkkýš má oslabenou imunitu z předchozích útoků miracidii (Duras, 2014). Při vstupu do mezihostitele ztrácí miracidium své řasinky a začíná se přizpůsobovat tkáňovému prostředí. Přemění se v protáhlý útvar s velmi tenkou stěnou, který se přichytí ke stěně ledvin, střeva nebo

hepatopankreatu (*Horák a Scholz, 1998*). Toto vývojové stadium motolic nazýváme primární sporocysta. Ve sporocystě dochází k nepohlavnímu (asexuálnímu) dělení a vzniku mnoha sekundárních sporocyst. Kromě sekundárních sporocyst mohou vznikat také tzv. redie, které jsou charakteristické svou větší aktivitou a pohyblivostí než sporocysty. Přední část těla redie tvoří výběžky připomínající límec. Ten slouží jako pohybový orgán. Redie se usazují nejčastěji v trávicích žlázách měkkýše, kde působí značné škody tím, že požírají hostitelskou tkáň nebo i larvální stádia jiných motolic (*Horák a Scholz, 1998*). V každé sekundární sporocystě může vzniknout až několik tisíc cercárii. Jakmile jsou cercárie plně vyvinuty, opouštějí sekundární sporocystu a přesouvají se z měkkýše, pronikají přes měkké tkáně do vodního prostředí (*Toledo a Fried, 2014*). Množství vyprodukovaných cercárií záleží na velikosti měkkýše, pohybuje se v řádech několika stovek až po tisíce cercárií denně (*Duras, 2014*).

Ocas cercárií neslouží jen k pohybu, ale i jako opora při pronikání do kůže definitivního hostitele. Pomocí energeticky velice náročných stahů ocasu a těla se cercárie zavrtávají hlouběji do kůže hostitele. Ve svrchních vrstvách pokožky dochází k odloučení ocasu. U cercárií nejvíce studovaných druhů motolic bylo nalezeno několik typů buněk, např. smyslové, svalové nebo nervové. Po celé délce ocasu probíhá vylučovací trubice, která je zakončena vylučovacími póry. Podstatnou část objemu těla zaujímá acetabulární žláza a její obsah. Tyto žlázy produkují velké množství sekretu sloužícího k uchycení na povrchu kůže hostitele. Sekret také usnadňuje průnik skrz jednotlivé vrstvy pokožky. Během průniku jsou postupně zásoby sekretu vyčerpány a následně zanikají i žlázy. Cercárie mají krátkou životnost, stejně jako miracidium, nepřijímají potravu (viz níže). Jejich jediným cílem je infikovat vhodného definitivního hostitele (*Toledo a Fried, 2014*), kterého najdou pomocí chemických signálů (jedinečných pro každý druh). Cercárie samy o sobě nejsou moc pohyblivé (několik metrů za život), proto k lepšímu a samozřejmě rychlejšímu přenosu k hostiteli využívají povrch vody, která se díky větru vlní a umožní jim tak překonat vzdálenost více než 1 km (*Duras a kol., 2012*). Cercárie můžeme rozdělit podle dalšího vývoje na penetrující cercárie, které pronikají do konečného hostitele, nebo na metacercárie.

Po vstupu do kůže musí cercárie projít řadou morfologických a fyziologických změn a přizpůsobit se tak změně prostředí ze sladkovodního do prostředí tkáňových

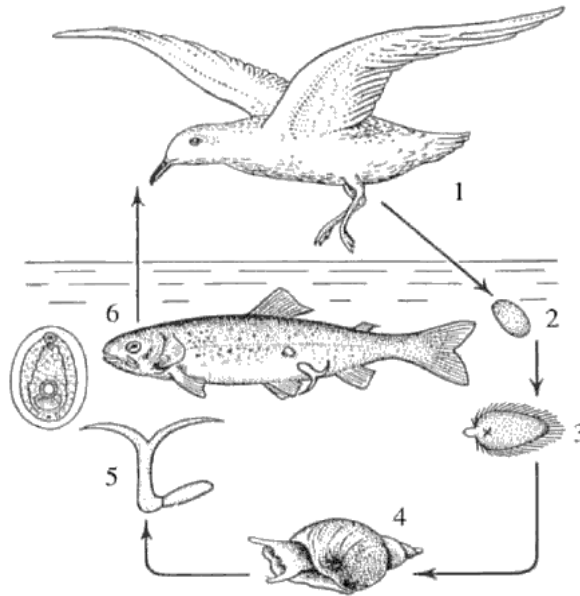
struktur. Z cercárií se stávají parazitující motolice. U některých druhů mohou motolice přežít až několik dní v kůži, než projdou do krevního řečiště (*Toledo a Fried, 2014*). Po dosažení vhodných podmínek začíná motolice růst (*Horák a Scholz, 1998*). Velikost dospělých motolic se liší u jednotlivých druhů, ale zpravidla platí, že samčí motolice jsou štíhlé a krátké, zatímco samičí jsou velmi robustní se silnými přísavkami. Délka těla samců se pohybuje v rozmezí 6-13 milimetrů, těla samic v rozmezí 10-20 milimetrů (*Toledo a Fried, 2014*). Motolicím, které působí jako paraziti v krevním oběhu, chybí přední i zadní přísavky, nemusí se přichycovat ke stěně orgánů, volně proudí s krví v cévách svého hostitele (*Lotocki, 2014*).

Nemoci, které způsobují motolice u ryb, jsou známé pod názvem trematodózy. Mezi závažná onemocnění u ryb řadíme motolice *Diplostomum spathaceum*, *Sanguinicola inermis* nebo *Sanguinicola aromata*, popřípadě *Posthodiplostomum cuticola*.

2.5 Motolice oční (*Diplostomum spathaceum*)

První zmínky o motolici oční *Diplostomum spathaceum* se objevily už na začátku 19. století, kde Rudolphi (*1819*) popisuje a charakterizuje tento druh. V roce 1951 už byl druh *Diplostomum* sp. rozšířen a potvrzen ve všech koutech Evropy, Asie, ale i v Severní Americe (*Markevič, 1949*). U mořských druhů ryb byla potvrzena přítomnost motolic o 7 let později, kdy se uvádějí nálezy metacercárií hned v několika mořích. Areál rozšíření se tedy rozrostl na Kaspické, Černé, Aralské a Baltické moře (*Poljanskij, 1958*). Podle některých poznatků se ve střední Evropě vyskytují pod názvem *Diplostomum spathaceum*, ale je pravděpodobné, že se vyskytuje více příbuzných druhů obtížně rozeznatelných. Proto se v některých zdrojích rozcházejí jejich názvy (*Scholz a Horák, 1998*).

Vývojový cyklus motolice oční (*Diplostomum spathaceum*):



Obr. č. 1: Životní cyklus motolice oční (*Diplostomum spathaceum*). Parazit se pohlavně rozmnožuje ve střevě rybožravých ptáků (1), ti uvolňují vajíčka (2), která se líhnou ve vodním prostředí (3). Miracidia infikují sladkovodní plže (4) a asexuálně se reprodukuje. Tak vzniknou tisíce cercárií (5) vyhledávající dalšího meziphostitele – rybu. Cercárie pronikají do ryb a usazují se v očních čočkách, kde se vyvíjí v metacercárie (6). Životní cyklus je dokončen poté, co nakaženou čočku pozře rybožravý pták (Dogiel a kol., 1961).

Motolice oční má komplexní životní cyklus, který začíná sexuální reprodukcí ve střevě rybožravých ptáků. Vajíčka motolice se pomocí ptačích exkrementů dostávají do vody, kde se volně líhnou. Počáteční stádium vývoje (vajíčka) tohoto druhu motolice je obdobný jako u ostatních druhů motolic popsanych v kapitole 2.4. Další fází vývoje je obrvená larva (miracidium), která po vylíhnutí aktivním způsobem vyhledává prvního meziphostitele, nejčastěji plovatku bahenní (*Lymnaea* sp.) nebo jiné druhy vodních plžů. Po aktivním nalezení meziphostitele se soustřeďuje na jeho měkké tkáně, nejčastěji svalnatou nohu. Díky měkké tkáni tak při vstupu do těla spotřebuje malé množství energie ze svých energetických zásob. V hepatopankreatu plovatky se dále vyvíjí až do stádia cercárie, které následně tohoto hostitele opouští. Už v nedávné historii bylo prokázáno, že aktivita cercárií je úzce spjata s teplotou vody a ročním obdobím (Sasmann, 1964). Cercárie se uvolňují z meziphostitelských plžů až při teplotě vody 10 °C. Se vzrůstající teplotou vody se zvyšuje počet uvolněných cercárií ve vodě, které vyhledávají dalšího meziphostitele.

Největší aktivitu cercárie vyvíjejí ve vodě o teplotě 18-22 °C (Svobodová a Faina, 1992). S klesající teplotou klesá i jejich aktivita. Schopnost přežití cercárií ve vodě je přibližně 48 hodin od chvíle, kdy opustí prvního hostitele. Hranice životaschopnosti může být též ovlivněna teplotou vody. Z výše uvedených informací vyplývá souvislost vývoje cercárií s ročním obdobím. Nelze ovšem vyloučit, že se *Diplostomum spathaceum* neobjeví ve vodním prostředí i v zimních měsících. Dalším mezihostitelem je velké množství druhů sladkovodních i mořských ryb s převahou čeledi ryb kaprovitých (*Cyprinidae*). Nejzávažnější potíže způsobuje v chovu lososovitých ryb a při odchovu plůdku býložravých ryb (Roberts a Shepherd, 1986). Naopak nejmenší intenzita napadení je patrná u lína obecného (*Tinca tinca*) (Svobodová a Faina, 1992). Poté co nalezne cercárie svého nového hostitele v podobě ryby, odpadá jí rozeklaný ocásek kvůli lepší pohyblivosti v krevním řečišti a proniká přes kůži nebo žaberními lístky do těla hostitele. Krevním oběhem poté doputuje až do oka, kde napadá oční čočku. Zde se odehrává další stádium vývoje – přeměna cercárií v metacercárie. Jde o proces, který trvá několik hodin až týdnů (Volf, 1952). Metacercárie jsou velmi podobné dospělým jedincům. V tomto stádiu dorůstá jedinec velikosti 0,4 až 0,5 mm. Nejčastěji se seskupují ve velkém počtu (několik desítek kusů) v místě přívodu krve drobnými cévami do čočky. Při masivní invazi může dojít k prasknutí rohovky, tím může dojít k propuknutí sekundární infekce a v neposlední řadě až smrti napadeného jedince (Našincová a kol., 1999). Při značném napadení také dochází k zákalu a poškození oka. Ryba se zhoršenou schopností zraku slábne, pohybuje se v prosvětlených a povrchových partiích vodního sloupce. Je tak ideální potravou pro finálního hostitele (rybožravé ptáky). Do konečného hostitele se tedy metacercárie dostávají společně s infikovanou potravou. V trávicí soustavě finálního hostitele se následně vyvine dospělý jedinec motolice, který je schopen pohlavního rozmnožování (Horák a Scholz, 1998).

2.5.1 Diplostomóza

Je onemocnění způsobené metacercáriemi motolice rodu *Diplostomum*. Ty jsou lokalizovány v oční čočce napadené ryby. Toto onemocnění způsobuje poškození zraku. Vzniká v důsledku napadení metacercáriemi, které se dostávají do oka krevním oběhem a následně setrvávají v oční čočce. Vstupní branou do těla ryb je pro parazita v podobě cercárie žaberní aparát, nebo kůže. V oční čočce se takto

může nashromáždit až několik desítek jedinců. Metacerkárie způsobují zakalení čočky, tím se napadené rybě zhoršuje zrak a vyhledává tak více prosvětlené části vodního sloupce. Napadené ryby se často pohybují u vodní hladiny, kde jsou snadnou kořistí pro rybožravé ptáky (Lotocki, 2014). V případě napadení plůdku jsou ryby výrazně neklidné. K úmrtí napadených jedinců však většinou nedochází. Výjimkou je akutní forma diplostomózy, kde dochází k masivnímu napadení ryb. Při chronické diplostomóze je průběh a příznaky onemocnění méně patrný. Změny jsou viditelné na očích, které se v případě lososovitých ryb mléčně zakalí, popřípadě silně ztmavnou. Lososovité druhy ryb žijící ve volných vodách jsou po napadení a zhoršení zraku vystaveny problému s příjmem potravy. Ryby chované v uzavřených systémech vykazují prokazatelně vyšší kvalitu výživného stavu, protože jim potrava bývá předkládána uměle a nemusejí ji vyhledávat. Zhoršení zraku a případná slepota jim tak nebrání v příjmu potravy v podobě granulových směsí (Svobodová, Faina, 1992).

2.5.2 Možnosti léčby

K léčbě diplostomózy, která se v aktuálním období odehrává na vlastní zodpovědnost veterináře, se využívají léčebné koupele nebo perorální aplikace léčiv blíže popsaných v následující kapitole (Léčivé přípravky).

Léčebné koupele ryb

Koupele ryb se nejčastěji provádí zejména při léčbě ektoparazitóz a bakterióz. Léčebná látka působí nejen na žábrách a kůži, kde se patogen nachází, ale vstřebává se i přes kůži a žábry do těla, kde působí na endoparazitární infekce. Problémem a komplikací při používání léčebných koupelí je jejich správná likvidace ve vztahu k životnímu prostředí. Při přípravě léčebné koupele je vždy nutné léčebný přípravek rozpustit v malém množství vody a teprve pak aplikovat do nádrže, ve které je koupel prováděna. Pro dávkování léčebných koupelí je nutné mít k dispozici váhy s přesností na 0,1 g.

Léčebné koupele můžeme charakterizovat jako aplikaci léčebného přípravku či látky do známého objemu vody. Do vody poté umístíme infikované ryby, čímž zajistíme rovnoměrné podání terapeutické látky. Tyto léčebné koupele používáme převážně k léčbě plísňových či bakteriálních onemocnění, kdy je zasažena kůže nebo

žaberní aparát ryb (*Adámek a kol., 2013*).

Tyto koupele rozdělujeme z časového hlediska do tří kategorií:

Koupele ponořovací, které patří k těm nejrychlejším, trvají maximálně 5 minut (*Svobodová a kol., 2007*). Z toho lze odvodit, že při těchto koupelích se používají nejvyšší přípustné koncentrace léčebných přípravků nebo látek. Tato koupel je vhodná pro ošetření menšího počtu ryb (*Svobodová, 2009*).

Koupele krátkodobé, které trvají v časovém rozmezí od 5 do 120 minut. Využívají vyšší účinné koncentrace léčebných prostředků v porovnání s další níže zmíněnou skupinou.

Koupele dlouhodobé, které trvají v časovém rozmezí od 120 minut až do několika dní. Tento druh koupelí se používá zejména k ošetření celých chovných nádrží a rybníků.

Před zařazením léčebných koupelí do technologických postupů je naprosto nezbytné provádět zdravotní vyšetření ryb a mít k dispozici výsledky včetně návrhu doporučené léčby (*Kolářová, Svobodová, 2009*).

Perorální aplikace

Perorální aplikaci léčiv můžeme charakterizovat jako podávání léčebných látek v krmivu. Další možností je individuální aplikace léčiv pomocí sondy zavedené do jícnu ryby. Tento způsob aplikace je zaměřen především na léčbu endoparazitóz. Žádný přípravek pro medikaci krmiva s obsahem účinných látek pro ryby není v ČR registrován, a tak se používá pro výrobu medikovaného krmiva buď premix s povolenou výjimkou, nebo se medikace provádí přímo na místě chovu ryb personálem, který krmivo připravuje podle instrukcí veterinárního lékaře. Nevýhodou této metody aplikace je nerovnoměrné dávkování léčiva jednotlivým rybám. V některých případech se můžeme také setkat s problémy souvisejícími s příjmem potravy u nakažených ryb. Znatelně lepší výsledky můžeme pozorovat u lososovitých druhů ryb chovaných v uzavřených systémech nebo klecových chovech. Krmivo totiž konzumují neprodleně po aplikaci ještě před dopadem medikovaných granulí na dno nádrže. Před perorální aplikací je nezbytné spočítat obsádku ryb a následně přepočítat denní krmnou dávku.

Injekční aplikace léčebných látek

Injekční aplikace léčiv se při parazitárních onemocněních téměř nevyužívá. Tato aplikace je nejpřesnější, ale zároveň nejkomplikovanější vzhledem k nutné manipulaci s rybami, která je pro ně stresující. U ryb se antiparazitika tímto způsobem aplikují pouze ve výjimečných případech do dutiny tělní (intraperitoneálně) nebo do hřbetní svaloviny (intramuskulárně) (Kolářová, Svobodová, 2009).

2.5.3 Léčivé přípravky

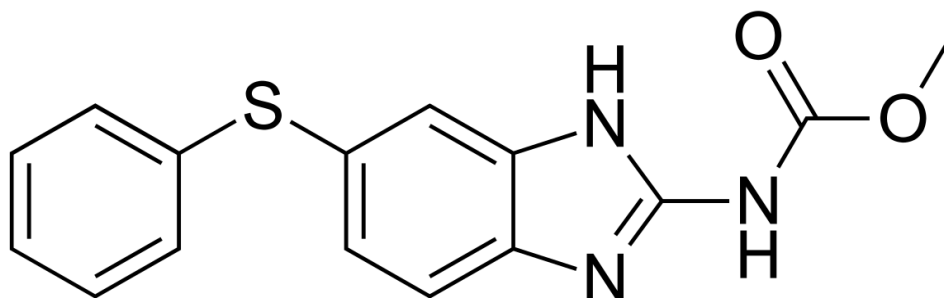
V současné době na území všech států EU, včetně České republiky není žádný registrovaný antiparazitární přípravek určený pro ryby. Chemické látky, které jsou používány v rybářské praxi, podléhají velmi podrobnému posuzování z hlediska bezpečnosti jejich užití v souvislosti s vlivem na životní prostředí. Zásadním a limitujícím faktorem v této problematice je legislativní systém nastavený Evropskou unií, kdy registrace nových léčiv je vysoce ekonomicky náročná. Pro farmaceutické korporace je pak nerentabilní zaměřovat se na tak úzkou tržní skupinu jako je akvakultura a ryby (Traves-Brown, 1999).

I přes rozsah a závažnost onemocnění způsobených helminty není na území EU a také Severní Ameriky povolen prodej a volné použití žádných účinných látek pro ryby. Přes řadu studií nebyla vyřešena otázka týkající se bezpečnosti spotřebitelů a životního prostředí (Traves-Brown, 2000).

Přes všechna tato mohou být funkční přípravky proti parazitárním onemocněním včetně diplostomózy předepisovány veterinárním lékařem na podkladě tzv. kaskády předepisování veterinárních léčiv. Kaskáda předepisování léčiv je systém využití registrovaných i neregistrovaných léčiv ve výjimečných případech na přímou odpovědnost veterináře. Pokud veterinář pravidel kaskády využije musí uchovat záznamy o průběhu léčby po dobu 5 let. U potravinových druhů zvířat dále stanoví ochranou lhůtu. U ryb se většinou jedná o lhůtu 500 denních stupňů neboli stupňodnů. Stupňodny jsou mírou ochlazení nebo oteplení. Množství stupňodnů je určeno znásobením teploty vody každý den počtem dnů. Například, 10 dnů při teplotě vody 5°C se rovná 50 stupňodnů (Předepisování v rámci kaskády. O ÚSKVBL [online]. Copyright © 2003 [cit.05.05.2019]. Dostupné z: <http://www.uskvbl.cz/cs/informace/proveterinaremen/kaskadamen>).

Fenbendazol

Fenbendazol je léčivá látka patřící do skupiny derivátů benzimidazolů.

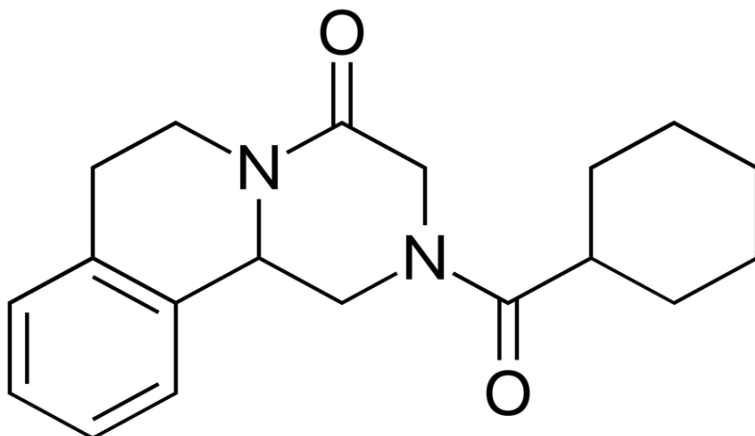


Obr. 2: Chemická struktura Fenbendazolu (*Dayan, 2003*)

Jak už bylo na úvod zmíněno, v žádné zemi EU ani v ČR není pro ryby registrovaný přípravek s účinnou látkou fenbendazol. Na našem území je registrovaný přípravek s účinnou látkou fenbendazol pouze pro ovce a kozy nesoucí název Panacur 25 mg/ml p.o. susp. (s množstvím 25 mg fenbendazolu v 1 ml). Přípravek je perorální suspenze, která se aplikuje přímo perorálně individuálně. Ve vodě se rozpouští velmi dobře. Léčebná koupel je poté mléčně zakalená. V některých případech může veterinární lékař použít toto širokospektrální anthelmintikum na vlastní odpovědnost za dodržení minimální OL 500 stupňodnů jako léčivo určené pro jiná potravinová zvířata. Fenbendazol působí na nervový systém parazita a likviduje jeho energetický metabolismus (*Traves-Brown, 2000*). Toto léčivo bude předmětem mého výzkumu.

Praziquantel

Jako heterocyklická dusíkatá sloučenina se řadí do skupiny chinolinových derivátů nesoucí systematický název 2-cyklohexylkarbonyl-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isochinolin-4-on (Cioli a Pica-Mattoccia, 2003).



Obr. 3: Chemická struktura Praziquantelu (Dayan, 2003)

Praziquantel, registrovaný po značce Droncit nebo Biltricide, je široce účinný trematocid a cestocid. Účinně působí na celou řadu parazitárních onemocnění. Chemickým složením a jedinečnými vlastnostmi se neliší žádnému z antischistosomálních léků (Andrews a kol., 1983).

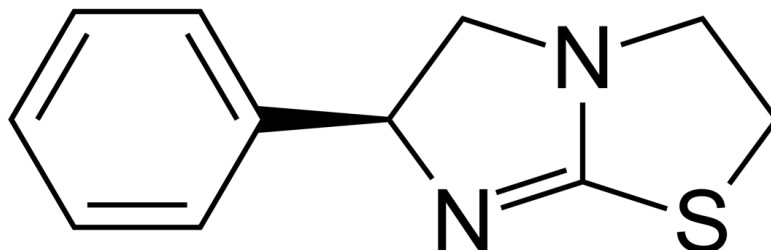
Ani toto antiparazitikum se širokým spektrem účinku není pro potravinová zvířata včetně ryb v Evropské unii zaregistrováno. Výjimkou je aplikace léčiv veterinárním lékařem na vlastní odpovědnost s dodržáním OL 500 stupňů (Kolářová, Svobodová, 2009).

Praziquantel je dále doporučený pro léčbu diplostomózy. Při laboratorních pokusech je potvrzena 100 % účinnost proti napadení metacerkárií *Diplostomum spathaceum*. Léčivo se podává buď jako krmivo v množství 330 mg.kg⁻¹ nebo formou dlouhodobé koupele (90 h) v koncentraci 1 mg.l⁻¹ (Székely a Molnár, 1991).

Účinnost tohoto léčiva spočívá v narušení neuromuskulárního systému parazita. Taktéž ale působí na propustnost tegumentu parazita, což způsobí nadměrnou ztrátu glukózy a umožní působení proteolytických enzymů. Podle typu onemocnění se Praziquantel aplikuje v rozmezí od 5 do 100 mg.kg⁻¹ (Traves-Brown, 2000).

Levamisol

Levamisol patří do skupiny derivátů imidazothiazolu. Tato látka má imunostimulační vlastnosti s anthelmintickým a adjuvantním účinkem.



Obr. 4: Chemická struktura Levamisolu (Dayan, 2003)

Je prokázána jeho účinnost na gyrodaktylózy kůže ve formě léčebných koupelí v koncentraci 20-50 mg.l⁻¹ po dobu 1,5 hodiny (Schmahl a Taraschewsi, 1987). Hlavní význam je však patrný při léčbě anguilikolózy úhoře. V našich podmínkách nejsou koupele v Levamisolu běžné. V běžném chovu se podává rybám perorálně v množství 3-8 mg.kg⁻¹ každý 3. den v 6 dávkách. Při tomto dávkování je dokázáno, že použití Levamisolu zvyšuje počty leukocytů, fagocytární aktivitu a hladinu sérového lysozymu (Fujiki a kol., 1994).

2.5.4 Prevence

Stejně jako u ostatních nemocí ryb je limitním faktorem prevence, tedy kontrola zdravotního stavu ryb. Při alarmujícím počtu metacerkárií, zjištěném po parazitárním vyšetření oční čočky ryb, je nezbytné učinit účinná opatření narušující vývojový cyklus.

Přerušení vývojového cyklu motolice oční (*Diplostomum spathaceum*) můžeme provést několika způsoby nebo jejich kombinací. Včasná prevence vede k velmi dobrým výsledkům z hlediska dalšího rozšíření těchto parazitů ve vodním prostředí.

Jednou z možností eliminace diplostomózy je likvidace mezihostitelských plžů (nejčastěji plovatek rodu *Lymnea*), a to čtyřmi způsoby - **fyzikálním, mechanickým, chemickým nebo biologickým** (Svobodová a Faina, 1992). K dosažení dobré účinnosti je však zapotřebí neprovádět tato omezení jednotlivě,

nýbrž tyto metody kombinovat. Tak docílíme velmi dobrých výsledků ve snížení výskytu motolic. **Fyzikální** metoda se používá především přes zimní období. Po vypuštění vody z nádrže dojde k vysušení a při nízkých teplotách k vymrznutí dna nádrže či rybníka po výlovu. Tuto metodu je pak ideální dále kombinovat s **metodou mechanickou**. Ta spočívá ve sběru a odstraňování mezihostitelů – plovatek z rybníčního dna. Tato metoda se týká rybníků s menší rozlohou nebo rybochovných nádrží či uzavřených systémů. Mechanická metoda se neprovádí jen sběrem, nýbrž také v aktivním zamezení průniku plovatek do rybochovných objektů a rybníků. Toto zamezení spočívá v instalaci sítí ze syntetické tkaniny nebo drátěného pletiva do míst přítoků. Další variantou je umístění hned několika takovýchto sítí za sebou s různými průměry ok, až po velikost několika mm. Síť je nutné umístit v dlouhodobém horizontu po celou dobu odchovu ryb. Je naprosto nezbytné je pravidelně kontrolovat a čistit, aby se zamezilo vypouštění cercárií z plovatek do vodního prostředí. Nedokonalé čištění tak může způsobit rozšíření diplostomózy průnikem cercárií přes síť. Nejdokonalejším opatřením je k instalovaným sítím přidat pískové filtry. Ty stěžují cercáriím průchod do nádrže. Cercárie se unaví a vyčerpají energetickou zásobu. Nejsou tak schopny aktivně vyhledat a napadnout dalšího mezihostitele (*Našincová a kol., 1990*).

Další metodou je **metoda chemická**, která se provádí převážně v jarním období. Používají se preparáty s moluskocidními účinky, což jsou přípravky na hubení měkkýšů. Ošetření se provádí na rybnících s polovičním až $\frac{3}{4}$ stavem vody. Poté dochází k uvolňování plovatek z bahna, následně se provede aplikace Moluskocidu. Dříve používané moluskocidní přípravky byly na bázi mědi, např.: Kuprikol 50; na bázi organických sloučenin fosforu, např.: Masoten a na bázi cínu, např.: Lastanox Super. Tyto preparáty již nejsou, vzhledem ke svým vlastnostem, pro aplikaci do vodního prostředí povoleny, a tak výhradní volbou je použití páleného vápna (CaO).

Posledním metodou, kterou lze regulovat počty plovatek, je **metoda biologická**. Ta spočívá ve vysazení amura černého (*Mylopharyngodon piceus*), který je moluskofágním druhem, a tudíž nejvhodnějším pro tento účel. Je dokázáno, že obsádka amura černého ve staří 2 let je schopna za jedno vegetační období zlikvidovat veškeré vodní měkkýše vyskytující se v prostředí (*Kouřil a Kepřt, 1980*). Vzhledem k potenciální invazivitě tohoto druhu se v našem prostředí doporučuje do

rybníků po ošetření všemi způsoby prevence nasadit kapra ve stáří K₂ (hmotnost nad 0,5 kg) nebo lína L₃ v množství 500-600 ks.ha⁻¹. Taková obsádka dokáže v průběhu vegetačního období likvidovat plovatky, převážně v juvenilním stádiu života (*Adámek a Jirásek, 1989*).

Tyto metody jsou funkční jak v rybníčních chovech, tak v uzavřených systémech. V uzavřených systémech se tyto metody používají s výjimkou metody biologické obdobně jako v rybníčních chovech.

2.6 Diagnostika

Parazitární onemocnění se obecně diagnostikuje pomocí standardního parazitologického vyšetření (*Svobodová, 2007*). Diplostomóza se určuje pomocí vyšetření oka ryby. V první řadě se obě oči prohlíží makroskopicky pomocí zraku. Pro lepší viditelnost metacerkárií se oko prosvěcuje světlem. Mikroskopické vyšetření se pak provádí tak, že po usmrcení ryby se vyjme oční čočka z bulvy a komprimuje se mezi dvěma podložními sklíčky. Oční čočka je velmi elastická a její stlačení mezi podložními skly preparátu může činit problémy. Preparát se vzhledem ke své tloušťce mikroskopuje pod objektivem 4. Je naprosto nezbytné při mikroskopování prohlédnout všechny vrstvy čočky. Po vyšetření se počty nalezených cercarií z obou čoček zapisují do záznamového archu (*Lucky, 1996*).

2.6.1 Parazitologické vyšetření

Parazitologické vyšetření by mělo probíhat nejlépe na živých, krátkodobě přechovávaných rybách, které jsou co možná nejkratší dobu v prostředí s jiným chemismem a vlastnostmi vody, než bylo v jejich původním areálu výskytu. Před usmrcením je nezbytné určit věkovou a druhovou kategorii ryb. Po usmrcení následně dochází k vnějšímu vyšetření integrity organismu a výskytu makroskopických parazitů v možném zastoupení kapřivců, pijavek a dalších. Mikrosopičtí parazité se determinují pitvou a následnou prohlídkou vnitřních a vnějších orgánů ryb. Z povrchu těla se prostřednictvím kožních stěrů odebere kožní hlen, který se na podložní sklíčku naředí kapkou vody. Následuje parazitární determinace pod mikroskopem. Dále se provádí seškrab z žaberních oblouků a listů,

popřípadě se část žaberního aparátu odstříhne a vloží na podložní sklo (Svobodová, 2007). Mikroskopuje se při všech dostupných zvětšeních od nejmenšího po největší. Zkoumá se buď celý orgán, nebo jeho část. Jsme tak schopni předejít přehlédnutí začínajícího nebo právě doznívajícího parazitárního onemocnění (Volf a Havelka, 1958). Pro podrobnější a detailní popis struktury zkoumané tkáně při případné histopatologické změně se mohou odebrat vzorky do 4 % formaldehydu pro následné podrobnější histologické vyšetření (Ergens a Lom, 1970).

2.6.2 Hematologické vyšetření

Některé hematologické ukazatele, jako je počet erytrocytů, hematokrit (PCV) a koncentrace hemoglobinu (Hb), byly použity jako markery pro hodnocení zdravotního stavu ryb (Houston, 1997). Stanovení hematologických parametrů sladkovodních ryb dává představu o jejich fyziologickém stavu a vlivu různých environmentálních faktorů (Ranzani-Paivaa kol., 1997). Hematologický profil krve, může poskytnout důležité informace o změnách uvnitř organismu (Masopust, 2000). Měření parametrů krve se používá již řadu let jako nástroj pro sledování zdraví ryb, který umožňuje studovat fyziologické odpovědi organismů na patogenní působení. Pomáhá při diagnostice a také prognóze rozličných onemocnění ryb (Sebastiao a kol., 2011). Patologické stavy u ryb se projevují formou symptomů v podobě změny chování nebo porušení celistvosti tkání, což vede ke snížení hmotnostního přírůstku a často až ke smrti (Roberts a kol., 1981). Hematologické vyšetření dále slouží jako indikátor vlivu toxických látek ve vodě a k posuzování a následnému využití vhodných léčiv nebo krmení pro ryby. Odolnost jednotlivých druhů ryb závisí mimo jiné i na jejich stáří (Svobodová a kol., 1991).

Odběr krve

Nejrozšířenější a nejpoužívanější metodou pro odběr krve u ryb je odběr z podpátečních cév pomocí heparinizované injekční jehly o průměrech a délkách lišících se podle aktuální velikosti ryb. Používají se převážně plastové injekční stříkačky. Následný kontakt se sklem vede ke zkrácení doby koagulace krve (Smith, Lewis a Kaplan, 1952). Je naprosto nezbytné před odběrem vzorku krve

propláchnout vnitřní stěnu injekční stříkačky roztokem heparinu tak, aby na jejím povrch zůstala jen nepatrná vrstva a nedošlo tak k znehodnocení vzorku (*Svobodová et al., 1987*). Samotný odběr nastává bezprostředně po odlovení jednotlivých ryb z vodního prostředí. Pro lepší manipulaci s rybou při samotném odběru můžeme použít krátkodobá anestetika (*Klontz a Smith, 1968*). Ryba musí být okamžitě zafixována, a tím pádem částečně znehybněna navlhčeným kusem látky či jiným podobným materiálem tak, aby při manipulaci nedocházelo k mechanickému poškození těla dané ryby. Ocasní násadec včetně místa odběru ale musí být vždy snadno přístupná pro možnost pohodlného odběru. Po osušení nebo případné úpravě místa vpichu (vytržení, či jen šetrné odchlípnutí šupin/y) zavedeme jehlu pod úhlem 35° až 45° kraniodorzálním směrem kaudálně od řitní ploutve za pomoci mírného tlaku, kterým překonáme jednotlivé vrstvy kůže a následně i svaloviny. Při opatrném a správném postupu dojde k průniku jehly stěnou ocasní žíly a postupnému naplnění injekční stříkačky krví za pomoci vytvořeného podtlaku.

Při neopatrném či rychlém průběhu odběru může dojít k poranění jak žíly, tak i sousedící tepny. Jehla se ve většině případů zastaví o pevnou překážku v podobě obratle. V takovém případě opatrně injekční stříkačku povytáhneme, popřípadě natočíme tělo injekční stříkačky tak, aby krev proudila dále (*Doubek a kol., 2003*). Po dokončení odběru je vhodné místo vpichu vydesinfikovat (*Svobodová a kol., 2012*). K fixaci odebraného vzorku se nejčastěji používá vodný roztok soli heparinu (Heparin). Pro fixaci 1ml našeho vzorku použijeme 0,01 ml tohoto roztoku.

Výše uvedený postup používáme u živé, případně anestetizované ryby, kde si po odběru můžeme zhotovit i krevní nátěr na podložní sklíčko a sledovat případné parazitární osídlení krve. Pro lepší identifikaci parazitů si můžeme vzorek obarvit. Pokud chceme získat krev pro parazitologické vyšetření z usmrčené ryby, tak pomocí nůžek vyjmeme srdce a jeho rozstříhnutím nad podložním sklíčkem získáme preparát krve, ve kterém je možné pozorovat krevní parazity (*Piačková a kol., 2014*).

Další metodou odběru vzorku krve pro hematologické vyšetření je možnost využití metody odběru přímo ze srdce. Tato metoda se využívá u menších druhů ryb a plůdku (*Piačková a kol., 2014*). Metoda odběru krve ze srdce lze využít i u starších ryb, kdy počítáme s usmrčením ryby neprodleně po odběru (*Svobodová a kol., 2012*). Postupujeme tak, že po vylovení z manipulační nádrže se ryba pevně zafixuje vlhkými hadry tak, abychom měli dobrý přístup k břišní části těla. Ještě, než dojde

k samotnému odběru, ošetřujeme místo vpichu papírovou utěrkou. Odběr provádíme injekční jehlou nebo skleněnou kapilárou v místě srdečním. Stejně jako při odběru z podpáteřních cév se musí jehla/kapilára heparinizovat (*Pravda a Svobodová, 2003*).

Z odebraných vzorků krve, pomocí několika metod popsaných níže, určujeme kompletní krevní hodnoty pro správnou diagnostiku zdravotního stavu ryby:

Červené krvinky (RBC)- erythrocyty

Červené krvinky neboli erythrocyty u ryb můžeme popsat jako pružné a plastické buňky diskovitého tvaru s oválným jádrem, které se nachází ve středu buňky (*Dubský, 2003*). U kapra obecného (*Cyprinus carpio*) dosahují velikosti 12 x 7 μm (*Svobodová a kol., 2012*).

Počty erythrocytů se u ryb mezidruhově velmi liší. Dále jsou počty ovlivňovány věkem, pohlavím a s tím související pohlavní aktivitou daného jedince. Nemůžeme zapomenout také na chemismus vody, zdravotní stav a roční období (*Anderson a kol., 1985*).

Jednotlivé erythrocyty obsahují krevní barvivo hemoglobin. Právě díky němu nesou buňky červenou barvu. Tvoří více než třetinu celkové hmoty erythrocytů. Hemoglobin se skládá z bílkovinné části (globin) a barevné složky, která obsahuje železo (hem). Tyto barevné složky na sebe váží dvojmocné železo a při oxidaci trojmocné. Počet erythrocytů se druhově liší a u kapra obecného je to zhruba 1,8 milionu v mm^3 krve (*Novotný a kol., 1966*). Jejich počet je ovlivněn řadou faktorů, mezi něž patří např. věk, pohlaví, roční období (*Genten a kol., 2009*), kondice, pH krve nebo koncentrace kyslíku v krvi. Počet erythrocytů se snižuje i během tření a v době zvýšené pohlavní aktivity. Během embryonálního a larválního vývoje je výskyt erythrocytů omezen, ale jejich počet se s věkem a růstem zvyšuje. V důsledku intenzivnějšího metabolismu mají samci větší počet červených krvinek než samice (*Lusková, 1996*).

Nízký počet erythrocytů je podle Luskové (1996) kompenzován relativně velkým povrchem erythrocytů, který můžeme vyjádřit jako střední objem erythrocytu. Jeho hodnota je u kapra obecného 200-300 fl (1 fl (femtolitr) = 1 μm^3). Červené krvinky jsou velmi pružné. Díky tomu mohou při průchodu jemnými vlasečnicemi

dočasně změnit svůj tvar (*Novotný a kol., 1966*). To je dáno především jejich eliptickým tvarem (*Pravda a Svobodová, 2003*).

Stanovení počtu erytrocytů je jedním ze základních údajů krevního vyšetření. Nejčastěji se stanovuje pomocí metody počítací. Ta prvotně spočívá v přípravě heparinizované krve, kterou naředíme Hayemovým roztokem. Poté nastává přesun krve do Bürkerovy komůrky a samotné počítání erytrocytů. To ale není zdaleka jediná využívaná metoda. Daleko rychlejší a jednodušší je metoda kolorimetrická definována podle Pawinského. Tato metoda je v toxikologii ryb i přes její nenáročnost nepříliš využívaná. Vyvolává totiž zvětšení středního objemu erytrocytu, a tím dochází ke zkreslení dalších vypočítávaných hodnot.

Počet erytrocytů se u zdravých kaprů pohybuje v rozmezí 1,1- 1,8 T.l⁻¹, u pstruha je tato hodnota menší: 0,80 – 1,5 T.l⁻¹ (*Svobodová a kol., 1991*).

Bílé krvinky (WBC)- leukocyty

Množství leukocytů je jeden z nejdůležitějších ukazatelů zdravotního stavu ryby, především při diagnostice infekčních onemocnění (*Dubský a kol., 2003*). Stanovení se provádí v heparinizované krvi, kterou je nutno zředit Natt-Herrickovým roztokem v poměru 1:200 (*Svobodová a kol., 2012*). Výhodou tohoto stanovení je jednoznačně všestrannost. Ze vzorku můžeme zjistit, jak počet leukocytů, tak počet erytrocytů. Je ale nezbytné nejprve spočítat erytrocyty, které rychleji podléhají hemolýze (*Svobodová a kol., 2012*).

Počítání se provádí stejně jako u předchozí metody v Bürkerově komůrce s 50 čtverci, se zvětšením 200x (*Pravda a Svobodová, 2003*). Pro zvýšení přesnosti výsledků se může použít počítání v komůrce se 100 čtverci (tento výsledek poté dělit dvěma). Počítají se jen leukocyty uvnitř jednotlivých čtverců. Bílé krvinky, které se dotýkají okrajů čtverce nevynecháváme, ale počítáme pouze ty, které se dotýkají dvou námi zvolených sousedních stran (*Svobodová a kol., 2012*). Výsledné počty leukocytů se u jednotlivých druhů ryb liší. Např. u kapra obecného se hodnoty pohybují okolo 10-80 G.l⁻¹. U pstruha duhového jsou hodnoty menší, a to v rozmezí mezi 10-60 G.l⁻¹ (*Svobodová a kol., 1991*).

Hematokrit (PCV)

Hematokritová hodnota udává celkový objem erytrocytů v celkovém objemu krve. Pro její určení je naprosto nezbytné oddělit z odebraného vzorku krve erytrocyty od plazmy, z důvodu stanovení skutečného objemu. Oddělení probíhá na hematokritové odstředivce ve speciálních heparinizovaných kapilárách. Po dokonalém odstředění zjistíme procentuální zastoupení hematokritu na tzv. hematokritovém měřítku. Tato hodnota uváděná v procentech se násobí koeficientem 0,01. Výsledná hodnota PCV se udává v l.l⁻¹.

Toto vyšetření je nepostradatelnou složkou krevního vyšetření. Fyziologické hodnoty se pohybují v rozmezí 0,28-0,40 l.l⁻¹ u kapra a 0,30-0,45 l.l⁻¹ u pstruha (*Svobodová a kol., 1991*).

Hemoglobin (Hb)

Je krevní barvivo podílející se na transportu kyslíku krví. Kyslík však může být také transportován prostým roztokem plazmy. Teplota krve ryb je často nízká, synchronní s okolním prostředím. Z tohoto důvodu některé ryby z polárních částí světa vůbec neobsahují hemoglobin (*Roberts a Ellis, 200*).

Existují značné druhové rozdíly obsahu hemoglobinu u ryb. V jednom druhu ryb se mohou vyskytnout až čtyři různé druhy hemoglobinu lišící se vlastnostmi i stavbou (*Stoskopf, 1993, Roberts a Ellis, 2001*). Modifikace těchto hemoglobinů umožňuje rybám přizpůsobit se různým vlivům - změnám obsahu kyslíku, pH či teplotám ve vodním prostředí (*Roberts a Ellis, 2001*).

Ke stanovení koncentrace hemoglobinu (Hb) v krvi ryb se používá fotometrická kyano-hemoglobinová metoda. Pomocí transformačního roztoku (Kampen-Zijstrův roztok) se uvolněné erytrocyty přemění na stálé kyano-hemoglobiny. Ty se dále stanovují fotometricky. Koncentrace hemoglobinu u kapra obecného se udává v rozmezí 60-100 g.l⁻¹ (*Svobodová a kol., 1986*).

Střední objem erytrocytu (MCV - mean corpuscular volume)

Hodnotu středního objemu erytrocytu je možné vypočítat z hematokritové hodnoty udané v jednotkách l.l⁻¹ a počtu erytrocytů (RBC) v jednotkách T.l⁻¹ – viz vzorec níže. Výsledná hodnota je u zdravých pstruhů v hodnotách 350 až 400 fl, u kaprů mezi 200 až 300 fl (Svobodová a kol., 1986). MCV se jeví mnohem citlivěji při detekci rozdílu velikostí erytrocytů.

Výpočet MCV podle vzorce:

$$MCV = \frac{PCV \times 100}{Er}$$

(*fl - femtolitr)

Hemoglobin erytrocytu (MCH - mean corpuscular hemoglobin)

Tato hodnota vyjadřuje průměrnou koncentraci hemoglobinu v jednom erytrocytu. Vypočítá se z koncentrace hemoglobinu v krvi v g.l⁻¹ a počtu erytrocytů v T.l⁻¹ – viz vzorec níže. Výsledná hodnota je udávána v pikogramech (pg). U zdravých kaprů bývá v rozmezí mezi 50-60 pg (Svobodová a kol., 1986).

Výpočet MCH podle vzorce:

$$MCH = \frac{Hb}{Er}$$

Střední barevná koncentrace (MCHC - mean corpuscular hemoglobin concentration)

Střední barevná koncentrace vyjadřuje koncentraci hemoglobinu v objemové jednotce erytrocytů a vypočítá se z hodnoty hemoglobinu v g.l⁻¹ a hodnoty hematokritu v l.l⁻¹. Výsledná hodnota se u zdravých kaprů udává v rozmezí mezi 0,20-0,26 l.l⁻¹ (Svobodová a kol., 1986).

Výpočet MCHC podle vzorce:

$$MCHC = \frac{Hb}{PCV}$$

3 Experimentální část

3.1 Materiál a metodika

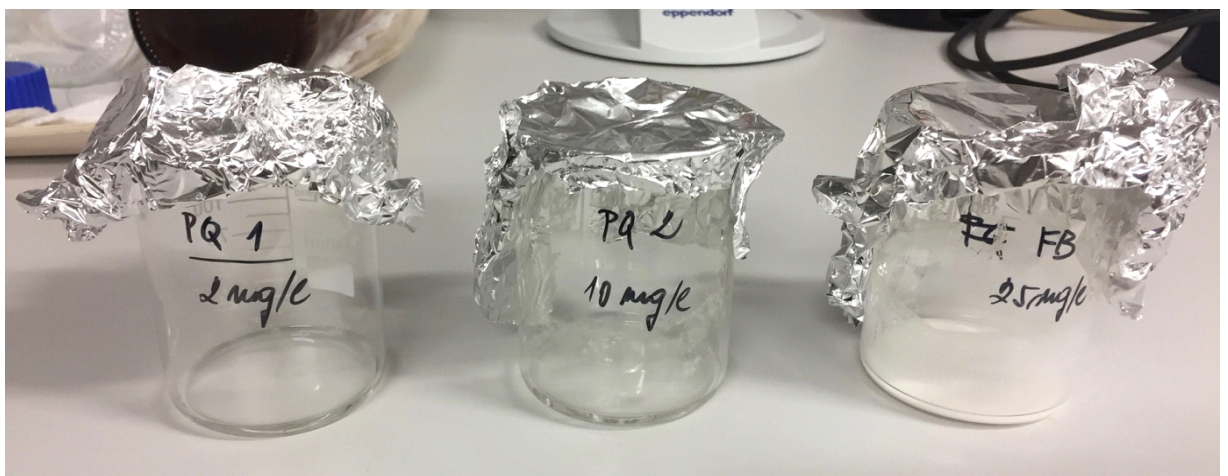
Experiment probíhal v laboratorních podmínkách VÚRH FROV ve Vodňanech. Všechna pokusná akvária byla před začátkem pokusu dezinfikována pomocí Sava (obsah chlornanu sodného 5 %) a důkladně vymyta čistou vodou. Pro experiment bylo vybráno 8 čtyřicetilitrových akvárií, která byla naplněna vodou přibližně do poloviny svého objemu (tzn. 20 l vody). Použitá voda měla následující parametry: Teplota vody se pohybovala v rozmezí 18-20 °C v průběhu experimentu. Aerace byla zajištěna pomocí vzduchovacích kamínků. Obsah vzdušného kyslíku se pohyboval v rozmezí 80-90 %. Akvária neměla implementována žádná umělá osvětlení, takže osvětlení akvárií odpovídalo venkovním světelným podmínkám (březen). Na pokus bylo využito celkem 40 ks amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*) o průměrné hmotnosti jedinců 20,1 g, původem z rybníka spadajícího pod Rybářství Hluboká s.r.o. Po dobu šesti denní aklimatizace byly ryby krmeny granulami (3 mm). Po uplynutí aklimatizační doby, tedy 2 dny před samotným pokusem, se rybám přestalo podávat krmivo. Při samotném experimentu byly ryby rozděleny do 8 skupin po 5 ks a umístěny do připravených akvárií s různými koncentracemi praziquantelu a fenbendazolu včetně kontrolních akvárií:

- 2x kontrolní skupina (K): Etanol 5 ml
- 2x pokusná skupina (PQ1): Praziquantel v koncentraci 2 mg.l⁻¹
- 2x pokusná skupina (PQ2): Praziquantel v koncentraci 10 mg.l⁻¹
- 2x pokusná skupina (FB): Fenbendazol v koncentraci 25 mg.l⁻¹



Obrázek č. 5: Jedna skupina 20 l akvárií v laboratorní místnosti připravená na vysazení ryb. Lze si všimnout výrazného zakalení v pokusné skupině Fenbendazolu (FB), který je ve vodě špatně rozpustný a vytváří v ní zvláštní strukturu (foto autor).

Pro testování PQ1 bylo použito 40 mg praziquantelu od firmy Ecological Laboratories Inc. Předem rozpuštěný přípravek (5 ml etanolu) v kádince se následně aplikoval do akvárií ve výsledné koncentraci 2 mg.l^{-1} . U skupiny PQ2 bylo použito 200 mg praziquantelu od stejného výrobce v koncentraci 10 mg.l^{-1} . Pro skupinu FB bylo připraveno 500 mg fenbendazolu. Fenbendazol byl rovněž rozpuštěn v 5 ml ethanolu a byl aplikován do akvárií tak, aby bylo dosaženo konečné koncentrace 25 mg.l^{-1} .

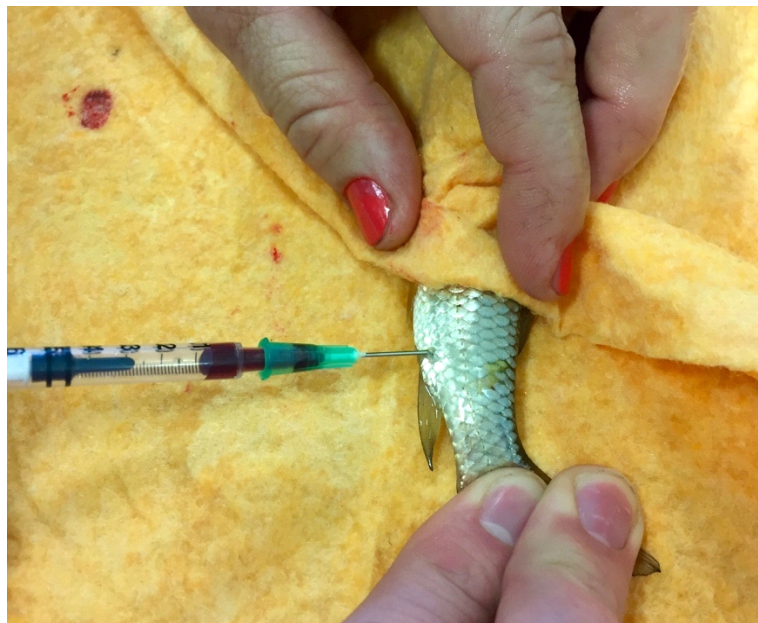


Obrázek č. 6: Odměřené koncentrace praziquantelu a fenbendazolu připravené do akvárií (foto autor).

Po 24 hodinách koupele byla u náhodně vybraných ryb (3 ks z každé skupiny) odebrána krev heparinizovanou injekční stříkačkou z ocasní cévy (*vena caudalis*). Odebraná krev byla zpracována podle Svobodové a kol. (2012).



Obrázek č. 7: Pro odběr krve byly použity injekční stříkačky s celkovým objemem 1 ml, které byly předem propláchnuty Heparinem (foto autor).



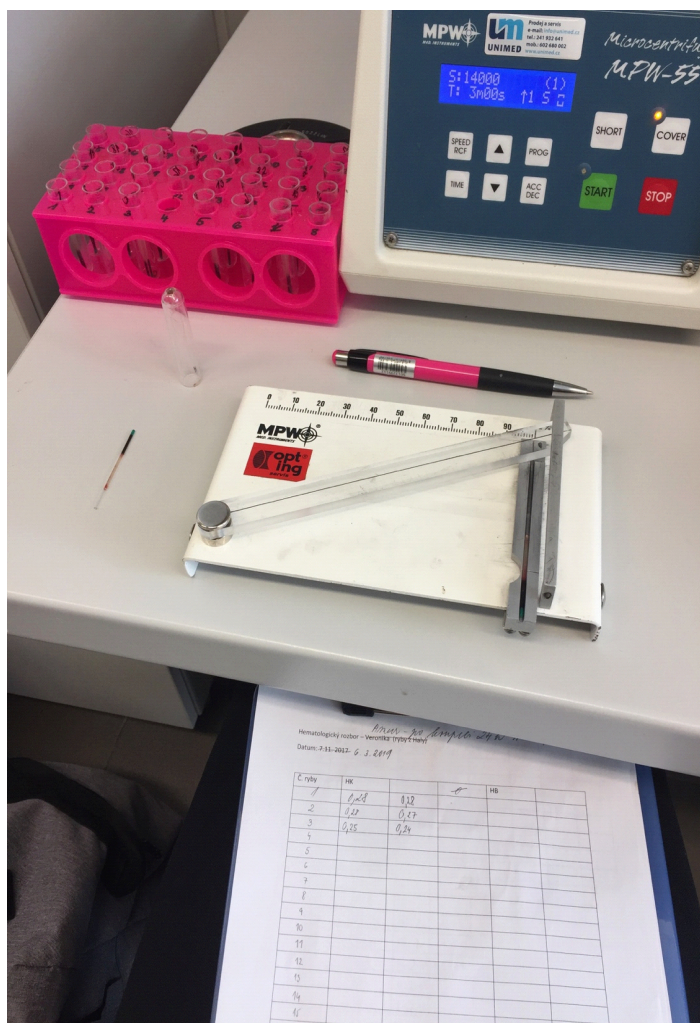
Obrázek č. 8: Odběr krve z ocasní cévy (*vena caudalis*) (foto autor).

Po odebrání krve byly vzorky řádně zafixovány a připraveny k dalšímu zpracování.

Na stanovení hematokritové hodnoty (PCV) byly připravené 2 ks skleněných kapilár o délce 5 cm z každého vzorku krve (viz obrázek č. 9). Po ucpání jednoho konce modelínou, byly následně umístěny do hematokritové odstředivky a zde 3 minuty centrifugovány při otáčkách 14 000 otáček za minutu. Po odstředění se stanovila hodnota PCV pomocí posuvného měřítka s noniem, viz obrázek č. 10.



Obrázek č. 9: Příprava vzorku na stanovení hematokritu (PCV) do heparinizovaných kapilár (foto autor).



Obrázek č. 10: Stanovení hodnoty PCV pomocí posuvného měřítka. Ve vrchní části odstředivka nastavená na potřebný počet otáček (foto autor).

Pro stanovení počtu erytrocytů (RBC) byla odebraná krev naředěna Hayemovým roztokem v poměru 1:200. Hayemův roztok měl následující složení:

- 1,25 g chloridu rtuťnatého HgCl_2
- 12,5 g síranu sodného Na_2SO_4
- 2,5 g chloridu sodného NaCl
- 500 ml destilované vody

K ředění krve byla použita tzv. baničková metoda podle Bürkera. Ředění se provádělo ve speciálních skleněných lahvičkách o objemu 20 ml, do kterých se napipetovalo přesně 4,957 μl přefiltrovaného Hayemova roztoku a poté mikropipetou přidalo 25 μl heparinizované krve. Špička mikropipety byla opětovným nasáním roztoku propláchnuta. Poté byla baňka uzavřena gumovou zátkou a obsah byl 3 minuty krouživým pohybem promíchán. Po důkladném promíchání vzorků byla pipetou počítací Bürkerova komůrka naplněna a vložena pod mikroskop. Množství erytrocytů se počítalo ve 20 obdélnících stejnoměrně rozmístěných po celé mřížce komůrky při zvětšení 200x. Takto se také postupovalo při samotném počítání, kdy se počítaly všechny erytrocyty uvnitř obdélníku, které se nedotýkaly stran. U erytrocytů, které se stran dotýkaly, byly počítány pouze ty z pravé a horní strany. Celkové napočítané množství bylo vynásobeno číslem 10 000.

Množství leukocytů (WBC) se stanovovalo obdobně za využití stejného roztoku. Metodologicky se postupovalo dle popisu kap. 2.6.2.

Ke stanovení množství hemoglobinu (Hb) byla využita fotometrická kyanohemiglobinová metoda. Princip této metody spočívá v použití transformačního roztoku. Díky tomu dojde k uvolnění hemoglobinu z erytrocytů a převedení na stálý kyanohemoglobin. Ten se stanoví fotometricky. Jako transformační roztok byl použit roztok podle van Kampena a Zijlstra v následujícím složení:

- 0,10 g ferrikyanidu draselného $K_3(Fe(CN)_6)$
- 0,025 g kyanidu draselného KCN
- 0,07 g dihydrofosforečnanu draselného KH_2PO_4
- 500 ml destilované vody



Obrázek č. 11: Připravené vzorky na měření ve spektrofotometru při vlnové délce 540nm. (foto autor).

Stanovení proběhlo neprodleně po odebrání krve, aby nedošlo ke znehodnocení vzorků. Do zkumavky bylo odměřeno 5 ml transformačního roztoku, vyplachovací pipetou přidáno 20 μ l odebrané krve a obsah zkumavky byl ihned promíchán. Vlastní měření bylo provedeno v 1 cm velké kyvetě při vlnové délce 540 nm proti transformačnímu roztoku.

Celkem bylo tedy z připravených vzorků provedeno vyšetření se stanovením následujících parametrů:

- **RBC** - počet erytrocytů
- **WBC** - počet leukocytů
- **PCV** - hematokrit
- **Hb** - množství hemoglobinu
- **MCV** - střední objem erytrocytů
- **MCH** - střední obsah hemoglobinu v erytrocytu
- **MCHC** - střední barevná koncentrace

Tato vyšetření byla provedena podle Jednotných metod hematologického vyšetření ryb (*Svobodová a kol., 1991*).

U vykrvených a usmrcených ryb bylo následně provedeno parazitologické vyšetření očí. Postup tohoto vyšetření byl u všech ryb stejný. Pomocí nůžek byla nastřižena tkáň rohovky, následně se tlakem pinzety z obou stran vytlačila kulatá kolagenní čočka (obrázek č. 12). Kolagenní čočka byla umístěna na podložní sklíčko a druhým podložním sklíčkem opatrně rozmáčknuta, tak aby nedošlo jak k poškození struktury čočky, tak skel. Takto byl připraven kompresní preparát na mikroskopování (obrázek č. 13) a mohlo proběhnout samotné mikroskopování pod zvětšením 40-100 x.



Obrázek č. 12: Po odběru krve byly ryby řádně usmrceny a následně jim byly vyjmuty pomocí nůžek a pinzety čočky z levého i pravého oka (foto autor).



Obrázek č. 13: Oční čočky vložené mezi podložní skla připravené k mikroskopování (foto autor).

Stanovené hematologické parametry a výsledky vyšetření byly zaznamenány v programu Microsoft Excel. Výsledky hematologických rozborů byly vyhodnoceny a porovnány statistickým programem STATISTICA (verze 8.0 pro Windows, StatSoft) za použití dvoucestného ANOVA testu a byly zde vyhodnoceny statisticky významné rozdíly na hranici významnosti ($P < 0,05$ a $P < 0,01$).

4 Výsledky

Hematologické vyšetření

Po vyhodnocení všech hematologických parametrů je zřejmé, že při pokusu došlo ke statisticky významným změnám dvou parametrů. U hodnoty RBC bylo nalezeno statisticky významné snížení hodnot u skupin fenbendazolu (FB), u kterých klesl počet červených krvinek na průměrnou hodnotu 1,97 T.l⁻¹. Další statisticky významná změna byla patrná u MCHC (středně barevná koncentrace), kde došlo ke zvýšení hodnot u skupin Praziquantel 2 (PQ2) na průměrnou hodnotu 0,29 l.l⁻¹. Zbytek naměřených hematologických parametrů u amurů bílých (*Ctenopharyngodon idella*) se nelišil od hodnot kontrolních skupin ryb.

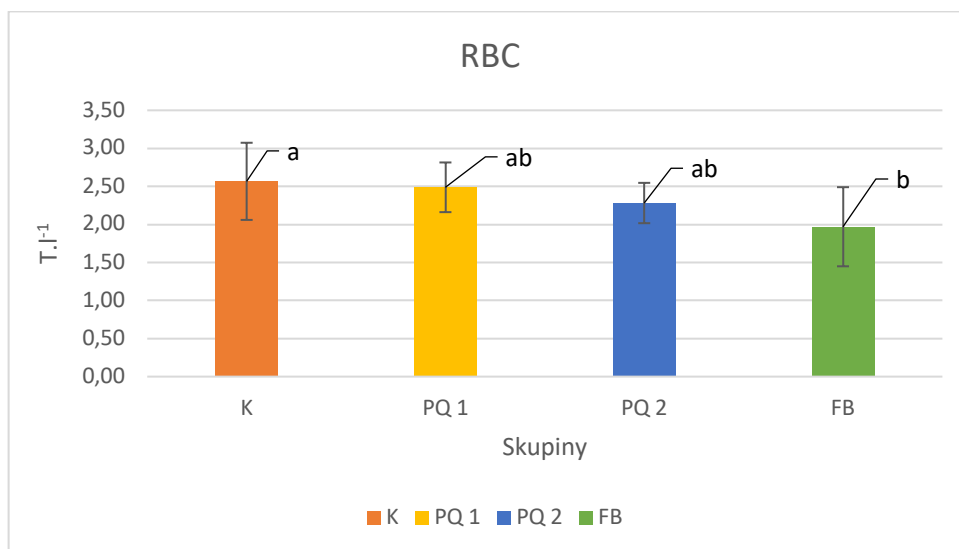
Tabulka č. 1: Výsledková tabulka s rozsahem hodnot naměřených při hematologickém vyšetření amurů bílých (*Ctenopharyngodon idella*). V tabulce jsou uvedeny hodnoty v kontrolní skupině bez aplikace léčiv, hodnoty naměřené u Praziquantelu v koncentraci 2 mg.l⁻¹ (PQ1), v koncentraci 10 mg.l⁻¹ (PQ2) a hodnoty u Fenbendazolu v koncentraci 25 mg.l⁻¹. Jednotlivé ukazatele jsou vyjádřeny v podobě průměru ± směrodatná odchylka.

Parametr	Jednotky	Kontrola x ± SD (n=6)	PQ1 x ± SD (n=6)	PQ2 x ± SD (n=6)	FB x ± SD (n=6)
RBC	T.l ⁻¹	2,57 ± 0,51 ^a	2,49 ± 0,33 ^{ab}	2,28 ± 0,26 ^{ab}	1,97 ± 0,52 ^b
WBC	G.l ⁻¹	11,83 ± 4,02	14,33 ± 5,75	17,5 ± 7,87	15,83 ± 6,49
PCV	l.l ⁻¹	0,27 ± 0,05	0,25 ± 0,03	0,22 ± 0,03	0,24 ± 0,05
Hb	g.l ⁻¹	66,91 ± 15,83	66,79 ± 5,49	64,76 ± 7,16	56,52 ± 12,46
MCV	fl	107,12 ± 16,15	98,99 ± 9,52	97,01 ± 7,97	122,23 ± 15,63
MCH	pg	26,18 ± 4,32	27,06 ± 2,40	28,43 ± 1,64	30,24 ± 3,95
MCHC	l.l ⁻¹	0,25 ± 0,02 ^a	0,27 ± 0,02 ^{ab}	0,29 ± 0,02 ^b	0,24 ± 0,01 ^a

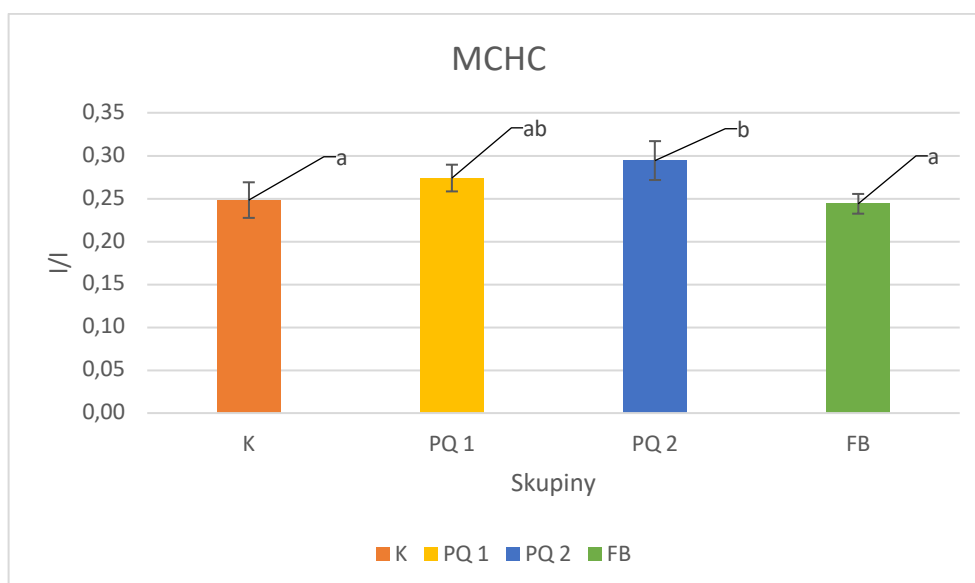
Odlišná písmena indikují statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$.

Grafické znázornění statisticky významných změn hematologických ukazatelů:

Graf č. 1: Sloupcový graf znázorňuje počet erytrocytů (RBC) v krvi u testovaných skupin amurů bílých (*Ctenopharyngodon idella*). Znázorněna kontrolní skupina K a testované skupiny PQ1 (Praziquantel 2mg.l⁻¹), PQ2 (Praziquantel 10 mg.l⁻¹) a FB (Fenbendazol 25 mg.l⁻¹). Odlišná písmena indikují statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$.



Graf č.2: Sloupcový graf znázorňuje hodnotu střední barevné koncentrace (MCHC) u testovaných skupin amurů bílých (*Ctenopharyngodon idella*). Znázorněna kontrolní skupina K a testované skupiny PQ1 (Praziquantel 2mg.l⁻¹), PQ2 (Praziquantel 10 mg.l⁻¹) a FB (Fenbendazol 25 mg.l⁻¹). Odlišná písmena indikují statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$.



Parazitologické vyšetření

Z parazitologického vyšetření ryb (tabulka č. 2) je patrný vysoký nález živých metacerkárií (*Diplostomum spathaceum*) v kontrolní skupině (K1-K6). V očních čočkách bylo při mikroskopování u vzorků K1 až K6 nalezeno celkem 10 ks živých a 1 ks mrtvých jedinců. Příčina nálezů mrtvého jedince v kontrole může být dána faktem, že ryby byly v období časného podzimu přikrmovány medikovaným krmivem s obsahem praziquantelu v koncentraci 50 mg.kg⁻¹ živé hmotnosti ryb. U pokusné skupiny s koncentrací praziquantelu 2 mg.l⁻¹ (PQ1) byl nález pozitivní pouze u ryby PQ1-1, kde byl nalezen 1 ks živé a 2 ks mrtvých metacerkárií. U skupin stejné látky s koncentrací 10 mg.l⁻¹ (PQ2) byl nález pozitivní také u jedné ryby: PQ2-5. Tento nález činil 7 ks mrtvých metacerkárií. Kvůli počáteční nízké prevalenci metacerkárií jsou získaná data statisticky nevyhodnotitelná, a proto nemůžeme s jistotou tvrdit, že praziquantel je v koncentraci 10 mg.l⁻¹ při dlouhodobé koupeli plně účinný. U skupin s koncentrací fenbendazolu 25mg.l⁻¹ byl nález pozitivní hned u 3 vybraných ryb (FB1, FB2, FB4). U těchto ryb bylo nalezeno celkem 5 ks živých a 5 ks mrtvých metacerkárií. Výsledky naznačují, že fenbendazol ve výše uvedené koncentraci není plně účinný. To může být dané špatnou rozpustností ve vodě, při které dochází k vysrážení účinné látky do „vloček“. Tím patrně nedojde k plnému využití potenciálu léčiva, kvůli špatné vstřebatelnosti do těla ryb.

Tabulka č. 2: Nálezy metacerkárií u amurů bílých (*Ctenopharyngodon idella*) při parazitologickém vyšetření oční čočky po 24hodinové koupeli.

RYBA	MRTVÉ METACERKÁRIE	ŽIVÉ METACERKÁRIE	PREVELACE
K1	0	4	1
K2	1	3	1
K3	0	0	0
K4	0	3	1
K5	0	0	0
K6	0	0	0
PQ1 - 1	2	1	1
PQ1 - 2	0	0	0
PQ1 - 3	0	0	0
PQ1 - 4	0	0	0
PQ1 - 5	0	0	0
PQ1 - 6	0	0	0
PQ2 - 1	0	0	0
PQ2 - 2	0	0	0
PQ2 - 3	0	0	0
PQ2 - 4	0	0	0
PQ2 - 5	7	0	1
PQ2 - 6	0	0	0
FB 1	1	3	1
FB 2	2	1	1
FB 3	0	0	0
FB 4	2	1	1
FB 5	0	0	0
FB 6	0	0	0

Tabulka č. 3: Nález metacerkárií v oční čočce po 1 týdnu od terapeutické koupele. Vyšetřeny vždy 4ks ryb z každé skupiny.

Skupina	Mrtvé metacerkárie	Živé metacerkárie
K	7	2
PQ1	4	0
PQ2	2	0
FB	Bez nálezu	Bez nálezu

5 Diskuze

V průběhu antiparazitárních koupelí nedošlo k žádnému úhynu testovaných ryb. Ryby koupele snášely dobře a nevykazovaly změny chování, které by mohly poukazovat na jejich zhoršený zdravotní stav. Při pokusu byly do skupin PQ1 a PQ2 dávkovány koncentrace praziquantelu v množství 2 mg.l⁻¹ a 10mg.l⁻¹. Po následném hematologickém vyšetření, kde byly stanoveny ukazatele RBC, WBC, PCV, Hb, MCV, MCH, MCHC došlo k statisticky významnému snížení počtu erytrocytů (RBC) u skupiny FB (fenbendazolu 25 mg.l⁻¹ - graf č.1). I přes statisticky významné snížení RBC v porovnání s kontrolní skupinou K, se hodnoty RBC pohybují ve fyziologickém rozmezí hodnot pro kaprovité ryby. Toto tvrzení podkládají údaje od Svobodové a kol. (2012), která v metodice uvádí, že se počty RBC u zdravého kapra obecného (*Cyprinus carpio*) pohybují v rozmezí 1,1 až 1,8 T.l⁻¹. Jelikož kapr obecný patří do stejné čeledi jako amur bílý, lze předpokládat, že hodnoty počtu RBC se nebudou výrazně mezidruhově lišit. Další statisticky významné změny byly patrné v hodnotě střední barevné koncentrace (MCHC) u skupiny PQ2 (praziquantel 10 mg.l⁻¹ - graf č.2). Ve skupině PQ2 vzrostly hodnoty MCHC na 0,29 l.l⁻¹. Statisticky nevýznamný nárůst v porovnání s kontrolní skupinou byl pozorován také ve skupině PQ1 kde byly průměrné hodnoty 0,27 l.l⁻¹. Hodnota MCHC se pohybuje u zdravých kaprů obecných (*Cyprinus carpio*) v rozmezí 0,20 až 0,26 l.l⁻¹ (Svobodová a kol., 2012), tudíž je zřejmé, že praziquantel v obou použitých koncentracích zvýšil hodnotu MCHC mírně nad fyziologickou mez uvedenou dle Svobodové a kol. (2012) pro kaprovité ryby. Vliv antiparazitárních léčiv na hematologické parametry ryb testovali také Sudová a kol. (2009). Ve své práci ověřovali vliv praziquantelu aplikovaného jícnovou sondou v koncentracích 30 a 50 mg.kg⁻¹ na hematologické ukazatele kapra obecného (*Cyprinus carpio*) o průměrné hmotnosti 1,305 ± 187 g. V odebraných vzorcích 24 a 96 hodin po aplikaci praziquantelu nebyl hematologickým vyšetřením patrný žádný statisticky významný rozdíl v hodnotách MCV, MCH a MCHC. Jedinou statisticky významnou změnu bylo možno zaznamenat v hodnotách RBC a Hb 24 hodin od podání léčiva. Nižší hodnoty se však při odběrech po 96 hodinách stabilizovaly a nelišily se od kontrolní skupiny. Dá se předpokládat, že tyto rozdíly byly reverzibilní.

Z uvedených výsledků je patrné, že fenbendazol (25mg.l⁻¹) a praziquantel

(2mg.l⁻¹ a 10mg.l⁻¹) aplikovaný ve formě koupelí nijak výrazně neovlivňují hematologické ukazatele ryb a potažmo tedy nemají zásadní negativní vliv na zdravotní stav ošetřovaných ryb.

V porovnání s léčebnými dávkami praziquantelu a fenbendazolu uváděnými v metodice Kolářové a kol. (2016) jsou výše použité koncentrace mírně rozdílné zejména s ohledem na délku expozice, kde autoři doporučují 48 hodinové koupele. Na podkladě výsledků parazitologického vyšetření se jeví o polovinu zkrácená doba expozice (24h) jako dostačující, nicméně pro statisticky průkazný efekt byla u testovaných ryb nízká počáteční prevalence metacerkárií. Ve skupinách PQ1 bylo využito doporučené dávkování 2mg.l⁻¹ po dobu 24 hodin při OL 500 stupňodnů.

Lze konstatovat, že pro aplikaci praziquantelu je vždy vhodnější volit nižší koncentrace účinných látek po delší dobu expozice. Toto tvrzení potvrzuje studie autorů Székely a Molnár (1991), kteří při svém pokusu na rybách *Ctenopharyngodon idella* a *Hypophthalmichthys molitrix* použili koncentraci praziquantelu 50 mg.l⁻¹ a 100 mg.l⁻¹ při expoziční době 20 minut. I přes 66,7 % a 93,4 % úspěšnost těchto použitých koncentrací v boji proti metacerkáriím *Diplostomum spathaceum*, byly tyto vysoké koncentrace praziquantelu špatně snášeny. Ryby vykazovaly sníženou schopnost dýchání, pohyblivosti a otáčely se hřbetem dolů až do doby, kdy byly přemístěny do čisté vody. Koncentrace praziquantelu však nemůže být ani příliš nízká. Ve stejné studii autoři použili sníženou koncentraci 0,1 a 0,05 mg.l⁻¹ po dobu expozice 168 hodin. Tyto nízké dávky pak snižovaly i účinnost praziquantelu (0 až 32,2 %) proti metacerkáriím *Diplostomum spathaceum*. Jako nejúčinnější se ukázala koncentrace praziquantelu v množství 0,5 a 1 mg.l⁻¹ s délkou expozice 90 hodin, která vedla k výborné účinnosti 98,5 a 100%. Ve srovnání s koncentracemi praziquantelu použitými v předloženém pokusu se jedná o podstatně nižší koncentrace použité po delší expoziční dobu. I přes nízký nález metacerkárií při parazitologickém vyšetření oční čočky ryb při délce expozice 24 hodin (uvedené v tabulce č. 2) a tudíž přes statisticky nevýznamné hodnoty však výsledky naznačují, že navržené dávkovací spektrum v hodnotách 2 mg.l⁻¹ a 10 mg.l⁻¹ po dobu 24 hodin by mohlo být funkční a dostatečné. Nízkou iniciální prevalenci metacerkárií pravděpodobně ovlivnilo přikrmování ryb praziquantem v podobě medikovaných krmiv v období podzimu.

Tato možnost léčby prostřednictvím podávání medikovaných krmiv s obsahem praziquantelu je také velmi úspěšná. Jak uvádí studie od autorů Székelyho a

Molnára (1991), funkční jsou i krmiva s nižší koncentrací účinné látky v množství 35,5 nebo 100 mg.kg⁻¹ tělesné hmotnosti ve třech opakovaných aplikacích. I přes použití menších koncentrací byla průměrná úspěšnost jejich experimentu 93,1 %. Toto aplikační schéma sice nedosahuje 100% úspěšnosti, ale s přihlédnutím k použitým koncentracím je vysoce účinné při léčbě diplostomózy u plůdku amura bílého *Ctenopharyngodon idella* a tolstolobika bílého *Hypophthalmichthys molitrix*. Metacerkárie usmrčené léčbou zůstávají v oční čočce dlouhou dobu. V této studii také Székely a Molnár vyvrátili doporučené dávkování praziquantelu v dávce 330 mg.kg⁻¹ s několika opakováními, které doporučoval Bylund a Sumari (1981) pro pstruhy duhové. Experimenty prokázaly, že i jediná dávka ve stejné koncentraci dokáže usmrtit všechny metacerkárie *Diplostomum spathaceum*. Po parazitologickém vyšetření je zřejmé, že tyto dávky působí na morfologické a fyziologické změny metacerkárií. I přeživší metacerkárie vykazovali ve srovnání s kontrolami značně sníženou schopnost pohyblivosti. Tento typ léčby je však vhodný pro ryby v klecových chovech, popřípadě pro ryby zvyklé přijímat granulovanou potravu.

Ideálním léčebným postupem proti diplostomóze ryb je podle mého názoru kombinace antiparazitárních koupelí v předepsaných koncentracích praziquantelu v kombinaci s podáváním medikovaných krmiv. Tak může dojít k vysoké úspěšnosti za krátké časové období.

6 Závěr

Cílem této práce bylo posoudit vliv různých koncentrací praziquantelu a fenbendazolu na vybrané hematologické ukazatele a na zdravotní stav amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*) nakaženého metacerkáriemi motolice oční (*Diplostomum spathaceum*). Test antiparazitární léčby byl proveden ve formě koupelí s různými koncentracemi účinné látky. Testem léčebných koupelí bylo prokázáno, že testované aplikační schéma nemá zásadní negativní vliv na zdravotní stav žádné ze skupin testovaných jedinců. Výsledky hematologického vyšetření prokázaly statisticky významné změny u dvou parametrů v porovnání s kontrolou. U ryb ve skupině FB (fenbendazol 25mg.l⁻¹) došlo k statisticky významnému snížení množství erytrocytů (RBC). Druhou statisticky významnou změnou byl nárůst střední barevné koncentrace (MCHC) u skupiny PQ2 (praziquantel 10mg.l⁻¹). I přes statisticky neprůkazné změny výskytu metacerkárií zjištěných po antiparazitárních koupelích lze usuzovat na nízkou účinnost fenbendazolu, a naopak pravděpodobnou použitelnost praziquantelu v boji proti diplostomóze ryb.

7 Přehled použité literatury

- ANDREWS, P., H. THOMAS, R. POHLKE a J. SEUBERT, 1983. *Praziquantel*. Medicinal Research Reviews 3, 187-200 s.
- ADÁMEK, Z., a J. JIRÁSEK, 1989. *Herbivorous fish and tench fingerling rearing in monocultures and polycultures*. Brno: Vysoká škola zemědělská, 35 s.
- BARASSA, B., E. A. ADRIANO, S. ARANA a N. S. CORDEIRO, 2003. *Henneguya curvata* sp. (*Myxosporea; Myxobolidae*) parasitizing the gills of *Serrasalmus spilopleura* (*Characidae: Serrasalmidae*), *South American fresh water fish*. Praha: Folia Parasitol, 50(2),151–153s.
- BARNES, R. S. K., P. CALOW, P. J. W. OLIVE a D. W. GOLDING, 1988. *The Invertebrates: a New Synthesis*. Oxford: Blackwell Scientific Publications. ISBN 06-320-3127-1.
- BARUŠ, V., O. OLIVA a M. BARADLAIOVÁ, 1995. *Mihulovci--Petromyzontes, a ryby-Osteichthyes (2)*. Praha: Academia. 698 s.
- BAUER, O. N., J. A. STRELKOV a V. A. MUSSELIUS, 1981. *Bolezni prudovych ryb*. Moskva: Legkaja i piščevaja promyšlennost'. 318 s.
- BLAXHALL, P. C., 1972. The haematological assessment of the health of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*. (4), 593–604 s.
- BRASSARD, P., M. E. RAU a M. A. CURTIS, 1982. Parasite-induced susceptibility to predation in diplostomiasis. *Parasitology*. 85(3), 495–501 s.
- BYLUND, G., a SUMARI O. 1981. Laboratory test with Droncit againts diplostomiasis in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases* 4., 259-264 s.
- CIOLI, D., a L. PICA-MATTOCCIA, 2003. Praziquantel. *Parasitol Research*. (90), 3–9 s.
- COMBES, C., P. BARTOLI a A. THÉRON, 2002. Trematode transmission strategies. *The Behavioural Ecology of Parasites*. U. K.: Oxford University Press.
- ČÍTEK, J., J. TESARČÍK a Z. SVOBODOVÁ, 1992. *Nemoci ryb*. Praha: Informatorium. ISBN 80-85427-18-4. 229 s.
- DAYAN, A. D., 2003. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*. 86(2), 141–159 s.

- DOGIEL, V. A., G. K. PETRUSHEVSKI a Yu. I POLYANSKI, 1961. Parasitology of Fishes. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*. Edinburgh and London: Oliver and Boyd, 47(1), 384 s.
- DOUBEK, J., 2003. *Veterinární hematologie*. Brno: Noviko. ISBN 80-865-4202-5. 381–405 s.
- DUBSKÝ, K., V. ŠRÁMEK a J. KOUŘIL, 2003. *Obecné rybářství*. Praha: Informatorium. ISBN 80-733-3019-9. 308 s.
- DURAS J., CHANOVÁ, M., P. PUMANN a R. KOUBOVÁ, 2014. Cerkáriová dermatitida a jak k ní přistupovat. In: ŘÍHOVÁ AMBROTOVÁ, J. *Vodárenská biologie*. Praha, 150–162 s.
- ELLIS, A. E., 2001. The anatomy and physiology of teleosts. In: ROBERTS, R. *Fish Pathology*. Philadelphia: PA: WB Saunders.
- ERGENS, R., a J. LOM, 1970. *Původci parazitálních nemocí ryb*. Praha: Academia, 383 s.
- FLEGR, J., 2010. Vítejte v báječném novém světě parazitů. *Živa*. Praha: Academia, (5), 197–199 s.
- FUJIKI, K., H. MATSUYAMA a T. YANO, 1994. Protective effect of sodium alginates against bacterial infection in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases*. 17(4), 349–355 s.
- GENTEN, F., E. TERWINGHE a A. DANGUY, 2009. *Atlas of Fish Histology*. Enfield, NH: Science Publishers. ISBN 978-157-8085-446. 47–56 s.
- GIBSON, D. I., Digenea, 2001. In: COSTELLO, M. J. et. al. *European register of marine species: a check-list of the marine species in Europe and a bibliography of guides to their identification*. Collection Patrimoines Naturels, (50), 136–142 s.
- HANEL, L., 2008. Nepůvodní druhy v ichtyofauně České republiky – jejich vliv a význam. In: LUSK, S. a V. LUSKOVÁ. *Biodiverzita ichtyofauny ČR (VII)*. Brno: ÚBO AV ČR, 96 s.
- HANEL, L., a S. LUSK, 2005. *Ryby a mihule České republiky: rošíření a ochrana = Fishes and lampreys of the Czech Republic: distribution and conservation*. Vlašim: Český svaz ochránců přírody Vlašim. ISBN 80-863-2749-3. 448 s.
- HARTMAN, P., a J. REGENDA, 2014. *Praktika v rybníkářství*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. ISBN 978-80-7514-009-8. 375 s.

- HORÁK, P., a T. SCHOLZ, 1998. *Biologie helmintů*. Praha: Karolinum. ISBN 80-718- 4782-8.
- KEARN, G. C., 1998. *Parasitism and the Platyhelminths*. London: Chapman & Hall. ISBN 04-128-0460-3. 544 s.
- KOLÁŘOVÁ, J., a Z. SVOBODOVÁ, 2009. *Léčebné a preventivní postupy v chovech ryb*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický. ISBN 978-80-85887-88-4. 1-30 s.
- KOLÁŘOVÁ, J., ZUSKOVÁ, E., STEINBACH, C., a J. VELÍŠEK, 2016. Praktické návody k provádění vyšetřovacích a léčebných postupů u vybraných parazitárních onemocnění ryb. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 166, 36 s.
- KOUŘIL, J., a T. KEPRT, 1980. *Amur černý (Mylopharyngodon piceus Richardson) a možnosti jeho uplatnění v československém rybářství (Přehled)*. Vodňany: VÚRH, 21–23 s.
- KRUPAUER, V., 1989. *Býložravé ryby*. Praha: Ministerstvo zemědělství a výživy ČSR a Český rybářský svaz ve Státním zemědělském nakladatelství, 115 s.
- LARSEN, H. N., a S. F. SNIESZKO, 1961. Comparison of Various Methods of Determination of Hemoglobin in Trout Blood. *The Progressive Fish-Culturist*. 23(1), 8–17 s.
- LOTOCKI, T., 2014. Nemoci ryb způsobené červy – motolice. *Chytej.cz* [online]. 4. 8. 2014 [cit. 2019-05-01]. Dostupné z: <https://www.chytej.cz/clanky/1530/nemoci-ryb-zpusobene-cervy-motolice-10-dil/>
- LUCKÝ, Z., 1986. *Choroby chovných ryb*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 201 s.
- LUCKÝ, Z., 1966. *Metodické návody k diagnostice nemocí ryb*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 138 s.
- LUSKOVÁ, V., 1996. *Annual Cycles and Normal Values of Hematological Parameters in Fishes*. Brno: Acta Sc. Nat., (31), 1–70 s.
- MARKEVIČ, V., 1949. Gelmintofauna ryb r. Dněpra v rajoně m: trudy kenis. biogeograf. zapoved. Kaňeva: Kievskij děržav. Universites, 7 s.
- MARTINS, M. L., M. TAVARES-DIASII, R. Y. FUJIMOTOII a D. T. NOMURAI, 2004. Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporini* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* [online]. 2004, 56(5), 640-646 s. [cit. 2019-05-01]. ISSN 1678-4162.

- MASOPUST, J., 2000. *Klinická biochemie: Požadování a hodnocení biochemických vyšetření*. Praha: Karolinum. ISBN 80-718-4650-3. 832 s.
- NAŠINCOVÁ, V., Z. SVOBODOVÁ a J. ZAJÍČEK, 1990. Mnohobuněční cizopasnici našich užitkových ryb X.: Trematoda: Obecná charakteristika, patogenita, možnosti omezující výskyt šíření. *Československé rybníkářství*. X (2-3), 48–50 s.
- NAŠINCOVÁ, V., Z. SVOBODOVÁ a J. ZAJÍČEK, 1990. Mnohobuněční cizopasnici našich užitkových ryb IX.: Trematoda: Larvalní stádia (metacerkárie): Charakteristiky druhů rodu *Bucephalus*, *Rhytidocotyle*, *Diplostomum*, *Tylodelphis*, *Posthodiplostomus*, *Apharyngostrigea*, *Cytilunis* a *Paracoenogonimus*. *Československé rybníkářství*. IX (2–3), 56–65 s.
- NAVRÁTIL, S., Z. LUCKÝ a Z. SVOBODOVÁ, 2000. *Choroby ryb*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita. ISBN 80-851-1492-5. 155s.
- NOGA, E. J., 1996. *Fish disease: diagnosis and treatment*, Mosby-Year Book Inc., St. Louis, 367s.
- NOVOTNÝ, E., R. BÖHM, V. GEISSEL a J. HOLMAN, 1966. *Veterinární histologie*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 637 s.
- PIAČKOVÁ, V., A. ČÍŽEK, T. VESELÝ a D. POKOROVÁ, 2014. *Odběr vzorků pro bakteriologické a virologické vyšetření ryb*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. ISBN 978-80-87437-82-7. (142) 26 s.
- PIAČKOVÁ, V., M. PALÍKOVÁ, E. ZUSKOVÁ a M. FLAJŠHANS, 2014. *Stanovení diferenciálního počtu leukocytů ryb: Edice Metodik*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. ISBN 978-80-7514-024-1. (160), 56–64 s.
- POLJANSKIJ, J. I., 1958. *Parazitofauna i okružajuščajasreda: Osnovnyje problémy parazitol. ryb*, 55–56s.
- PRAVDA, D., a Z. SVOBODOVÁ, 2003. Hematologie ryb. In: DOUBEK, J., a kol. *Veterinární hematologie*. (odd. 10), Brno: Noviko, 381–405 s.
- PROST, M., 1980. *Choroby ryb*. Warszawa. ISBN 8309013353, 437 s.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T., C. M. ISHIKAWA, B. E. S. CAMPOS a A. C. EIRAS, 1997. Haematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil platanus* Günther, from the estuarine region of Cananéia, São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*. Curitiba, 14(2), 329–339 s.

- ROBERTS, R. J., a C. J. SHEPHERD, 1986. *Handbook of trout and salmon diseases*. Farnham: Fishing News Books. ISBN 08-523-8066-6. 222 s.
- ROBERTS, R. J., 1981. *Patologia de los peces*. Madrid: Mundi-Prensa.
- ROLBIECKI, L., 2006. Correlation between the occurrence of parasites and body length of roach, carp bream, European perch, zander, and ruffe in the Vistula Wetland estuary. *Oceanological and Hydrobiological Studies*. 3, 257–267 s.
- RUDOLPHI, K.A., 1819. *Entozoorum synopsis cui accedunt mantissa duplex et indices locupletissimi*. 811 s., Berolini.
- SEBASTIAO, F. A. D., R. NOMURA a F. PILARSKI, 2011. Haematology and reproductive performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) naturally infected with *Flavobacterium columnare*. *Braz J Microbiol.* (42), 282–289 s.
- SEDLÁK, E., 2000. *Zoologie bezobratlých*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-2892-0. 126s.
- SCHMAHL, G., a H. TARASCHIEWSKI, 1987. Treatment of fish parasites - 2: Effects of Praziquantel, Niclosamide, Levamisole-HCl, and Metrifonate on monogenea (*Gyrodactylus aculeati*, *Diplozoon paradoxum*). *Parasitology Research*. (73), 341–351s.
- SMITH, Ch. G., W. M. LEWIS a H. M. KAPLAN, 1952. A Comparative Morphologic and Physiologic Study of Fish Blood. *The Progressive Fish-Culturist*. 14(4), 169s.
- STOSKOPF, M. K., 1993. Clinical pathology. In: Stoskopf M (ed), *Fish Medicine*. Philadelphia, PA: WB Saunders.
- SUDOVOÁ, E., PIAČKOVÁ, V., KROUPOVÁ, H., PIJAČEK, M., SVOBODOVÁ, Z., 2009. *The effect of praziquantel applied per os on selected haematological and biochemical indices in common carp (Cyprinus carpio L.)*. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 599–605 s.
- SVOBODOVÁ, Z., Z. SVOBODOVÁ a J. TESARČÍK, 2007. *Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb*. 4., přeprac. vyd. Praha: Informatorium. ISBN 978-80-7333-051-4. 264s.
- SVOBODOVÁ, Z., a R. FAINA, 1992. *Prevence diplostomózy ryb*. Vodňany: Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický. ISBN 80-901087-4-1. 6–7 s.
- SVOBODOVÁ, Z., 1987. *Toxikologie vodních živočichů*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. 231s.

- SVOBODOVÁ, Z., D. PRAVDA a H. MODRÁ, 2012. *Metody hematologického vyšetřování ryb*. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. ISBN 978-80-87437-62-9. 38 s.
- SVOBODOVÁ, Z., D. PRAVDA a J. PALÁČKOVÁ, 1991. *Unified methods of haematological examination of fish*. Vodňany: Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology. 31s.
- SZÉKELY, C., a K. MOLNÁR, 1991. Praziquantel (Droncit) is effective against diplostomiasis of grass carp *Ctenopharyngodon idella* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS*. 11(2), 147–150 s.
- TOLEDO, R., a B. FRIED, 2014. *Digenetic Trematodes*. Springer. ISBN 978-1-4939-0914-8. 465s.
- TREVES-BROWN, K. M., 1999. Availability of medicines for fishes drugs. *Fish Veterinary Journal*. 4(40), 40–55 s.
- TREVES-BROWN, K. M., 2000. *Applied fish pharmacology*. Boston: Kluwer Academic Publishers. ISBN 04-126-2180-0 205-256, 309-310 s.
- Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv: Předepisování v rámci kaskády [online]. [cit. 2019-05-10]. Dostupné z: <http://www.uskvbl.cz/cs/informace/pro-veterinaremen/kaskadamen>
- VOLF, F., 1952. Oční zákal (Diplostomiasis). *Československý rybář*. (7), 76 s.
- VOLF, F., a J. HAVELKA, 1958. *Rybářská zdravotní věda*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. 206s.
- VOLF, P., a P. HORÁK, 2007. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton. ISBN.978-80-7387-008-9.
- WOO, P. T. K., 1998. Protection against Cryptobia (*Trypanoplasma*) salmositica and salmonid cryptobiosis. *Parasitol Today*. (14), 272–277 s.
- WOO, P. T. K., 2006. *Fish Diseases and Disorders Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections*, CAB International, Cambridge, MA.

8 Seznam tabulek

Tabulka č. 1	Výsledková tabulka s rozsahem hodnot naměřených při hematologickém vyšetření amurů bílých (<i>Ctenopharyngodon idella</i>). Str.: 39
Tabulka č. 2	Nálezy metacerkárií u amurů bílých (<i>Ctenopharyngodon idella</i>), při parazitologickém vyšetření oční čočky. Str.: 42
Tabulka č. 3	Nález metacerkárií v oční čočce po 1 týdnu. Str.: 42

9 Seznam obrázku a grafů

Obrázek č. 1	Životní cyklus motolice oční <i>Diplostomum spathaceum</i> . Str.: 14
Obrázek č. 2	Chemická struktura fenbendazolu. Str.: 19
Obrázek č. 3	Chemická struktura praziquantelu. Str.: 20
Obrázek č. 4	Chemická struktura levamisolu. Str.: 21
Obrázek č. 5	Skupina 20 l akvárií v laboratorní místnosti připravená na vysazení ryb. Str.: 31
Obrázek č. 6	Připravené koncentrace praziquantelu a fenbendazolu. Str.: 31
Obrázek č. 7	Injekční jehly pro odběr krve. Str.: 32
Obrázek č. 8	Odběr krve z ocasní cévy (<i>vena caudalis</i>). Str.: 32
Obrázek č. 9	Příprava vzorku na stanovení hematokritu (PCV). Str.: 33
Obrázek č. 10	Stanovení PCV. Str.: 34
Obrázek č. 11	Stanovení hemoglobinu (Hb) spektrometrem. Str.: 36
Obrázek č. 12	Parazitologické vyšetření oční čočky – preparace vzorku. Str.: 38
Obrázek č. 13	Oční čočky připravené na mikroskopování. Str.: 38

Graf č. 1 Sloupcový graf znázorňuje počet erytrocytů (RBC). Str.: 40

Graf č. 2 Sloupcový graf znázorňuje střední barevnou koncentraci (MCHC). Str.: 40

10 Seznam použitých zkratek

RBC	počet erytrocytů
WBC	počet leukocytů
PCV	hematokrit
Hb	množství hemoglobinu
MCV	střední objem erytrocytů
MCH	střední obsah hemoglobinu v erytrocytu
MCHC	střední barevná koncentrace
K	skupiny kontrol
PQ1	skupiny s koncentrací Praziquantelu 2 mg/l ⁻¹
PQ2	skupiny s koncentrací Praziquantelu 10 mg/l ⁻¹
FB	skupiny s koncentrací Fenbendazolu 25 mg/l ⁻¹
fl	femtolitr
pg	pikogram

11 Abstrakt

Cílem bakalářské práce bylo posoudit vliv vybraných antiparazitárních léčiv na zvolené hematologické ukazatele v krvi ryb a následně posoudit vliv těchto léčiv na parazitární onemocnění oční čočky způsobené motolicí oční (*Diplostomum spathaceum*).

Amuři bílí (*Ctenopharyngodon idella*) napadení motolicí oční byli vystaveni po dobu 24 hodin širokospektrálnímu antiparazitiku – praziquantelu v koncentracích 2 mg.l⁻¹ a 10mg.l⁻¹ a bendizimidazolovému derivátu – fenbendazolu v koncentraci 25 mg.l⁻¹. Po koupeli byla rybám odebrána krev, ve které byly stanoveny hematologické ukazatele – počet červených krvinek (RBC), počet bílých krvinek (WBC), hematokrit (PCV), hemoglobin (Hb), střední objem erytrocytu (MCV), hemoglobin erytrocytu (MCH), střední barevná koncentrace (MCHC). Ryby byly dále podrobeny parazitárnímu vyšetření oční čočky a byl posouzen vliv léčiv na metacerkárie motolice oční.

Z výsledků bylo patrné statisticky významné snížení počtu erytrocytů ($p < 0.05$) při použití fenbendazolu v koncentraci 25 mg.l⁻¹ a statisticky významné zvýšení střední barevné koncentrace ($p < 0.05$) u vyšší použité koncentrace praziquantelu (10 mg.l⁻¹). Zbylé stanovené hematologické ukazatele se nelišili od parametrů kontrolních skupin. Parazitárním vyšetřením byli zjištěny pouze statisticky nevýznamné odchylky, které byly dány nízkou iniciální prevalencí motolice oční u vyšetřovaných ryb.

Klíčová slova: *amur bílý, fenbendazol, praziquantel, metacerkárie, motolice oční*

Abstract

The aim of this bachelor's thesis was to consider the effect of chosen antiparasitics on hematological indicators in the blood of fish and consequently study the effect of these medicaments on parasitic disease of fish caused by trematode *Diplostomum spathaceum*.

Grass carps infected with trematode were exposed to broad-spectrum antiparasitics - praziquantel for 24 hours in the concentrations 2 mg.l⁻¹ and 10 mg.l⁻¹ and also in the benzimidazole derivative – fenbendazole in the concentration 25 mg.l⁻¹. Afterwards blood was taken from the fish and following indicators were stated – red blood cell (RBC), white blood cell (WBC), hematocrit (PCV), hemoglobin (Hb), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC). Another step was to examine the fish and consider the effect of medicaments on metacercariae of *Diplostomum spathaceum*.

Based on the results it was clear that there was a statistical decrease in the amount of erythrocytes ($p < 0.05$) when using fenbendazole in the concentration 25 mg.l⁻¹. Furthermore the results showed that when the concentration of praziquantel was higher (10 mg.l⁻¹), there was considerable increase in the middle colored concentration ($p < 0.05$). The other indicators did not differ from the parameters of the control groups. This examination showed only small statistically insignificant aberration, which was given by the low initial prevalence of *Diplostomum spathaceum* in the examined fish.

Key words: *grass carp*, *fenbendazole*, *praziquantel*, *Diplostomum spathaceum*, *metacercariae*