

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Fakulta rybnářství a ochrany vod**  
**Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický**

## **Diplomová práce**

### **Možnosti léčby smíšených infekcí ryb**

**Autor:** Bc. Jakub Kocour

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

**Konzultant bakalářské práce:** MSc. Dadras Asiabar Faranak

**Studijní program a obor:** Zemědělská specializace, Rybnářství a ochrana vod

**Forma studia:** Prezenční

**Ročník studia:** 2.

**České Budějovice, 2024**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne:

---

Jakub Kocour

## **Poděkování**

Tímto bych chtěl poděkovat své vedoucí diplomové práce MVDr. Elišce Zuskové, Ph.D. a všem pracovníkům VÚRH ve Vodňanech, za cenné rady, připomínky, pomoc a jejich čas, který mi věnovali při tvorbě mé diplomové práce.

# JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Akademický rok: 2022/2023

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Jakub KOCOUR**  
Osobní číslo: **V22N009P**  
Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**  
Studijní obor: **Rybářství a ochrana vod**  
Téma práce: **Možnosti léčby smíšených infekcí ryb.**  
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

### Zásady pro vypracování

Jedním z limitujících faktorů kvalitního odchovu je udržování dobrého zdravotního stavu ryb. Každý chovný proces má ve svém průběhu řadu kritických míst, kdy se zdravotní stav v souvislosti s výskytem stresorů zhoršuje. Při rozvoji podmínek vhodných pro působení infekčních činitelů je žádoucí mít nastavena taková preventivní opatření, která budou působení patogenních agens minimalizovat. Jako vhodné prostředky ošetření vody se jeví peroxid vodíku a kys. peroctová, které mají desinfekční účinek a současně ve vodním prostředí podléhají rychlé degradaci a nezanechávají rezidua.

Cílem práce bude posoudit vliv těchto oxidujících látek na zdravotní stav ryb. Bude sledován vliv aplikovaných látek na hematologické (RBC, WBC, Ht, Hb, MCV, MCH, MCHC) a biochemické (AST, ALT, LDH, Glu, TG atd.) markery, jakožto ukazatele stavu organismu. Dále bude sledován vliv těchto látek na parazitární a bakteriální osídlení ryb.

Metodicky budou provedeny dlouhodobé koupele ryb z chovného prostředí, kde se předpokládá výskyt patogenních činitelů. Po provedených koupelích bude rybám odebrána krev a stanoveny hematologické a biochemické parametry. Rovněž bude monitorován vývoj parazitárního a bakteriálního zatížení ryb. Získaná data budou následně statisticky zpracována.

Peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se běžně používá jako dezinfekční prostředek pro čištění ran u lidí. V akvakultuře se krátkodobé i dlouhodobé koupele využívají na různá infekční onemocnění. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> má prokázaný antiparazitární, antibakteriální i antimykotický efekt.

Kyselina peroctová (KPO) je rovněž velmi výhodná zejména z důvodů minimálního zatížení životního prostředí spolu s širokým spektrem účinnosti zahrnující dezinfekční, fungicidní, baktericidní, sporocidní a podle některých autorů i antiparazitární efekt (Stoskopf, 1993; Zusková a kol., 2011).

KPO i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jsou látky, u kterých není nutné stanovovat MRL a v odůvodněných případech je lze využít u potravinových zvířat.

Rozsah pracovní zprávy: **50-90 stran**

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

### Seznam doporučené literatury:

- Palíková, M., Piačková, V., Navrátil, S., Zusková, E., Papežiková, I., Kolářová, J., Pojezdal, L., Dyková, I., Scholz, Z., Gelnar, M., Svobodová, Z., Řehulková, E., Mareš, J., Modrá, H., Blažek, R., Veselý, T., 2019. Nemoci a chorobné stavy ryb. FROV JU, Vodňany, 462 s.
- Eiras J. C., Segner H., Wahli T., Kapoor B. G. (eds.) 2008. Fish Diseases. Science Publishers, Enfield, NH, USA.
- Hoole D., Bucke D., Burgess P., Wellby I. (eds.) 2001. Diseases of Carp and other Cyprinid Fishes. Blackwell Science, UK.
- Roberts R.J. 2012. Fish Pathology, 4th Edition, Wiley-Blackwell, 590 pp.
- Treves-Brown KM. 2000: Applied Fish Pharmacology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 310 pp.
- 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 akvarijních 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.

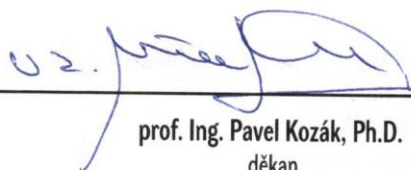
Vedoucí diplomové práce: **MVDr. Eliška Zusková, Ph.D.**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant diplomové práce: **Faranak Dadras Asiabar**

Datum zadání diplomové práce: **6. ledna 2023**

Termín odevzdání diplomové práce: **2. května 2024**

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD  
Zátiší 728/II  
389 25 Vodňany (2)  
L.S.

  
prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.  
děkan

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

## Obsah:

|  |    |
|--|----|
| 1. Úvod.....   | 9  |
| 2. Literární přehled .....                                   | 11 |
| 2.1. Vyšetření zdravotního stavu ryb .....                   | 11 |
| 2.1.1. Vyhodnocení zdravotního stavu ryb.....                | 11 |
| 2.1.2. Parazitologické vyšetření .....                       | 12 |
| 2.1.2.1. Pomůcky na parazitologické vyšetření ryb.....       | 13 |
| 2.1.2.2. Postup parazitologického vyšetření ryb.....         | 13 |
| 2.2. Nejběžnější ektoparazité .....                          | 15 |
| 2.2.1. Protozoa.....   | 15 |
| 2.2.1.1. Dinoflagellata – Piscinoodinióza.....               | 15 |
| 2.2.1.2. Ciliophora – Potenciálně parazitičtí nálevníci..... | 17 |
| 2.2.1.3. Ciliophora – Ichtyoftirióza .....                   | 18 |
| 2.2.1.4. Ciliophora – Chilodonelóza.....                     | 20 |
| 2.2.1.5. Ciliophora – Trichodinóza.....                      | 22 |
| 2.2.1.6. Kinetoplastea – Ichtyobodóza.....                   | 24 |
| 2.2.1.7. Kinetoplastea – Kryptobióza .....                   | 25 |
| 2.2.2. Metazoa .....   | 27 |
| 2.2.2.1. Žábrohlisti.....                                    | 27 |
| 2.2.3. Arthropoda.....                                       | 30 |
| 2.2.3.1. Ergasilóza .....                                    | 30 |
| 2.2.3.2. Lerneóza .....                                      | 31 |
| 2.2.3.3. Argulóza .....                                      | 32 |
| 2.3. Léčba parazitárních onemocnění .....                    | 34 |
| 2.3.1. Základy léčby parazitárních onemocnění.....           | 34 |
| 2.3.2. Základní léčebné metody.....                          | 35 |
| 2.3.2.1. Léčebné koupele .....                               | 35 |

|  |    |
|--|----|
| 2.3.2.2. Perorální aplikace léčiv .....                                    | 36 |
| 2.3.2.3. Injekční aplikace .....   | 36 |
| 2.3.3. Nejběžněji používaná léčiva na ektoparazitární onemocnění ryb ..... | 36 |
| 2.3.3.1. Formaldehyd .....   | 36 |
| 2.3.3.2. Kyselina peroctová .....  | 37 |
| 2.3.3.3. Peroxid vodíku .....  | 38 |
| 2.3.3.4. Chlorid sodný .....   | 39 |
| 2.3.3.5. Manganistan draselný .....  | 39 |
| 2.3.3.6. Malachitová zeleň .....   | 40 |
| 2.3.3.7. Modrá skalice .....   | 41 |
| 2.4. Hematologie .....   | 42 |
| 2.4.1. Rybí krev .....   | 42 |
| 2.4.2. Odběr krve .....  | 43 |
| 2.4.3. Stabilizace krve .....  | 45 |
| 2.4.4. Ukazatele červeného krevního obrazu .....                           | 46 |
| 2.4.5. Základní hodnoty erytrocytu .....                                   | 48 |
| 2.5. Biochemické vyšetření krve ryb .....                                  | 49 |
| 2.5.1. Odběr krve pro biochemické vyšetření .....                          | 50 |
| 2.5.2. Zpracování krve pro biochemické vyšetření .....                     | 50 |
| 2.5.3. Biochemické stanovení ukazatelů .....                               | 50 |
| 3. Materiál a metodika .....   | 54 |
| 3.1. Hematologické vyšetření .....   | 56 |
| 3.2. Biochemické vyšetření .....   | 57 |
| 3.3. Bakteriologické vyšetření .....                                       | 57 |
| 3.4. Parazitologické vyšetření kůže a žaber .....                          | 58 |
| 3.5. Statistické vyhodnocení .....   | 60 |

|  |    |
|--|----|
| 4. Výsledky .....                              | 61 |
| 4.1. Mortalita.....                            | 61 |
| 4.2. Fyzikálně chemické parametry vody .....   | 61 |
| 4.3. Hematologické vyšetření.....              | 62 |
| 4.4. Biochemické vyšetření.....                | 63 |
| 4.5. Bakteriologické vyšetření .....           | 64 |
| 4.6. Parazitologické vyšetření kůže ryb .....  | 65 |
| 4.7. Parazitologické vyšetření žaber ryb ..... | 66 |
| 5. Diskuze .....                               | 67 |
| 6. Závěr .....                                 | 71 |
| 7. Seznam použité literatury .....             | 72 |
| 8. Abstrakt.....                               | 86 |
| 9. Abstract.....                               | 87 |



## 1. Úvod

Akvakultura má pro lidskou populaci velký význam, který bude v budoucnu pravděpodobně narůstat (Buchmann, 2022). Přestože jsou parazité důležitou součástí biodiverzity, jejich výskyt, společně s výskytem onemocnění ryb může představovat jedno z hlavních omezení v rozvoji a udržitelnosti akvakultury (Shafiq a kol., 2023). Infekce se do rybochovných zařízení mohou dostat z divokých populací, evolucí z nepatogenních mikroorganismů či záměrným přesunem ryb (Murray a Peeler, 2005). Podmínky v akvakulturních zařízeních jsou často příznivé pro propuknutí parazitárních, ale i jiných onemocnění. Je to dáno tím, že ryby jsou v akvakultuře chované často ve vysokých hustotách a dochází zde ke stresu ryb, například nevhodnou kvalitou vody. To všechno může zvýšit riziko vzniku a šíření infekcí (Shafiq a kol., 2023).

S růstem akvakultury dochází k rozšíření chovů o nové druhy ryb. To může také vést k zanesení nových patogenů, které mohou nepříznivě ovlivnit jak ryby chované v akvakultuře, tak i ryby ve volných vodách (Murray a Peeler, 2005). Hlavní problémy spojené s parazitárními infekcemi v akvakultuře jsou vysoké ekonomické ztráty, způsobené například snížením produktivity nebo tím, že parazité znehodnotí vytěžované produkty (Shinn a kol., 2015). Lidé mají několik možností, jak s takovými parazity bojovat. Lze využít různá léčiva nebo dostupné mechanické, biologické, imunoprofylaktické či genetické metody kontroly (Buchmann, 2022).

Nejsnazší možností léčby různých infekcí ryb je aplikace léčiv do vody. Takto aplikované látky bývají účinné na ekotoparazitární, bakteriální a plísňové onemocnění kůže a žaber ryb (Svobodová a kol., 2007). Problémem souvisejícím s léčebnými koupelemi ryb je v dnešní době narůstající počet zakázaných látek, které se nemohou užívat. K zákazům takových látek dochází z důvodů omezení znečišťování životního prostředí, výskytu reziduí v mase ryb, ale také kvůli jejich dalším vlastnostem, například karcinogenitě. Příkladem takové látky je malachitová zeleň, jež je karcinogenní a zanechává rezidua v mase ryb (Máchová a kol., 1996). Malachitová zeleň u nás byla v roce 2000 zakázána pro použití u potravinových ryb. Stále se hledají různé shodně účinné náhrady a nová léčiva, která by zakázané látky účinně nahradila.

Vhodnými terapeutiky mohou být desinfekční látky, konkrétně jejich reziduální koncentrace v ošetřené vodě. Hojně využívanými látkami jsou kyselina peroctová a peroxid vodíku. Obě látky nezanechávají v mase ani ve vodě žádná toxická rezidua

a rychle se rozkládají (Payne, 1988; Block, 2001; Monarca a kol., 2002). Také jsou cenově dostupné. Proto byly vybrány pro hodnocení jejich vlivu na hematologické a biochemické ukazatele a dále na bakteriální a parazitární osídlení kůže a žaber po expozici ryb těmito látkám. Jako testovací organismus byl vybrán kapr obecný (*Cyprinus carpio*), který je u nás hlavním pilířem rybníčního hospodářství (Hartman a Regenda, 2016).

## **2. Literární přehled**

### **2.1. Vyšetření zdravotního stavu ryb**

#### **2.1.1. Vyhodnocení zdravotního stavu ryb**

Hodnocení zdravotního stavu rybí obsádky je běžnou praxí každého chovatele. Z toho důvodu je nutné, aby každý chovatel dokázal rozpoznat nemocné ryby. Hodnocení je možné provádět mnoha způsoby (Lloret a kol., 2012). V případě běžné kontroly zdravotního stavu ryb provádí chovatel kontrolu v přirozeném prostředí ve vodě nebo po vylovení ryby. Zhodnocení zdravotního stavu ve vodě má svá úskalí a není ho možné provádět všude. Je omezeno například průhledností vody, která bývá nízká v rybníčních chovech, a naopak vysoká například v chovech lososovitých ryb. To není jediným omezením. Pozorování obsádky ztěžuje i výskyt makrofyt v rybnících a jejich velká rozloha. Zákal je přirozený a je možné z něho odvozovat dobrý zdravotní stav obsádky. V případě výskytu velmi čisté vody v rybníce může chovatel očekávat problém s rybí obsádkou (Svobodová a kol., 2007).

Mezi nespecifické příznaky zhoršeného zdravotního stavu ryb patří změna přirozeného chování. Ryby se oddělují od hejna, nepřijímají potravu, vyskytují se těsně pod hladinou nebo u přítoku. Je u nich možné pozorovat narůstající apatii, ztrátu přirozených reflexů (ryby ztrácí únikový reflex), plavou kolem své osy, různě se točí, otírají se o předměty pod vodní hladinou apod. (Svobodová a kol., 2007). Parazitární infekce konkrétně doprovází klinické příznaky, které úzce souvisí s aktivitou konkrétního parazita v místě, které napadl (Weber a Govett, 2009). Klinickými příznaky výskytu ektoparazitů jsou nejčastěji: otírání ryb o předměty pod vodní hladinou, změna zbarvení, šedavý povlak na povrchu těla, zvýšená produkce hlenu, nouzové dýchání (tzv. troubení u kaprovitých ryb), světlá barva žaber a nechutenství (Kolářová a kol., 2017).

Parazité patří mezi časté původce onemocnění v akvakultuře. Přítomnost parazitů na povrchu ryb může ovlivňovat jejich vzhled, ale především jejich celkový zdravotní stav. To má dopady především na ekonomiku podniku (Weber a Govett, 2009). Chovatel ryb by v takovém případě měl být schopen odebrat vzorky, zajistit vyšetření veterinárním lékařem a prodiskutovat s odborníky odpovídající léčbu. Vnější parazité mohou vykazovat různou orgánovou či druhovou specifitu. Obecně však platí, že největší škody páchají druhově nespecifičtí parazité (Kolářová a kol., 2017). Ryby, které byly napadeny

ektoparazity jsou náchylnější k bakteriálním a virovým onemocněním, a to díky vzniklým povrchovým lézím, které bakterie či viry mohou využít jako vstupní bránu do organismu (Xu a kol., 2012; Kolářová a kol., 2017; Kotob a kol., 2017).

Parazitě působí dle druhu tkáně následující poškození:

- **Žábry** – žaberní tkáň reaguje na ektoparazitární napadení hyperplazií (zmnožením počtu buněk) a zvýšenou produkcí hlenu na jejich povrchu (Kolářová a kol., 2017). Oba procesy snižují výměnu plynů a iontů mezi organismem a vnějším prostředím. To vede ke zhoršenému dýchání. Hyperplazie žaberního epitelu je považována spolu s hypertrofií za obranný mechanismus, který také brání přenosu xenobiotik (Mallatt, 1985; Roberts, 2012).
- **Kůže** – ektoparazitě narušují vnější ochrannou hlenovou vrstvu a působí mechanická poškození narušující osmotickou rovnováhu. Tato poškození jsou rovněž vstupní branou pro různé sekundární patogeny (bakterie, viry, plísňe) vyskytující se ve vodním prostředí (Kolářová a kol., 2017).

### **2.1.2. Parazitologické vyšetření**

Parazitologické vyšetření ryb se provádí makroskopicky a následně mikroskopicky za pomoci binolupy nebo mikroskopu. Makroskopicky hodnotíme celkový stav ryby, povrch rybích žaber, kůže a také ploutví. Někteří ektoparazitě jsou díky své velikosti na hranici makroskopické viditelnosti ve formě bělavých teček či „moučného“ posypu (kožovec, obrněnka apod.) (Weber a Govett, 2009). Mikroskopicky pak vyšetřujeme kožní a žaberní stěry, popřípadě vzorky odebrané biopsií ze živých organismů nebo nekropsií z usmrčených organismů. Nejběžněji se pro parazitologické vyšetření odebírají vzorky žaberní tkáně, seškrab z kůže nebo obsah trávicího traktu. Odebrané vzorky vyšetřujeme pod mikroskopem. Doplňkově pak můžeme mikroskopicky vyšetřovat například oční čočku při podezření na přítomnost motolice oční (Kolářová a kol., 2017).

### 2.1.2.1. Pomůcky na parazitologické vyšetření ryb

Vzhledem k velikosti většiny parazitů je jejich pozorování pouhým okem prakticky nemožné, proto je jednou z nejzákladnějších a nejnütnějších pomůcek mikroskop. Mezi další pomůcky patří kádinka s vodou, skalpel, nůžky, pinzety a podložní a krycí sklíčka (viz Obr. 1.).



Obr. 1. - Pomůcky pro odběr a přípravu vzorků; foto Ch. Steinbach.

### 2.1.2.2. Postup parazitologického vyšetření ryb

V první řadě před vyšetřením zjistíme anamnestické údaje, které nám mohou usnadnit diagnózu, a to:

- druh a věk ryby,
- původ ryby,
- chovné podmínky – popis chovných zařízení, prostředí, ve kterém se ryba vyskytovala, chemické a fyzikální parametry vody, druh krmení atd.,
- dosavadní průběh onemocnění – zjištěné klinické příznaky a doba jejich trvání, úhyny obsádky atd.,
- provedená opatření – pokud byla provedena již nějaká léčba či změna chovných podmínek (úprava teploty atd.).

Z těchto anamnestických údajů může čerpat veterinární lékař a mohou mu ulehčit stanovení diagnózy.

Samotné parazitologické vyšetření probíhá dle zjištěného stavu. Před vyšetřením nejprve rybu usmrtíme. Menší druhy ryb a mladší vývojová stádia zastříhnutím za hlavou, kdy dojde k přetnutí míchy, větší ryby tupým úderem do hlavy. V případě vyšetření vzácných ryb (koi kapr, generační ryby apod.) je možné šetrně odebrat vzorky i z ryb živých, místa odběru vydesinfikovat a ryby vrátit do čisté karanténní nádrže, dokud se místa odběru vzorků nezhojí. V případě provedení kožního stěru rybu položíme na bok a pomocí podložního sklíčka či skalpelu setřeme povrch těla ryby (Weber a Govett, 2009). Stěr je vhodné provádět ze znatelných lézí, v místech nad prsními ploutvemi nebo pod hřbetní ploutví (Frimeth, 1994). Další místa, kde lze často nalézt vyšší počet parazitů jsou hlava a ocasní ploutev (Kolářová a kol., 2017). Následně odebraný materiál přeneseme na podložní sklíčko, přidáme kapku vody pro lepší rozprostření odebrané tkáně a zakryjeme krycím sklíčkem. Žábry vyšetřujeme obdobně, jen je třeba provádět stěr z celého povrchu žaberního lístku, jelikož někteří parazité preferují uchycení u základny a jiní na periferii žaberního lístku. U malých ryb odebereme jeden celý žaberní oblouk, kde odstráníme chrupavčitý podklad, který by zabraňoval následné kompresi vzorku pod krycím sklíčkem. Při parazitologickém vyšetření oční čočky rybě rozstrihneme nůžkami rohovku a pomocí pinzety čočku vytlačíme ven. Přesuneme ji na podložní sklíčko a překryjeme ji druhým podložním sklíčkem (Obr. 2.). Následným tlakem čočku rozmáčkne a můžeme mikroskopovat.

Mikroskopické vyšetření preparátů provádíme ihned po jejich vytvoření. Využíváme zvětšení 40–400× (Weber a Govett, 2009). Nejprve mikroskopujeme vzorek na nejmenší zvětšení a postupně přecházíme k největšímu zvětšení a meandrovitě postupujeme celým preparátem. V mikroskopu se zaměřujeme zejména na pohybující se objekty (parazity). Kromě parazitů můžeme v preparátech nalézt i různé mykotické hyfy, sinice, hlen atd. (Kolářová a kol., 2017).



Obr. 2. - Preparáty připravené pro mikroskopii; foto: E. Zusková.

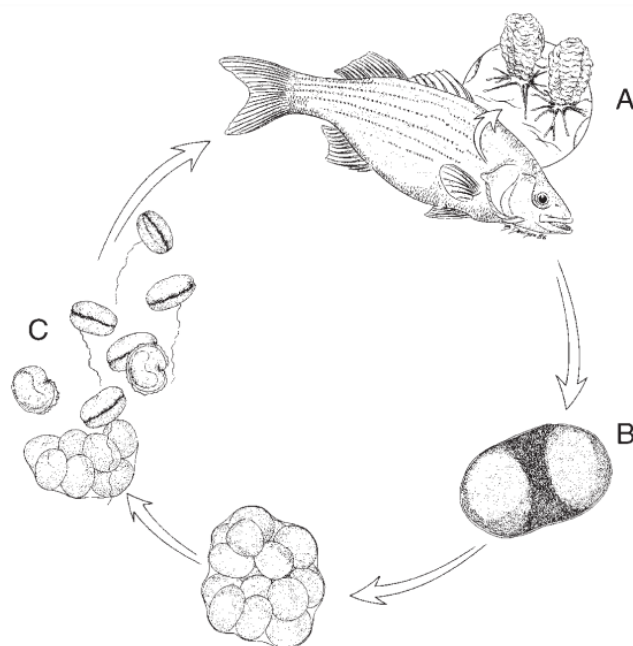
## 2.2. Nejběžnější ektoparazité

### 2.2.1. Protozoa

#### 2.2.1.1. Dinoflagellata – Piscinoodinióza

Původcem piscinoodiniózy je obrněnka *Piscinoodinium pillulare*. Tato choroba je též někdy nazývána obrněnkovitost (Palíková a kol., 2019). V našich podmínkách je piscinoodinióza ektoparazitózou, objevující se především v chovech akvarijských ryb a tropických druhů ryb (Navrátil a kol., 2000; Svobodová a kol., 2007). Vnímavé mohou být také naše sladkovodní ryby, jako je kapr obecný nebo lín obecný (*Tinca tinca*). Mimo to existují studie, které prokazují, že obrněnka může napadat i vývojová stádia obojživelníků (Geus, 1960). V chovech akvarijských ryb jsou na patogen vnímavá zejména mladší vývojová stádia (Navrátil a kol., 2000). Životní cyklus parazita (Obr. 3.) zahrnuje několik vývojových stádií. Trofont neboli přisedlé stádium na kůži ryb, případně na jejich žábrách, je organismus hruškovitého či váčkovitého tvaru. Má žlutozelenou až hnědou barvu a dosahuje délky do 140  $\mu\text{m}$  (Shäperclaus, 1951). Stopka s přichytným diskem vychází ze spodní části. Ze stopky vychází úzké, pevné rhizocysty. Ty pronikají do cytoplazmy hostitelské buňky (Woo, 2006). Zralý trofont se uvolní, odpadne od těla hostitele a ztratí stopku. Tím vznikne tomont (Navrátil a kol., 2000; Woo, 2006). Ten se přichytí na dno, vícekrát se nepohlavně rozdělí a vznikne 128 nebo 256 tomitů. Následnou

diferenciací vzniknou nová infekční stádia nazývaná dinospory. Ty jsou opatřeny dvěma bičíky. Díky bičíkům jsou schopny se aktivně pohybovat a vyhledávat hostitele (Svobodová a kol., 2007). Velikost dinospor je poměrně uniformní a jejich počet odpovídá velikosti tomonta (Woo, 2006).



Obr. 3. – Životní cyklus *Piscinoodinium pillulare*, A - parazitický trofont, B - encystovaný tomont, C - parazitické dinospory; převzato z Woo (2006) (upraveno).

Průběh tohoto onemocnění je závislý na intenzitě napadení. Klinické příznaky se vyskytují až v pokročilejších fázích onemocnění. V takových fázích jsou ryby neklidné, mají podrážděnou kůži, otírají se o různé předměty (Navrátil a kol., 2000). Hynoucí ryby jsou potaženy šedavo-bělavým povlakem, často bývají vyhublé se ztrátou přirozené pigmentace. Mohou se objevovat i příznaky dušení (Navrátil a kol., 2000; Woo, 2006).

Patologické příznaky lze pozorovat mikroskopicky. Většinou je možné vidět degenerativní až nekrotické změny na epiteliálních buňkách kůže a žaber (Svobodová a kol., 2007). Takové změny jsou velmi dobře patrné při histologickém vyšetření. Na rybích žábách můžeme pozorovat jak výraznou hyperplazii epitelu, tak i odlupování epitelu (Ferraz a Sommerville, 1998).

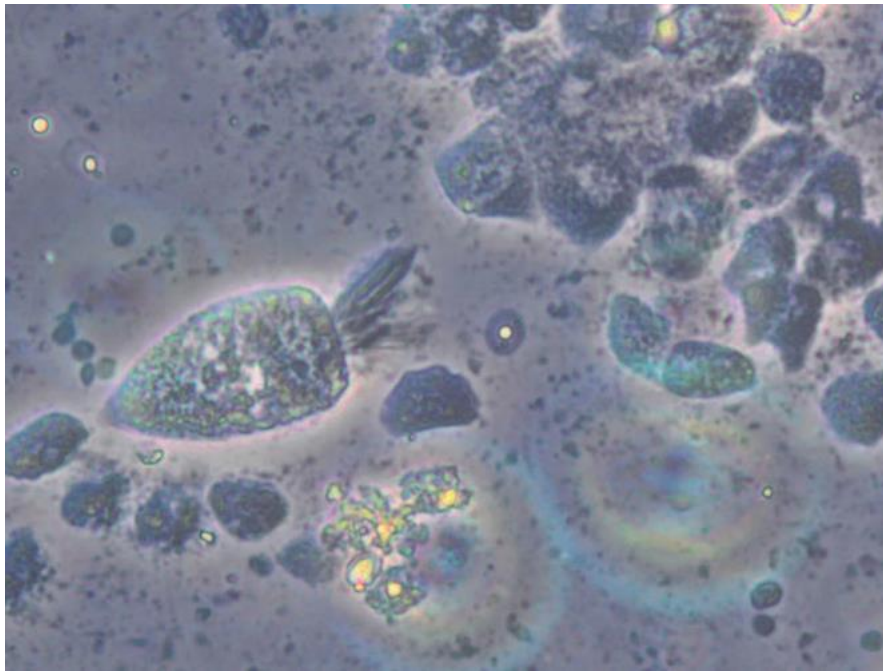


### 2.2.1.2. Ciliophora – Potenciálně parazitičtí nálevníci

Ve vodě se vyskytuje mnoho druhů nálevníků, kteří jsou za normálních podmínek pro ryby naprosto neškodní. V případě poškození či oslabení ryby např. sníženou kvalitou vody, mohou svým pomnožením a těsným přichycením na těle výrazně zhoršit zdravotní stav (Palíková a kol., 2019).

Rod *Apiosoma* spadá do skupiny (Oligohymenophorea: Peritrichia). Mnoho druhů z tohoto rodu parazituje na povrchu těla sladkovodních ryb. Makronukleus těchto nálevníků je kompaktní, obvykle kuželovitý.

*Apiosoma piscicola* (Obr. 4.) je nálevník vyskytující se v Evropě, Severní Americe a jižní Africe. Přichycuje se na žábry a povrch těla. Má podlouhlé tělo 110  $\mu\text{m}$  dlouhé a 40  $\mu\text{m}$  široké (Woo, 2006), které se zužuje od peristomického disku ke stopce a může vykazovat určitou variabilitu ve tvaru a velikosti těla (Li a kol., 2008). K substrátu se přichycuje pomocí přichytné plošky na zúžené straně těla (Navrátil a kol., 2000).



Obr. 4. – *Apiosoma piscicola*, zvětšeno 400 $\times$ ; převzato z Blažeković – Dimovska a Stojanovski (2020) (upraveno).

Rod *Ambiphrya* zahrnuje nálevníky napadající sladkovodní i mořské ryby. Jejich makronukleus má tvar zahnuté, vlnité, tenké stuhu (Woo, 2006).

*Ambiphrya ameiuri* je druh nálevníka, který pochází ze Severní Ameriky, byl introdukován do Ruska, ale i Evropy. Název získal podle jeho nálezu na žábách *Ameiurus melas* v Severní Americe (Thompson a kol., 1946). Dorůstá velikosti 50–95 × 40–61 μm a tvar jeho těla je kónický nebo cylindrický (Woo, 2006; Palíková a kol., 2019). K substrátu se fixuje pomocí plochého přichytného disku, který je někdy excentrický a přesahuje šířku nálevníka (Palíková a kol., 2019). *A. ameiuri* nezpůsobuje rybám žádné zranění a živí se organickými částicemi z okolní vody (Woo, 2006; Palíková a kol., 2019).

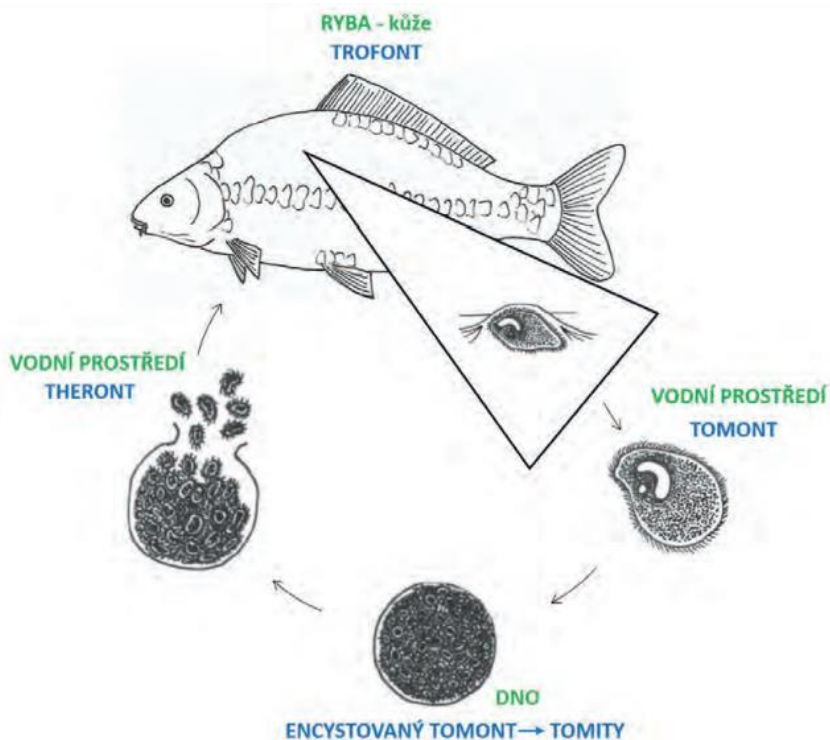
Rod *Epistylis* obsahuje koloniální nálevníky se zvonovitým, válcovitým nebo protáhlým tělem. Nestahující se stonek může nést až několik jedinců. Jednotlivé druhy jsou buď volně žijící nebo epizoické. Na rybách se vyskytuje pouze 5 druhů (Woo, 2006).

*Epistylis lwoffii* je kruhobrvý nálevník vyskytující se v Severní Americe, Evropě a Asii. Tento parazit se vyskytuje na kůži a žábách mnoha sladkovodních ryb. U nás jej nacházíme především na kůži kapra obecného a dalších kaprovitých ale i lososovitých ryb (Palíková a kol., 2019). *E. lwoffii* má tělo ve tvaru zvonku a je veliké 40–80 × 20–30 μm. Uvnitř má podkovovité jádro a jádérko. K substrátu se přichycuje stopkou, která je extrémně variabilní, a to i u jedinců od jednoho hostitele (Lom a Dyková, 1992; Woo, 2006). V případě masivního pomnožení může vyvolat proliferaci a destrukci epidermis a tyto léze mohou být vstupní branou bakteriálních infekcí (Lom, 1966).

### 2.2.1.3. Ciliophora – Ichtyoftirióza

Onemocnění nazývané ichtyoftirióza (někdy též krupička či white spot disease) je způsobeno nálevníkem *Ichthyophthirius multifiliis*, česky nazývaný „kožovec“. Ten je jedním z nejčastějších původců onemocnění mořských i sladkovodních ryb. Po svém povrchu má rozmístěné řasinky umožňující jeho typický, pomalu se otáčející pohyb. Obsahuje velké podkovovité jádro a dále jedno až čtyři kulatá jádérka, která jsou důležitá pro genetickou výměnu (Nanney, 1980). Počet těchto jáderek závisí na teplotě vody (Matthews a kol., 1996).

Životní cyklus parazita (Obr. 5.) můžeme rozdělit do několika stádií. Vývojové stádium kožovce, které napadá ryby a parazituje na jejich žábřácích nebo kůži se nazývá trofont. Trofont je stádium živící se obsahem buněk v epitelové vrstvě. Postupně se zvětšuje. Pohybuje se rotací, tvoří si místo a tím dochází k poškození sousedních epiteliálních buněk. Parazit dosahuje velikosti 30–1000  $\mu\text{m}$ . Na povrchu těla ryby můžeme pozorovat místa která si parazit vytváří jako malé bílé tečky, které mohou dosahovat velikosti až 1 mm. V některých případech může být v jednom takto jevícím se místě i více parazitů (Eiras a kol., 2008). Po nějakém čase přestane jedinec přijímat potravu a svého hostitele opustí. V ten moment dochází ke změně stádia, které nazýváme tomont. Tomont následně přisedá k podkladu, například ke dnu odchovné nádrže, kde vytváří jakousi želatinovou cystu, která má za úkol ho chránit. Uvnitř cysty dochází k mnohonásobnému dělení. Tímto dělením vznikají stovky tomitů (Ewing a kol., 1983). Postupným dozráváním se z tomitů stanou theronty, které jsou invazivní. Jejich tvar je hrůškovitý a jejich celý povrch těla je opatřen řasinkami. Theronty se po uvolnění z želatinového obalu dostávají do vodního prostředí, kde aktivně vyhledávají nového hostitele.

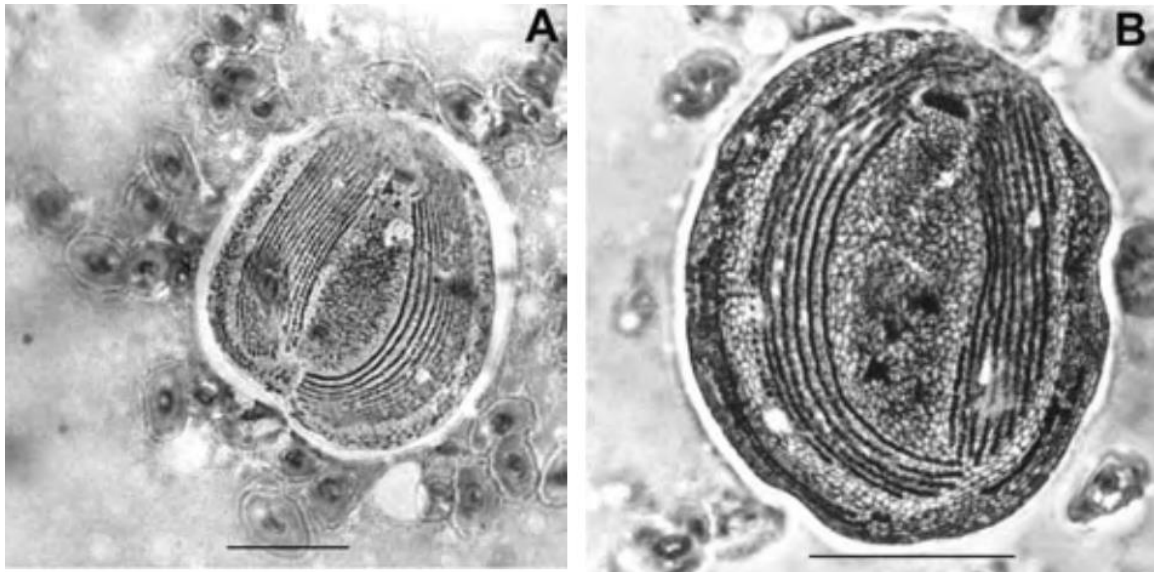


Obr. 5. – Vývojový cyklus *Ichthyophthirius multifiliis*; převzato z Palíková a kol. (2019) (upraveno).

Klinické příznaky napadení tímto parazitem se projevují dle fází infekce. Úmrtnost ryb při nákaze kožovcem bývá vysoká. Je to způsobeno snížením dýchací kapacity, ale také podporou rozvoje přídružených bakteriálních a virových onemocnění (Abu-Elala a kol., 2021). Experimentálně bylo testováno použití algivorních ryb, konkrétně *Glyptoperichthys gibbiceps* jako biologické kontroly proti přisedlým tomontům. Bylo zjištěno že přítomnost této ryby snížila množství parazitů na *Oreochromis aureus* o 63 % (Picón-Camacho a kol., 2012).

#### 2.2.1.4. Ciliophora – Chilodonelóza

Rod *Chilodonella* zahrnuje mnoho druhů volně žijících nálevníků. Z nich ale pouze dva druhy (Obr. 6.) parazitují na rybách. Prvním druhem je *Chilodonella piscicola* a druhým méně rozšířeným druhem je *Chilodonella hexasticha* (Woo, 2006). Tyto druhy způsobují onemocnění chilodonelózu, česky čepelenkovitost. Toto onemocnění působí výrazné ztráty jak v rybníčních chovech, tak i ve speciálních rybochovných objektech (Svobodová a kol., 2007). Silné infekce mohou vést k úhynu ryb do dvou až tří dnů a celkovým ztrátám v rozmezí 50–95 % (Paperna a Van As, 1983; Karvonen a kol., 2010). Oba dva druhy jsou dorzoventrálně zploštělé a mají oválný tvar. Jejich ventrální strana je opatřena cytostomem a podél okrajů má dva pásy tvořené z několika řad řasinek. První zmíněný druh, *Chilodonella piscicola* (dříve nazývaná *Chilodonella cyprini*), je 30–80 × 20–62 μm velká. Její vyklenutý (pravý) pás řasinek je obvykle vytvořen 8–11 řadami a rovný (levý) pás je tvořen 12–13 řadami řasinek. Druhý druh, *Chilodonella hexasticha*, je menší druh dorůstající 30–67 × 20–51 μm. Její pásy řasinek jsou tvořeny menšími počty. Vyklenutý pás se obvykle skládá z 5–7 pásů řasinek a levý pás z 6–9 pásů řasinek (Eiras a kol., 2008).

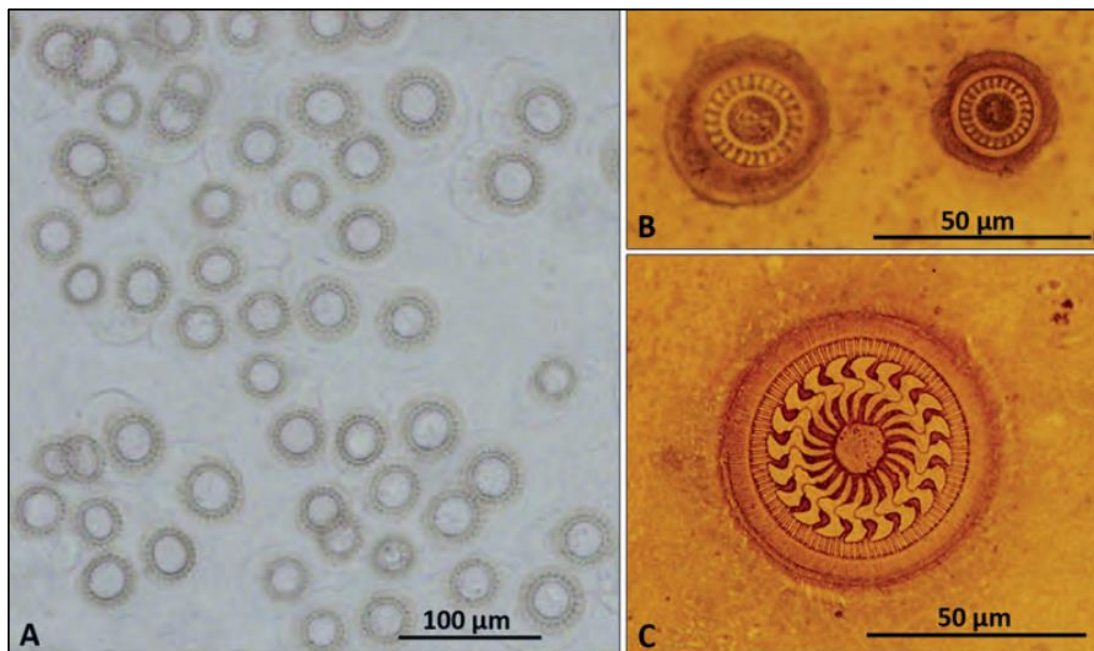


Obr. 6. – A – *Chilodonella piscicola*, B – *Chilodonella hexasticha*; převzato z Woo (2006) (upraveno).

Toto onemocnění se vyskytuje především při vysoké hustotě ryb a oslabení ryb stresem, především při nízkém obsahu kyslíku apod. *Chilodonella piscicola* napadá ryby především při nízkých teplotách, od 4 °C až po teploty okolo 20 °C. Napadení druhým druhem, *Chilodonella hexasticha*, může postihovat ryby i při vyšších teplotách, a to v rozmezí 26–31 °C (Shariff, 1983). Příznaky většího napadení ryb se projevují především ke konci zimy. Ryby se shromažďují u hladiny a přítoku. Nouzově dýchají, jsou vyčerpané a jejich pohyby jsou nekoordinované. Mohou i hynout (Woo, 2006). Parazité se živí buněčným obsahem, tím způsobí podráždění, které vede k následné hyperplazii epitelu (Palíková a kol., 2019). Vysoké napadení se projevuje zvýšenou produkcí hlenu, ten se může i se zbytky epitelu odlupovat. Respirační epitel překryje proliferující epitel, tím dojde k výraznému zmenšení plochy pro výměnu plynů. Časem se může žaberní tkáň rozpadnout a zbydou pouze chrupavčité paprsky žaberních lístků (Woo, 2006).

### 2.2.1.5. Ciliophora – Trichodinóza

Trichodinóza je onemocnění, které způsobují nálevníci česky nazývaní brousilky (Obr. 7.). Pojmenování je odvozeno od jejich typického krouživého pohybu. Doposud je popsáno přes 190 druhů, které řadíme do sedmi rodů – *Trichodina*, *Vauchomia*, *Hemitrichodina*, *Trichodinella*, *Paratrichodina*, *Dipartiella* a *Tripartiella* (Lom a Dyková, 1992). Lom (1958) navrhl jejich taxonomický systém. Tvar jejich těla je kloboukovitý, přičemž na spodní straně mají adhezivní disk. Ten tvoří koncentricky uspořádané zoubky a věnec krátkých tyčinek. Tímto diskem se trichodiny přichycují na kůži nebo žábry ryb. Některé druhy je obtížné rozeznávat na základě jejich morfologie (Wang a kol., 2020). Jejich vnitrodruhová variabilita je velká, odráží se zejména ve vysoké variabilitě jejich „zoubků“, která je pravděpodobně nejdůležitějším faktorem v jejich taxonomii (Gaze a Wootten, 1998). Všechny zoubky jsou tvořeny třemi základními částmi. První část je proximální, druhá centrální a poslední je distální část. Pohyb parazita umožňuje řada bičíků na okraji (Woo, 2006). Velikost přichytného disku se pohybuje v rozmezí 50–100  $\mu\text{m}$  (Corliss, 1979).



Obr. 7. – A – nativní preparát stěru s masivní intenzitou brousilek, B – *Trichodinella epizootica* (preparát impregnovaný stříbrem), C – *Trichodina acuta* (preparát impregnovaný stříbrem); převzato z Palíková a kol. (2019) (upraveno).

Brousilky se množí binárním dělením a jejich hlavní potravou je drobný detrit a bakterie z vody. Některé druhy se vyskytují i v močovém měchýři, ledvinách, vejcovodech nebo gastrointestinálním traktu (Lom a Haldar, 1976; Li a Desser, 1983; Basson a kol., 1990; Van As a Basson, 1996). Co se týče jejich hostitelské specifity, tak je obecně nízká. Některé druhy jako např. *Trichodina jadratica* parazitují jak na mořských, tak i na sladkovodních rybách (Lom a Dyková, 1992). Většinou se tyto parazité vyskytují společně s jinými parazity (například žábrolísty) (Barker a kol., 2002). Podle oslabení hostitelského jedince a rychlosti množení je průběh akutní nebo chronický. Při velkém napadení přecházejí ektozoické druhy na parazitický způsob života a živí se buňkami poškozených epitelů. Endozoické druhy po přemnožení poškozují trávicí nebo urogenitální ústrojí (Navrátil a kol., 2000). Při vysokých intenzitách napadení můžeme pozorovat bělavý povrch kůže, příznaky dušení nebo otírání ryb o předměty pod vodní hladinou.

Rod *Trichodina* – Zoubky přichytného disku jsou složeny z dobře vyvinutých čepelí, paprsků a centrálních částí. Čepele jsou rovné, ploché či polokruhovitě. Paprsky jsou jehlovitého nebo tyčinkovitého tvaru a jsou různě dlouhé. Průměrná velikost přichytného disku je 18–80 µm. Zástupci tohoto rodu byli popsáni na všech kontinentech, kromě Antarktidy (Woo, 2006; Palíková a kol., 2019). Mezi zástupce řadíme druhy: *Trichodina reticulata*, *T. fultoni*, *T. acuta*, *T. jadratica*, *T. perforata*, *T. heterodontata*, *T. mutabilis*, *T. nobilis*, *T. urinaria*, *T. polycirra*.

Rod *Paratrachodina* – Brousilky zařazované do tohoto rodu jsou obecně menších rozměrů než brousilky z rodu *Trichodina*. Jejich zoubky mají dobře vyvinuté paprsky, spojené dohromady jen v centrální části. Velikost jejich přichytného disku se pohybuje v rozmezí od 19 do 31 µm. Dosud bylo popsáno 11 druhů, ze kterých 8 druhů parazituje na žábřácích a kůži ryb a 3 druhy parazitují v močovém měchýři. 8 druhů se vyskytuje v Eurasii, 2 ve Spojených státech a 1 v Africe (Woo, 2006; Palíková a kol., 2019). Do toho rodu řadíme například druhy: *Paratrachodina corlissi*, *P. africana* nebo *P. incissa*.

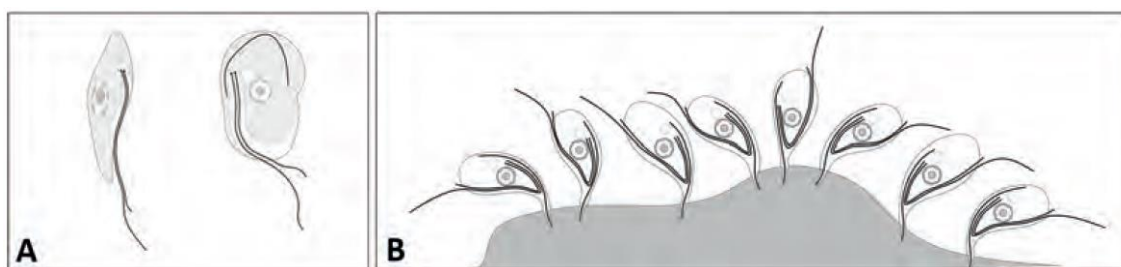
Rod *Tripartiella* – Tento rod zahrnuje malé brousilky, jejichž zoubky mají dlouhé rovné paprsky a jejich střední kónická část tvoří jakýsi kolenovitý výběžek, který zapadá do výkrojku ve vedlejší čepeli. Do tohoto rodu zařazujeme dosud popsáných 26 druhů, parazitujících na žábřácích sladkovodních ryb (Woo, 2006; Palíková a kol., 2019).

Zařazujeme sem například druhy: *Tripartiella copiosa*, *T. cichlidarum*, *T. clavodonta*, *T. orthodens*.

Rod *Trichodinella* – I tento rod zahrnuje menší parazity. Jejich zoubky na přichytném disku mají krátké paprsky, zploštělé či zahnuté. Jsou to parazité především sladkovodních druhů ryb, jejich výskyt je ale možný i na mořských rybách. U těch parazitují výhradně na žábách (Woo, 2006). Zástupci tohoto rodu se vyskytují v Eurasii, Africe, Mexiku, USA (Lom a Dyková, 1992). Rod zahrnuje druhy: *Trichodinella epizootica*, *T. lawleri*.

### 2.2.1.6. Kinetoplastea – Ichtyobodóza

Ichtyobodóza je velmi rozšířené onemocnění ryb, které postihuje především rybí žábry a kůži jak sladkovodních, tak i mořských ryb. Toto onemocnění způsobují bičíkovci rodu *Ichthyobodo* (Obr. 8.). Tito bičíkovci se vyskytují po celém světě (Isaksen a kol., 2011). Nejprve byl do tohoto rodu řazen pouze druh *Ichthyobodo necator*, česky nazývaný bičivka rybí (Navrátil a kol., 2000). Dříve nazývaný *Costia natrix* (Tavolga a Nigrelli, 1947). Díky molekulárním metodám bylo později zjištěno, že tento rod zahrnuje více příbuzných druhů (Todal a kol., 2004).



Obr. 8. – A - *Ichthyobodo* sp., B - *Ichthyobodo* sp. na povrchu hostitele; převzato z Palíková a kol. (2019).

Reprodukce druhů rodu *Ichthyobodo* probíhá podélným dělením. Po rozmnožení dojde k uvolnění parazita, který volně plave. Je vejčitého až fazolovitého tvaru. Parazitické stádium parazita mění tvar a dochází k protáhnutí jeho těla do tvaru hrušky (Woo, 2006; Svobodová a kol., 2007). Velikost těla *Ichthyobodo necator* může být až 20  $\mu\text{m}$  (Svobodová a kol., 2007). Parazit je opatřen dvěma bičíky, které však po přichycení



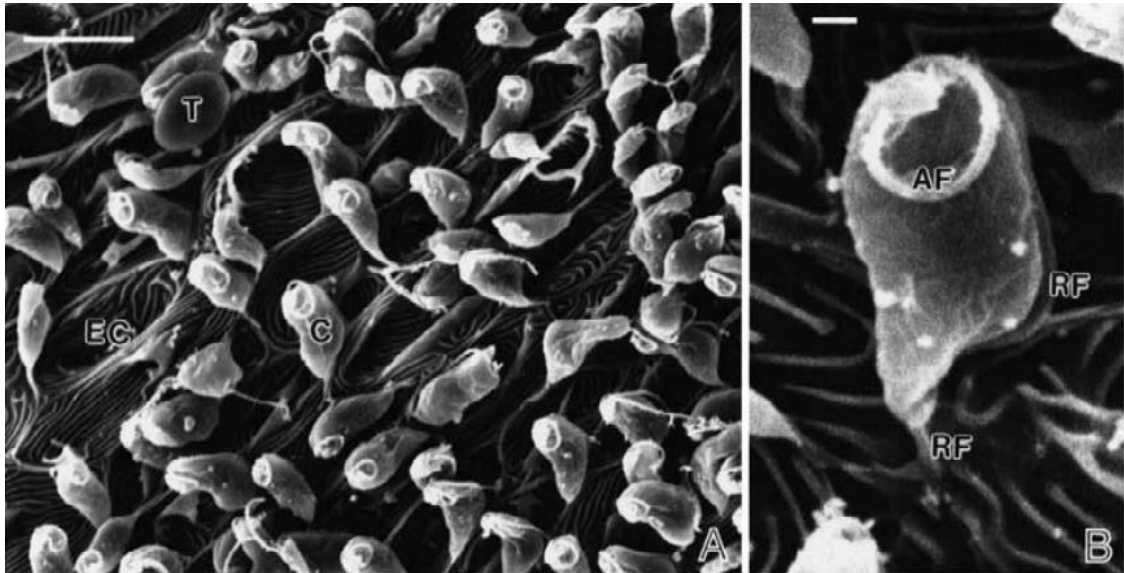
k hostiteli znehybní a přestávají být vidět (Woo, 2006). Někdy bývají pozorováni parazité se čtyřmi bičíky. Tento jev je možné pozorovat u dělicích se jedinců, neboť dělení začíná zdvojením obou bičíků (Tavolga a Nigrelli, 1947). Parazit po opuštění hostitele vytváří cysty zachovávající si životaschopnost po krátkou dobu (Svobodová a kol., 2007). *Ichthyobodo necator* se živí buněčným obsahem hostitelských buněk. Pro tento způsob přijímání živin disponuje parazit cytostomem a cytofaryngeálním kanálem, který proniká do buňky. K povrchu těla se *Ichthyobodo necator* přichycuje díky přichytnému disku tvořeném membránou, obklopující cytostom (Tavolga a Nigrelli, 1947).

Parazit je v současné době jedním z nejčastějších původců chorob v umělých chovech ryb a v chovech ryb s oteplenou vodou. U plůdku ryb způsobuje hromadné infekce, vyskytující se často po zahájení rozkrmování (Todal a kol., 2004). K nejvyšší úmrtnosti dochází mezi čtvrtým a osmým týdnem života (Woo, 2006). V případě, že intenzita napadení není tak vysoká, můžeme u ryb pozorovat otírání o předměty pod hladinou a neklid (Lom a Dyková, 1992). U velkých infekcí můžeme pozorovat nechutenství a apatii, případně dušení (Lom a Dyková, 1992; Chettri a kol., 2014). Na napadené kůži ryb můžeme pozorovat bělavo-šedavé povlaky (Navrátil a kol., 2000; Chettri a kol., 2014). Může také docházet k roztřepení ploutví (Lom a Dyková, 1992). Histopatologický obraz kůže nám ukáže redukovaný počet hlenotvorných buněk, které mohou i úplně chybět. Dále pak hyperplazii Malpighiho buněk, tvořících svrchní vrstvu epidermálních buněk (Tavolga a Nigrelli, 1947). V pokročilejších fázích onemocnění může docházet až k odlupování a degenerativním změnám pokožky (Tavolga a Nigrelli, 1947; Lom a Dyková, 1992). Postižené rybí žábry mají šedavou barvu (Navrátil a kol., 2000). Histopatologie rybích žaber vykazuje hyperplazii případně odlupování žaberního epitelu (Woo, 2006). Mohou vznikat plošné eroze, jejichž rozsah při opravdu velkých infekcích může vést až k úmrtí ryby v důsledku selhání osmoregulace (Svobodová a kol., 2007).

### **2.2.1.7. Kinetoplastea – Kryptobióza**

Toto onemocnění způsobují bičíkovci rodu *Cryptobia* (Obr. 9.). V rámci tohoto rodu bylo doposud popsáno 52 druhů (Lom a Dyková, 1992). Celkem 47 druhů z tohoto rodu jsou endoparazité a pouze 5 druhů jsou ektoparazité, přichycující se na kůži, především ale na žábřácích (Kuperman a kol., 2002). Nejvýznamnějšími zástupci jsou *Cryptobia*

*branchialis*, která žije na kůži a rybích žábřích (Navrátil a kol., 2000). Dalším významným druhem je *Cryptobia iubilans* žijící ve vnitřních orgánech a trávicím traktu některých ryb z čeledi vrubozubcovitých (Tavolga a Nigrelli, 1947).



Obr. 9. – *Cryptobia branchialis* na žábřích tilapie nilské (*Oreochromis niloticus*); A – množství *C. branchialis* na žábřích, B – celkový pohled na *C. branchialis* připojenou k buňce, T – trofont, EC – epitelální buňka žaber, C – *C. branchialis*, AF – přední bičík, RF – recidivující bičík; převzato z Kuperman a kol. (2002) (upraveno).

*Cryptobia branchialis* má dva bičíky (přední-tažný; zadní-tlačný), protáhlý tvar těla, které může dosahovat 12–22(25)  $\mu\text{m}$  (Svobodová a kol., 2007; Palíková a kol., 2019). K rozmnožování dochází podélným dělením (Kuperman a kol., 2002). Parazit nevytváří cysty (Palíková a kol., 2019). K povrchu těla hostitele se přichycuje pomocí zpětného bičíku (Palíková a kol., 2019). Dle Kupermana a kol. (2002) jsou dvě možnosti přichycení parazita k hostiteli. V prvním, nejběžnějším případě, je membrána bičíku rozšířena a přisedá k povrchu buňky hostitele. V druhém případě se pouze špička bičíku dotýká hostitelské buňky. Ani v jednom případě ale bičík neprojde membránou epitelálních buněk hostitele. Výskytem parazitů dochází k pokrytí povrchu žaber a tím ke zmenšení plochy důležité pro výměnu plynů. Tento parazit se vyskytuje především v organicky zatížených vodách, kde se živí různými bakteriemi a drobnými organickými kousky. Řadí se tak mezi ektokomezály (Lom, 1980; Svobodová a kol., 2007). Napadené ryby

mohou vykazovat příznaky dušení, seskupují se v místech s vyšším obsahem kyslíku, také mohou přestat přijímat potravu (Lom a Dyková, 1992; Chettri a kol., 2014). Patologické změny jsou hůře viditelné. V případě velkého napadení jsou rybí žábry překrvené (Navrátil a kol., 2000) a rybí kůže je zahleněná (Lom a Dyková, 1992).

## 2.2.2. Metazoa

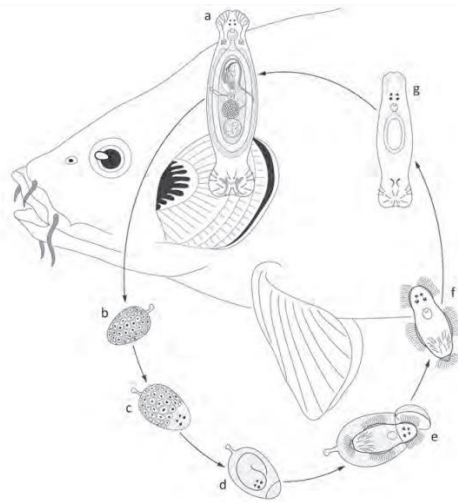
### 2.2.2.1. Žábrohlisti

Žábrohlisti (monogenea, jednorodí) patří do třídy ploštěnců (Platyhelminthes), žijí ve sladkých a brakických vodách a mořích. Naprostá většina druhů je ektoparazitických. Jsou to vícebuněční parazité s bilaterálně symetrickým a dorzoventrálně zploštělým tělem. Dorůstají velikosti 0,03–20 mm v závislosti na druhu. Tím se řadí mezi nejmenší cizopasně červy. Na přední části těla (prohaptor) mají dospělci otvor pro příjem potravy a vyústění žláz pomáhajících přichycení k hostiteli. Druhému konci těla dominuje přichytný orgán (haptor), který se využívá k identifikaci druhů, neboť se jeho stavba liší mezi jednotlivými taxony (Palíková a kol., 2019).

Žábrohlisti se rozdělují do dvou skupin. První skupinou jsou nižší monogenea – Monopisthocotylea (například rody *Dactylogyrus* nebo *Gyrodactylus*). Tito zástupci mají jednoduchý přichytný disk opatřený různým počtem a tvarem středních a okrajových háčků. Zástupci nižších monogeneí se živí epitelem. Přitom procházejí povrchem hostitele a požírají epitelové buňky, hlen a pouze příležitostně omezené množství krve (Woo, 2006). Druhou skupinou jsou vyšší monogenea – Polyopisthocotylea (u nás rody *Diplozoon*, *Eudiplozoon*, *Paradiplozoon*). Ty nacházíme především u mořských ryb a paryb. Jejich haptor je svou stavbou složitější. Je to útvar složený z komplexů přísavek, svorek nebo přichytných disků, často vyztužených sklerotizovanými útvary (Reed a kol., 2009). Zástupci vyšších monogeneí se na rozdíl od předchozí skupiny živí krví (Woo, 2006).

Všichni zástupci jsou hermafrodité, mají tedy obě sady reprodukčních orgánů. Tyto orgány vyúsťují v přední části těla. Někteří zástupci jsou vejcorodí, například rody *Dactylogyrus* (Obr. 10.) nebo *Pseudodactylogyrus*. Mají přímý vývoj, bez mezihostitelů. Po kopulaci se vytváří vajíčka vybavená víčkem a filamenti. Z takových vajíček se ve vodě uvolňují larvy nazývané onkomiracidia aktivně vyhledávající svého hostitele

(Palíková a kol., 2019). K tomu využívají receptory, včetně očních skvrn (Volf a kol., 2007). Životnost onkomiracidíí je 24 hodin v případě, že nenajdou hostitele. Vývojový cyklus trvá 2–20 dní a je ovlivněn teplotou vody a konkrétním druhem žábrolísta (Noga, 2011). Naopak do rodu *Gyrodactylus* jsou ve většině řazení žábrolísta živorodí. Mají vyvinutou dělohu, ve které mají potomky. Je zajímavostí, že je možné pozorovat v dospělci výskyt až třech generací (Cable a Harris, 2002; Cable a kol., 2002).



Obr. 10. – Schéma životního cyklu vejcorodých žábrolístů rodu *Dactylogyrus*: a – dospělý jedinec produkující vajíčka; b–d – vajíčko s vyvíjejícím se onkomiracidielem ve vodním prostředí; e – líhnutí onkomiracidia; f – volně plovoucí onkomiracidium hledající hostitele; g – juvenilní jedinec pohybující se po povrchu těla hostitele na místo konečné lokalizace (žaberní aparát); převzato z Palíková a kol. (2019) (upraveno).

Řada druhů parazituje na hlavonožcích, obojživelnících, plazech a savcích. Většina jsou však rybí parazité (Woo, 2006). U ryb žábrolísta napadají především kůži, ploutve, žábry a žaberní dutinu. Jen malou část těchto parazitů lze označit za endoparazity (přibližně 5 %) (Palíková a kol., 2019). Celkový doposud popsáný počet žábrolístů se odhaduje na 5000 druhů, které můžeme nalézt přibližně u 3000 druhů ryb (Gelnar a kol., 1998). U nás se vyskytuje přibližně 200 druhů žábrolístů řazených do 16 rodů (Moravec, 2001). Běžně můžeme žábrolísta nalézt na sladkovodních i mořských rybách. Problémy však tyto parazité způsobují především v uzavřených chovech ryb (Eiras a kol., 2008). Žábrolísta jsou parazité s poměrně vysokou hostitelskou a orgánovou specifitou

(Palíková a kol., 2019). Níže jsou popsány u nás nejběžněji se vyskytující druhy, rozdělené dle příslušných rodů.

### Rod Dactylogyru

*Dactylogyru extensus* – je druh žábrolísta, dorůstající poměrně velkých rozměrů. Dorůstá až 1,5 mm délky, 0,34 mm šířky a má čtyři oční skvrny (Woo, 2006). Vyskytuje se především na žábřácích kapra obecného a karase zlatého (*Carassius auratus*). Parazit pochází z Asie, odkud byl zavlečen do Evropy a Severní Ameriky. Optimální teplota pro jeho výskyt je 13–15 °C. Z tohoto důvodu je jeho výskyt nejčastěji zaznamenáván na jaře a na podzim, v létě jsou naopak počty *D. extensus* na rybách nízké. Rovněž špatně snáší nízké koncentrace kyslíku ve vodě (Palíková a kol., 2019).

*Dactylogyru vastator* – oproti předchozímu *D. extensus* je tento parazit poměrně malý. Dorůstá velikosti 0,33–0,39 mm. Jeho původní areál výskytu se nachází v Asii, odkud byl převozy ryb rozšířen do Ruska, Evropy a Severní Ameriky. Napadá žaberní lístky kapra obecného, karase zlatého a karase stříbřitého (*Carassius gibelio*) (Woo, 2006; Ling a kol., 2016). Je významným parazitem v chovech především kapřího plůdku. Při teplotách od 24 do 28 °C probíhá vývoj nové generace za 12 až 13 dnů. Za dalších 10 dnů dosáhne parazit pohlavní dospělosti. Naopak v zimním období vývojový cyklus trvá 6–7 měsíců.

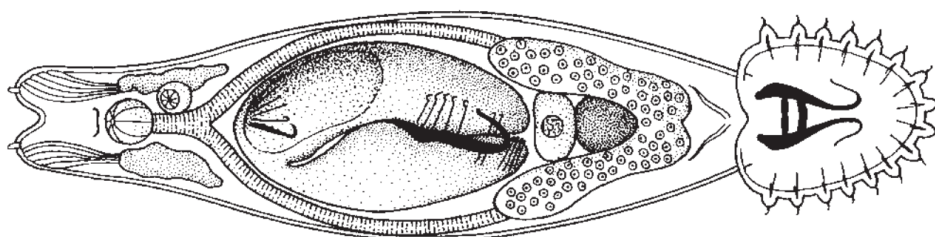
### Rod Pseudodactylogyru

*Pseudodactylogyru bini* – je žábrolíst, napadající úhoře říčního (*Anguilla anguilla*) jak ve volných vodách, tak i v chovech ryb (Hayward a kol., 2001). Pochází z Asie, odkud byl introdukován do Evropy, Severní Ameriky, Austrálie a jižní Afriky (Palíková a kol., 2019). Obvykle dosahuje velikosti 1–1,5 mm a má čtyři oční skvrny. Zástupci rodu *Pseudodactylogyru* napadají žaberní aparát svých hostitelů. Teplotní optimum tohoto druhu je 25–30 °C (Woo, 2006).

### Rod Gyrodactylu

*Gyrodactylu cyprini* – je robustní druh parazita (Obr. 11.), jehož délka je v rozmezí 0,5–0,9 mm. Poprvé byl popsán v Rusku (Rogers, 1968). Vyskytuje se především na ploutvích, kůži a v případě silných infekcí i na žábřácích kapra obecného. Byl zaznamenán i na kůži a ploutvích karasů obecných (Palíková a kol., 2019).

*Gyrodactylus salaris* – je žábrohlist napadající především lososa obecného (*Salmo salar*), ale i pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (Bakke a kol., 2002). Vyskytuje se především v Norsku, ale byl rozšířen i do Evropy. Napadá hlavně ploutve a kůži ryb. Je živorodý (Woo, 2006).



Obr. 11. – *Gyrodactylus* sp.; převzato z Woo (2006) (upraveno).

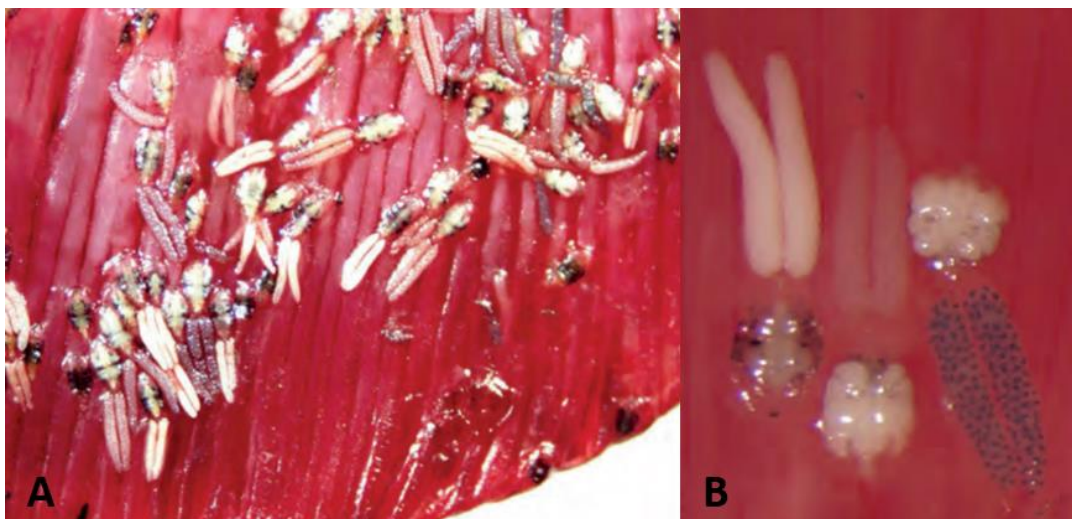
### 2.2.3. Arthropoda

#### 2.2.3.1. Ergasilóza

Ergasilóza je onemocnění způsobené klanonohými korýši řazenými do čeledi Ergasilidae. Český název pro tyto parazity je chlopcei. Jejich článkované tělo je hruškovitého tvaru. Napadají především žábry ryb, kde se přichycují pomocí svých modifikovaných tykadél (antenu) (Navrátil a kol., 2000). Dorůstají délky až kolem 1,5 mm. Na rybách parazitují pouze samice, samci a vývojová stádia žijí ve vodním sloupci (Woo, 2006). Samci po kopulaci hynou. Pohlavně zralé samice mají po stranách těla dva vaječné vaky. Každý vaječný vak může obsahovat až sto vajíček. Níže je popsán u nás nejběžnější druh chlopka.

*Ergasilus sieboldi* (Obr. 12.) je asi nejznámějším původcem ergasilózy. Česky tohoto parazita nazýváme chlopek obecný. Vyskytuje se v Asii a Evropě (Woo, 2006). Dorůstá velikosti až 1,7 mm. Samice se přichycují na žábry hostitelských ryb. Při silných infekcích byl však parazit nalezen také na ploutvích. Embryonální vývoj parazita trvá přibližně 6 dnů a probíhá uvnitř vaječného vaku. Po vylíhnutí přichází vývoj šesti naupliových a poté pěti kopepoditových stádií až do dospělce (Abdelhalim a kol., 1991). Jejich délka života je až 1 rok. *E. sieboldi* se živí krví a žaberním epitelem, tím poškozuje

žábry hostitele, které reagují zvýšenou tvorbou hlenu. Chlopek obecný napadá většinu našich sladkovodních druhů ryb, není druhově specifický. Za nejnámavější druhy ryb jsou považováni: lín obecný (*Tinca tinca*), štika obecná (*Esox lucius*), cejn velký (*Abramis brama*) (Dezfuli a kol., 2003; Palíková a kol., 2019).



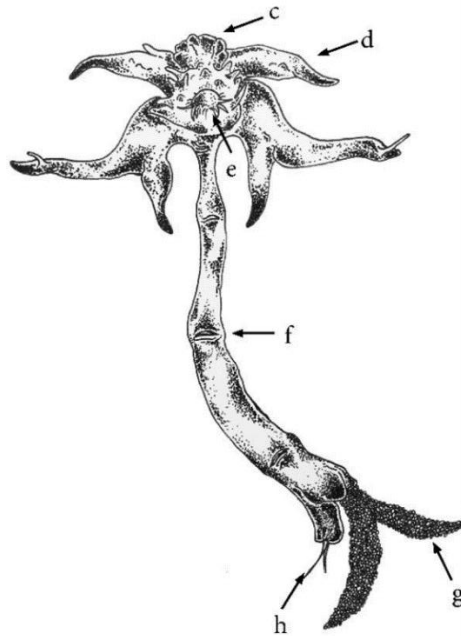
Obr. 12. – A - masivní infekce *E. sieboldi*, B - detail *E. sieboldi*; převzato z Palíková a kol. (2019) (upraveno).

### 2.2.3.2. Lerneóza

Lerneóza je onemocnění způsobené korýši z rodu *Lernaea* (Copepoda: Lernaeidae), se kterými se můžeme setkat po celém světě. S ohledem na jejich velikost jsou nebezpeční především pro malé ryby (Woo, 2006). V našich podmínkách je nejvýznamnějším zástupcem *Lernaea cyprinacea*, česky nazývaný červok kapří. Je to parazit dorůstající 12–16 mm. Samci dorůstají menších rozměrů (Koyuncu a Dönmez, 2006).

Po spáření (Obr. 13.) nosí samice vaječné vaky o velikosti 6 mm. Samci po spáření do 24 hodin hynou (Hossain, 2018). Oplozené samice po přichycení na kůži prodělávají metamorfózu. Mění se jejich tělo, především se jim tvoří hlavové výrůstky. Těmi se samice červoků fixují rybám do podkoží (Grabda, 1963). Vývoj červoků je přímý, zahrnující tři volně žijící naupliová stádia, pět kopepoditových stádií a adultní stadium. Celkové trvání vývoje je 8–9 dní při teplotě 27 °C. *L. cyprinacea* není druhově specifický

parazit. Napadá širokou škálu hostitelů. Při napadení kapřího plůdku může způsobit úhyn už jen v počtu 2–3 kusů (Palíková a kol., 2019).



Obr. 13. – Samice *Lernaea cyprinacea*; c – anténa, d – přísavná destička, e – zadní přísavná destička, f – kusadla, g – vaječný vak, h – uropod; převzato z Nur a kol. (2022) (upraveno).

### 2.2.3.3. Argulóza

Kapřivcovitost je český název pro onemocnění nazývané argulóza. Původci jsou klanonozí korýši pocházející z rodu *Argulus* (Crustacea: Branchiura). V našich podmínkách se s nimi můžeme setkat často jak ve volných vodách nebo rybnících, tak i v intenzivních akvakulturách. Tito parazité napadají převážně sladkovodní druhy ryb, výjimečně však i ryby mořské. Nejznámějším původcem je u nás *Argulus foliaceus*. Dále pak *Argulus coregoni* a k nám introdukovaný *Argulus japonicus* (Rusthon-Mellor, 1992). Kapřivci mají dorzoventrálně zploštělé tělo s párem očí vepředu a čtyřmi páry plovacích nohou. Dále jsou vybaveni jedním párem přeměněných maxil, které tvoří „přísavky“. Díky těmto „přísavkám“ se mohou parazité fixovat na svého hostitele, kde stiletlem probodávají jeho kůži. Živí se rybí krví. Rozmnožování kapřivců probíhá na hostiteli, tedy na rybě. Poté samice rybu opouští, aby nakladla vajíčka, která lepí na předměty pod vodní hladinou, jako jsou kameny, makrofyta atd. (Poly, 2008). Vývoj těchto parazitů je



přímý, bez naupliových stádií. Na podzim při poklesu teploty vody pod 8 °C se vývoj kapřivců zastavuje a pokračuje až na jaře s oteplením vody. Zimu kapřivci přečkávají na rybách, kde se pokrývají ochrannou vrstvou slizu (Palíková a kol., 2019).

*Argulus foliaceus* (kapřivec plochý) (Obr. 14.) je parazit, jehož tělo je oválné, 6–7 mm velké. Je kryté plochým dorsálním štítem a jeho ocasní ploutvička je na konci zaoblená. Dorsální štít však nezasahuje přes základní část ocasní ploutvičky. *A. foliaceus* se nepřichycuje pouze na jedno místo. Může migrovat po celém rybím těle. Jedná se o dočasnýho parazita, který se po uvolnění z hostitele může nějakou dobu pohybovat samostatně ve vodě. Preferuje eutrofní vody před oligotrofními vodami (Valtonen a kol., 1987). Po naklazení vajíček se při teplotě 20 °C larvy líhnou přibližně za 20 dnů. Teplejší voda celý vývoj parazita trvající přibližně 55 dní urychluje (Rahman, 1995). Walker a kol. (2008) pozorovali nejvyšší výskyt tohoto parazita na kaprech a potvrdili, že distribuce *A. foliaceus* se liší mezi hostitelskými druhy a také životními fázemi parazita.



Obr. 14. – *Argulus foliaceus*; převzato z Palíková a kol. (2019) (upraveno).

*Argulus coregoni* (kapřivec velký). Jeho velikost je 12–14 mm. Jeho dorsální štít nepřesahuje základ ocasní ploutvičky, která je na koncích zašpičatělá (Palíková a kol., 2019). Preferuje chladnější vody než *A. foliaceus*. Napadá především lososovité ryby, jen velmi zřídka jiné druhy ryb (Pasternak a kol., 2004).

*Argulus japonicus* (kapřivec rybníční). Tento druh byl poprvé popsán v Japonsku a byl rozšířen do celého světa vyjma Antarktidy (Poly, 2008). Stejně jako *A. foliaceus* vyhledává teplejší vody (Stammer, 1959). Jeho tělo dosahuje velikosti až 8 mm. Dorsální štít překrývá kořen ocasní ploutvičky (Palíková a kol., 2019).

## **2.3. Léčba parazitárních onemocnění**

### **2.3.1. Základy léčby parazitárních onemocnění**

Chované ryby určené k lidské spotřebě (potravinové ryby) v celé Evropské unii je možné léčit pouze přípravky, jejichž farmakologicky účinné látky jsou zařazeny z pohledu maximálních reziduálních limitů – MRL (maximální množství účinné látky, které je možné v tkáni akceptovat) dle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 470/2009. Tyto látky jsou zařazeny do Tabulky 1 Přílohy nařízení Komise EU č. 37/2010. Na podkladě MRL se stanovuje ochranná lhůta. To je doba, po kterou nelze ošetřená zvířata, v tomto případě ryby, dodávat pro lidskou spotřebu. U ryb se ochranná lhůta vyjadřuje v denních stupních tzv. stupňodnech (1denní stupeň odpovídá 1 °C po dobu jednoho dne, tedy 24 hodin). U léčivých prostředků, které nemají stanovenou ochrannou lhůtu výrobcem je nutné dodržet minimální ochrannou lhůtu 500 denních stupňů - zákon č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon) ve znění pozdějších předpisů. Jednorázově je možné dovést a využít v množství nutném k léčbě konkrétního případu u nás neregistrovaná léčiva, která jsou zaregistrovaná pro ryby či jiné druhy potravinových zvířat v jiných státech Evropské unie nebo i jiných zemích. Je nutné však zažádat o výjimku na dovoz léčivých látek ze třetích zemí jako je např. Kanada nebo USA. Výjimku pro dovoz ze třetích zemí vydává Státní veterinární správa ČR. Pro dovoz léčivých přípravků ze zemí Evropské unie stačí požádat o výjimku Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv. V některých odůvodněných případech mohou veterinární lékaři dle pravidel § 3 a § 4 vyhlášky č. 344/2008 Sb. o používání, předepisování a výdeji veterinárních léčivých přípravků při poskytování veterinární péče a na vlastní zodpovědnost aplikovat látku „*off label*“. Pro takové přípravky je nutné dodržet minimální ochrannou lhůtu 500 denních stupňů.

Jednodušší situace je v chovech akvarijních a okrasných ryb, kde je možné pro léčbu využít přípravky, které nemají stanoveny maximální reziduální limity a tím pádem ani ochrannou lhůtu.

### **2.3.2. Základní léčebné metody**

Před zahájením léčby je vhodné provést test snášenlivosti. Provedeme jej pouze na několika jedincích. Až po jeho provedení je vhodné léčivou látku aplikovat na ostatní jedince. Ideální léčivá látka by měla být účinná proti parazitům v koncentracích, které nejsou toxické pro ryby. Dále by použitá látka měla být co nejlevnější a rozpustná ve vodě (Laniková a kol., 2021). Navíc by u ryb určených k lidské spotřebě neměla v rybím mase zůstat dlouhodobě zadržována žádná rezidua těchto látek (Lieke a kol., 2020).

Konkrétní léčivo můžeme rybě aplikovat 3 způsoby:

- léčebné koupele,
- perorální aplikace,
- injekční aplikace.

#### **2.3.2.1. Léčebné koupele**

Způsob této léčby spočívá v aplikaci léčiv do vodního prostředí. Léčivo působí přímo na parazity na povrchu jejich těla (kůže, žábry), ale může se vstřebávat i do krve (léčba vnitřních parazitů) (Palíková a kol., 2019). Výhodou této formy aplikace je dávkování léčiva, které se tímto způsobem dostane ke všem jedincům ve stejné dávce. Nevýhodou a problémem je likvidace léčebných koupelí, která by měla probíhat dle platných nařízení a zákonů. Koupele dělíme dle délky trvání na:

- ponořovací – doba trvání maximálně 5 minut,
- krátkodobé – doba trvání koupele je 5 minut až 2 hodiny,
- dlouhodobé – doba trvání je 2 hodiny a více, i několik dní.

Obecně se pro přípravu koupelí i pro ponořovací koupele využívají vyšší koncentrace, zatímco u dlouhodobých koupelí bývají aplikované koncentrace řádově nižší. Ponořovací koupele je možné zahrnout do technologických postupů například při manipulaci s obsádkou, jsou však organizačně náročné. Pro krátkodobé koupele se

používají nižší dávky léčiv než pro ponořovací koupele, ale doba působení se prodlužuje. Krátkodobých koupelí můžeme využít například při transportu ryb. Posledním typem jsou dlouhodobé koupele, u kterých se využívá velmi nízkých dávek po dlouhou dobu. Dlouhodobými koupeli můžeme ošetřovat celé nádrže i celé chovné systémy (Svobodová a kol., 2007).

### **2.3.2.2. Perorální aplikace léčiv**

Perorálně se léčivé látky rybám podávají dvěma způsoby, pomocí sondy, kterou zavádíme rybě do jícnu nebo přidáním účinné látky do krmiva formou tzv. medikovaného krmiva. Tento způsob podávání léčiv je zaměřený především na léčbu vnitřních parazitů (Kolářová a kol., 2017). Z tohoto důvodu mu nebude v této práci věnována dále pozornost.

### **2.3.2.3. Injekční aplikace**

Tato forma podávání léčivých přípravků patří mezi nejpřesnější, ale i nejnáročnější. Často může dojít k mechanickému poškození ryby a ke stresu. Injekčně se aplikuje látka spíše malým skupinám ryb (generační ryby, akvarijní ryby atd.). Aplikace může probíhat buď intraperitoneálně nebo intramuskulárně. Pro léčbu parazitóz se však využívá pouze minimálně nebo experimentálně (Kolářová a kol., 2017).

## **2.3.3. Nejběžněji používaná léčiva na ektoparazitární onemocnění ryb**

### **2.3.3.1. Formaldehyd**

Formaldehyd ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) byl objeven v roce 1859 a byl nejjednodušším aldehydem z hlediska chemické struktury (Abdollahi a Hosseini, 2014). Je klasifikován jako karcinogen a při manipulaci s ním je potřeba dbát bezpečnostních opatření (Kolářová a kol., 2017; Jinadasa a kol., 2022). Při pokojové teplotě je formaldehyd bezbarvý, štiplavě páchnoucí plyn. V chovech ryb se využívá 36 až 38% vodný roztok formaldehydu, který nazýváme formalín (Palíková a kol., 2019). Využívá se k léčbě plísňových a ektoparazitárních onemocnění ryb, desinfekci nástrojů nebo koupelím jiker.

Účinně zabíjí parazity na žábrách a ploutvích ryb (Noga, 2000). Při léčbě ryb formaldehydem mohou ryby následně reagovat hyperplazií žaberního epitelu nebo nekrózou ledvin (Santos a kol., 2012). Bylo prokázáno, že formaldehyd způsobuje narušení normální funkce žaber (Abdollahi a Hosseini, 2014). Pro přípravu koupele ve formalínu se používá pouze čirý roztok bez usazenin paraformaldehydu (bílá usazenina na dně láhve), který je pro ryby toxický. V praxi se obvykle využívá formaldehydu pro krátkodobé nebo dlouhodobé koupele. Obvyklé léčebné dávky formaldehydu jsou uvedeny v Tab. 1. (Kolářová a kol., 2017).

Tab. 1. - Léčebné dávky formaldehydu; převzato z Kolářová a kol. (2017) (upraveno).

| Dávka formalínu na 1 l         | Dávka na 1000 l | Délka koupele | Teplota vody |
|--------------------------------|-----------------|---------------|--------------|
| 0,25 ml·l <sup>-1</sup>        | 250 ml          | 30–60 min     | do 10 °C     |
| 0,20 ml·l <sup>-1</sup>        | 250 ml          | 30–60 min     | 10–15 °C     |
| 0,17 ml·l <sup>-1</sup>        | 170 ml          | 30–60 min     | nad 15 °C    |
| 0,025–0,030 ml·l <sup>-1</sup> | 25–30 ml        | neomezeně     |              |

### 2.3.3.2. Kyselina peroctová

Kyselina peroctová (CH<sub>3</sub>CO<sub>3</sub>H, peracetic acid, KPO) je silné oxidační činidlo široce využívané v potravinářství, laboratořích, zdravotnictví, průmyslu, ale také pro ošetření odpadních vod (Kitis, 2004). Je to čirá bezbarvá kapalina, která je typická svým ostrým štiplavým octovým zápachem (Kolářová a kol., 2017). Teprve nedávno se začala využívat v akvakultuře pro léčbu ryb (Elia a kol., 2006). Není zařazena do kategorie léčivých přípravků. V rybářství se látka používá pro eliminaci povrchových mykotických infekcí, bakteriálních infekcí a různých ektoparazitárních onemocnění ryb (Palíková a kol., 2019). Kyselina peroctová je primárně degradována chemickou oxidací na rozdíl od mikrobiálního rozkladu peroxidu vodíku katalázovou aktivitou (Block, 2001). Již nízké koncentrace působí proti širokému spektru mikroorganismů. Hlavním mechanismem účinku je oxidativní narušení buněčných membrán prostřednictvím hydroxylových radikálů (Kitis, 2004). Kyselina peroctová neprodukuje žádné nebo jen málo mutagenní či toxické vedlejší produkty po reakci s organickými látkami. Má tak velmi malý dopad na životní prostředí (Payne, 1988; Monarca a kol., 2002). Akutní toxicitu ovlivňuje

chemismus vody, zejména ve vodě s nižší alkalitou se mortalita ryb může vyskytnout již v nižších koncentracích (Straus a kol., 2018). Letální koncentrace pro ryby se nachází blízko účinné léčebné koncentrace. Léčebné dávky kyseliny peroctové jsou uvedeny v Tab. 2. (Kolářová a kol., 2017). V České republice je na trhu dostupný přípravek s názvem Persteril. Ten kromě kyseliny peroctové obsahuje i peroxid vodíku.

Tab. 2. - Léčebné dávky kyseliny peroctové; převzato z Kolářová a kol. (2017) (upraveno).

| Dávka KPO na 1 l       | Dávka na 1000 l | Délka koupele | Účinnost                       | Opakování                  |
|------------------------|-----------------|---------------|--------------------------------|----------------------------|
| 0,5 ml·l <sup>-1</sup> | 500 ml          | 30 s          | ektoprotozoa                   | každý druhý den, celkem 4× |
| 2 ml·l <sup>-1</sup>   | 2000 ml         | 30 s          | monogenea, artropoda, nematoda | každý druhý den, celkem 4× |

### 2.3.3.3. Peroxid vodíku

Peroxid vodíku (hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) je využíván v mnoha odvětvích průmyslu, například i v potravinářství (Schreier a kol., 1996; Yanong, 2008). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je reaktivní silné oxidační činidlo, které je klasifikováno jako žíravé při koncentracích vyšších než 20 %. Volně prodejné přípravky, používané pro lidi, mají obsah peroxidu vodíku pouze 3 % (Yanong, 2008). V rybářství je využíván pro krátkodobé léčebné koupele povrchových bakteriálních, mykotických a parazitárních onemocnění a taktéž je využíván pro desinfekci předmětů (Palíková a kol., 2019). Velkou výhodou peroxidu vodíku je, že není stálý a jeho koncentrace se rychle snižuje (Kolářová a kol., 2017) a rozkládá se na vodu a kyslík (Block, 2001). Rychlost rozkladu je ovlivněna především teplotou vody. Ve vodě po aplikaci nevznikají žádné škodlivé vedlejší produkty rozkladu (Arvin a Pedersen, 2015). Některé druhy ryb jsou na léčbu peroxidem citlivé, a tak je vhodné vždy provést před vlastní léčbou zkoušku citlivosti. U ryb léčených vysokými dávkami byla prokázána nižší rychlost růstu (Speare a kol., 1999). Mladší vývojová stádia, váčkový a rozplavaný plůdek pstruha duhového, jsou vůči peroxidu vodíku odolnější a zvládají lépe jeho vyšší koncentrace ve vodě než starší ryby (Rach a kol., 1997). Experimentálně bylo testováno využití peroxidu vodíku jako zdroje kyslíku při přepravě mladých stádií ryb (Innes Taylor a Ross, 1988). Doporučené léčebné dávky peroxidu vodíku jsou uvedeny v Tab. 3.

Tab. 3. – Léčebné dávky H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; převzato z Kolářová a kol. (2017) (upraveno).

| Dávka 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na 1 l | Dávka 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na 1000 l | Délka koupele |
|---|--|---------------|
| 17,5 ml·l <sup>-1</sup>                       | 17,5 l   | 10 min        |
| 10 ml·l <sup>-1</sup>                         | 10 l   | 10–15 min     |
| 19 ml·l <sup>-1</sup>                         | 19 l   | 4 min         |

#### 2.3.3.4. Chlorid sodný

Chlorid sodný (NaCl, kuchyňská sůl) je běžně dostupná chemická sloučenina využívaná často v praxi. Kuchyňská sůl se pro ošetřování ryb využívá již od 50. let 20. století (Sellose a Rowland, 1990). Kromě antiparazitárních účinků se chlorid sodný využívá také pro snížení účinků dusitanů, ke zvýšení tvorby hlenu a ke zmírnění stresu po manipulaci či přepravě (Maciel a kol., 2018). Sladkovodní ryby by měly být především u vyšších dávek sledovány, zda se u nich neprojeví klinické příznaky naznačující otravu (Tavares-Dias, 2022). Letální koncentrace pro ryby a pro parazity od sebe nejsou příliš vzdálené, a tak je potřeba dodržovat obecné zásady (provedení testu snášenlivosti) (Kolářová a kol., 2017). Doporučené koncentrace chloridu sodného pro léčebné koupele jsou uvedeny v Tab. 4. Zajímavostí je, že žábrolísti infikující žábry jsou vůči NaCl odolnější než žábrolísti parazitující na kůži ryb (Thoney a Hargis, 1991).

Tab. 4. - Dávkování NaCl; převzato z Kolářová a kol. (2017) (upraveno).

| Dávka na 1 l          | Dávka na 1000 l | Délka koupele | Druh/kategorie ryb                    |
|-----------------------|-----------------|---------------|---------------------------------------|
| 10 g·l <sup>-1</sup>  | 10 kg           | 30 min        | raná stadia plůdku                    |
| 20 g·l <sup>-1</sup>  | 20 kg           | 15 min        | kapr - slabší plůdek, lososovité ryby |
| 30 g·l <sup>-1</sup>  | 30 kg           | 25–30 min     | kapr - silnější plůdek                |
| 1–2 g·l <sup>-1</sup> | 1–2 kg          | 1–2 dny       | ryby v sádkách/manipulačních nádržích |

#### 2.3.3.5. Manganistan draselný

Manganistan draselný (KMnO<sub>4</sub>, hypermangan, potassium permanganate) je rovněž využíván v chovech ryb (Griffin a kol., 2002), avšak není zhodnocena jeho bezpečnost pro potravinové ryby (Palíková a kol., 2019). Využívá se hlavně jako prostředek pro

dezinfekci nádrží, odstraňování ektoparazitů, plísnových onemocnění či bakterióz. Na druhou stranu je to látka s vysokým stupněm toxicity pro ryby, neboť je to silný oxidant poškozující tkáň, jako jsou žábry nebo kůže (Darwish a kol., 2002). Léčebné koncentrace manganistanu jsou blízké jeho letální koncentracím. Z toho důvodu je třeba jeho aplikaci provádět uváženě, hlavně u akvariálních ryb (Palíková a kol., 2019). V létě, při zvýšené teplotě, jsou koupele pro ryby nebezpečné (Kolářová a kol., 2017). Franča a kol. (2011) prokázali, že koncentrace obvykle využívaná pro léčbu ( $1\text{--}4\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) může být pro *Oreochromis niloticus*, ale i další vodní organismy, letální. Doporučené koncentrace pro manganistanové koupele jsou uvedeny v Tab. 5. Při likvidaci koupele je třeba dbát obezřetnosti, jelikož manganistan draselný je toxický pro další vodní organismy (Kolářová a kol., 2017).

Tab. 5. - Dávkování manganistanu; převzato z Kolářová a kol. (2017) (upraveno).

| Dávka $\text{KMnO}_4$ na 1 l                  | Dávka $\text{KMnO}_4$ na 1000 l | Délka koupele |
|---|---------------------------------|---------------|
| $1\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$                | 1 kg                            | 30–45 s       |
| $0,1\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$              | 100 g                           | 5–10 min      |
| $0,01\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$             | 10 g                            | 60–90 min     |
| $0,3\text{--}0,6\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ | 300–600 mg                      | 12 h          |

### 2.3.3.6. Malachitová zeleň

Malachitová zeleň (malachite green,  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{Cl}_1\text{N}_2$ ) je zásadité barvivo, dříve hojně využívané v akvakultuře. V 50. letech 20. století se malachitová zeleň používala pro léčbu vnitřních i vnějších parazitů. Později se ukázalo, že je nejefektivnější pro léčbu protozoálních onemocnění ryb, zejména proti kožovci (*Ichthyophthirius multifiliis*). Využívala se také pro léčbu plísní (*Saprolegnia sp.*) (Oláh a Farkas, 1978), a to samostatně nebo v kombinaci s dalšími látkami (formaldehyd, methylenová modř atd.) (Sudová a kol., 2007). Od roku 2000 je malachitová zeleň zakázaná látka, proto ji nelze použít při aplikaci na potravinové ryby (Sudová a kol., 2007; Kolářová a kol., 2017). Její použití je tedy v dnešní době možné pouze v zájmových chovech ryb (akvaristika, chov barevných ryb). Z důvodů rozdílů mezi jednotlivými šaržemi je nutné vždy provést



zkoušku snášenlivosti (Kolářová a kol., 2017). Doporučené dávkování malachitové zeleně je uvedeno v Tab. 6.

Tab. 6. - Dávkování malachitové zeleně; převzato z Palíková a kol. (2019) (upraveno).

| Dávka malachitové zeleně | Délka aplikace | Poznámka  |
|--------------------------|----------------|---|
| 50–60 mg·l <sup>-1</sup> | 10–30 s        | akvarijní/okrasné ryby  |
| 1 mg·l <sup>-1</sup>     | 30–60 min      | akvarijní/okrasné ryby  |
| 0,1 mg·l <sup>-1</sup>   | 24 h           | na 24 hod přerušit průtok vody → po 24 hod výměna lázně, nechat průtok vody 1 h → zopakovat celý postup celkem 3–6× |
| 5–10 mg·l <sup>-1</sup>  | 5–30 min       | 1–2× denně; koupel jiker okrasných druhů ryb s krátkou inkubační dobou  |
| 5–10 mg·l <sup>-1</sup>  | 5–30 min       | 1× za 1–2 dny; koupel jiker okrasných druhů ryb s dlouhou inkubační dobou   |

### 2.3.3.7. Modrá skalice

Modrá skalice ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , copper sulfate) je látka oblíbená pro využití v akvakultuře díky své dobré dostupnosti a ceně. Nelze ji použít u potravinových ryb (Palíková a kol., 2019) a tak se využívá především v akvaristice (Kolářová a kol., 2017). Toxicitu a účinnost koupele ovlivňují fyzikálně chemické parametry vody (Palíková a kol., 2019). Akutní toxicita modré skalice (96hLC50) je rozdílná dle druhů ryb a pohybuje se v rozmezí 0,001–730 mg·l<sup>-1</sup>, navíc je u mnoha druhů efektivní koncentrace blízká letální koncentraci (Tavares-Dias, 2021). Při použití vody s nižší koncentrací  $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$  (tvrdost vody) a nižší CHSK<sub>Mn</sub> je toxicita modré skalice pro ryby vyšší (Kolářová a kol., 2017). Koupele v modré skalici jsou účinné proti bakteriálním infekcím, piscinoodinóze, ichthyobodóze, trichodinóze a žábrolístům (Palíková a kol., 2019; Tavares-Dias, 2021). Zároveň je potřeba před aplikací modré skalice na ryby provést zkoušku snášenlivosti, a to především u akvarijních ryb (Kolářová a kol., 2017; Palíková a kol., 2019). Doporučené dávkování modré skalice při léčebných koupelích je uvedeno v Tab. 7.

Tab. 7. - Dávkování modré skalice; převzato z Kolářová a kol. (2017) (upraveno).

| Dávka modré skalice na 1 l | Dávka modré skalice na 1000 l | Délka koupele         | Poznámka        |
|----------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------|
| 1,5 mg·l <sup>-1</sup>     | 1,5 g                         | 12 h                  | piscinoodinióza |
| 2 mg·l <sup>-1</sup>       | 2,5 g                         | 2 h opakovat za 2 dny | ichthyobodóza   |
| 0,1 µg·l <sup>-1</sup>     | 0,1 g                         | neomezeně             | protozoózy      |
| 500 mg·l <sup>-1</sup>     | 50 g                          | 1 min                 | protozoózy      |

## 2.4. Hematologie

### 2.4.1. Rybí krev

Rybí krev je červená, neprůhledná tekutina, která se skládá z krevních elementů (krevní destičky, červené a bílé krvinky) a plazmy. Její množství je v těle ryb menší než u savců. Krev u ryb tvoří pouze 1-2 % hmotnosti těla (Dubský a kol., 2003; Dvořák a kol., 2020). Krev se podílí na přenosu plynů a metabolitů, a je tak velmi významnou tekutinou. Krev se skládá z anorganických a organických součástí. Mezi anorganické součásti řadíme ionty Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, fosfáty a sírany, které hrají významnou roli při udržování rovnováhy tělesných tekutin (Liu a kol., 2020). Mezi organické složky krve řadíme sacharidy, bílkoviny, lipidy, močovinu a enzymy (Chatterjee a kol., 2021).

#### Plazma

Je tekutou součástí krve, její barva je nažloutlá. Je průhledná, má slabě alkalickou reakci. Skládá se z vody (92 %), proteinů, lipidů, sacharidů, anorganických látek a plynů (Mahoney a McNulty, 1992).

#### Červené krvinky (erytrocyty)

Na rozdíl od savců jsou rybí erytrocyty plnohodnotné buňky obsahující jádro (Svobodová a kol., 2012). Obvykle tvoří 98–99 % všech krevních buněk v organismu (Witeska a kol., 2022). Jejich hlavní funkcí je především přenos kyslíku a oxidu uhličitého (Chen a Luo, 2023). Mají tvar eliptického disku. Jejich velikost je ovlivněna druhem, pohlavím, ale také podmínkami prostředí. Rybí erytrocyty jsou velmi citlivé na znečištění vodního prostředí, vykazují totiž patologické změny dříve, než se projeví vnější příznaky. Erytrocyty mohou být tedy považovány za bioindikátory toxicity (Sula

a kol., 2020). Yakhnenko a kol. (2016) zjistili, že erytrocyty síhů odchycených z volné přírody mají o 20–30 % více mitochondrií než erytrocyty síhů z akvakultury. Erytrocyty, jakožto nejpočetnější buňky krve, do jisté míry odrážejí fyziologický stav organismu (Chen a Luo, 2023). V průběhu embryonálního a larválního vývoje je vývoj erytrocytů omezený, v průběhu dospívání se však jejich počet zvyšuje. Naopak, nízký počet bývá zaznamenáván v období tření. Po výtěru se ale jejich počet zpátky navrátí do fyziologických hodnot (Lusková, 1996). Zvýšení počtu erytrocytů může být způsobeno delší hypoxií (Dvořák a kol., 2020).

### Bílé krvinky (leukocyty)

Jsou to také buňky obsahující jádro. Jejich počet je u pstruha duhového 10–60  $G \cdot l^{-1}$ , u kapra obecného je počet 10–80  $G \cdot l^{-1}$  (Svobodová a kol., 1986). Jejich množství je závislé na druhu, věku a zdravotním stavu (Dvořák a kol., 2020). Při výskytu onemocnění se počet leukocytů v cirkulující krvi zvyšuje (Modrá a kol., 1998). Nejdůležitější funkcí bílých krvinek je ochrana organismu před patologickými agens, které likvidují například fagocytózou (Dvořák a kol., 2020). Leukocyty rozdělujeme dle přítomnosti specifických granulí na agranulocyty a granulocyty. Agranulocyty neobsahují barvitelná granula a řadíme mezi ně lymfocyty a monocyty. Naopak granulocyty obsahují barvitelná granula a dle způsobu barvení je rozdělujeme na neutrofilní, eosinofilní a basofilní granulocyty. Každý typ má v organismu svou specifickou funkci.

### Trombocyty

U ryb jsou trombocyty plnohodnotnými buňkami, které jsou tvarově variabilní. Hlavní funkcí trombocytů je účast na srážení krve při krvácení. Jejich vzhled se mění v závislosti na aktivaci vápníkem (Dvořák a kol., 2020). Jejich počet je proměnlivý a pohybuje se v rozmezí 10–40  $G \cdot l^{-1}$  (Svobodová a kol., 1986).

## **2.4.2. Odběr krve**

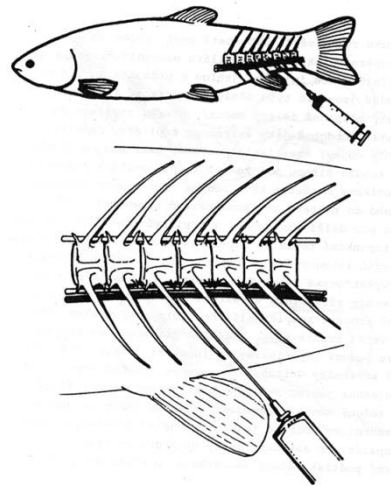
Proto, abychom mohli vyšetřovat rybí krev ji musíme nejprve odebrat. Krev rybě odebíráme po vylovení z vody., kdy je vhodné rybu zabalit do vlhkého hadru, abychom minimalizovali stres a co nejméně poškodili povrchovou hlenovou vrstvu. Odběry krve u ryb je vhodné provádět v anestezii, to proto abychom minimalizovali pohyb ryb, jenž by mohl způsobit poranění (Barton a Iwama, 1991). Pro sedaci můžeme použít běžně

užívaná anestetika pro ryby, jako je MS-222 nebo hřebíčkový olej (Lawrence a kol., 2020). Nejprve rybě musíme místo odběru krve osušit, protože voda urychluje srážení krve (Li a kol., 2006). Odběr můžeme provádět několika metodami. Pro to, jakou metodu zvolíme je zásadní velikost ryb a množství krve, které potřebujeme odebrat. Vlastní odběr krve musí provádět proškolený pracovník, aby byl co nejvíce eliminován stres a zachován welfare ryb. Po odběru krve je vhodné menší ryby usmrtit.

Pro odběr krve u plůdku ryb musíme metodu přizpůsobit velikosti. I tak krve dostaneme velice málo (1–2% hmotnosti jedince). Pro odběr krve je vyvinuto mnoho metod. Například odříznutí ocasu či žaberních oblouků a odebírání krve přímo z cévy nebo punkce srdce či punkce ocasních cév (Allen, 1994). Odběru krve odříznutím ocasu nebo žaberních oblouků se využívá jen zřídka, neboť vždy dojde k usmrcení ryby, ale může také dojít ke kontaminaci krve tělními tekutinami (Witeska a kol., 2022). Dále bude popsána pouze metoda odběru krve srdeční punkcí, kterou dobře popsal Lawrence a kol. (2020). Pro samotný odběr používáme přibližně 200 mm dlouhou skleněnou kapiláru, jejíž vnitřek musíme před vlastním použitím vypláchnout heparinem (proti srážení krve) a tím vytvořit pouze tenký heparinový film uvnitř. Samotný odběr se provádí po vylovení a fixování ryby, kdy její ventrální část musíme mít volně přístupnou. Poté rybě otřeme krajinu srdeční a přiložíme odběrovou kapiláru. U kapřího plůdku je v místě, kam je vhodné kapiláru přiložit, patrné stigma. To vypadá jako malá pigmentovaná prohlubeň (pozůstatek po otvoru, kterým byly v období endogenní výživy přiváděny do těla živiny. Do toho místa provedeme vpich kapiláry do srdce. V případě správného napíchnutí uvidíme v odběrové kapiláře krev. Ta postupně do kapiláry nateče. Po skončení odběru je nutné rybu, které jsme odebírali krev, usmrtit. U větších ryb (nad 20 g) je možné provádět odběr injekční stříkačkou (Svobodová a kol., 2012).

Odběr krve u větších ryb provádíme punkcí ocasních cév (Obr. 15.). Tato metoda je jednou z nejrozšířenějších metod odběru krve u ryb. Postup odběru je takový, že nejdříve osušíme ventrální stranu ocasního násadce, poté asi 1 cm za řitní ploutví pomocí jehly nadzvedneme šupinu a pod úhlem přibližně 45° od osy páteře opatrně zavedeme jehlu do ryby (Lawrence a kol., 2020). Po dosažení ocasní žíly dojde k zčervenání kónu injekční jehly, což je dobře viditelné. Při úplném propíchnutí ocasní žíly dojde k napíchnutí tepny a může dojít až k zastavení jehly o obratle. V tu chvíli musíme jehlu opatrně o malý kousek povytáhnout, případně pootočit. Po ukončení odběru je potřeba místo vpichu vydezinfikovat. Odběr 2 ml krve od kaprovitých ryb s hmotností nad 1000 g nemá na

ryby a jejich následný život významný vliv (Svobodová a kol., 2012). Ve většině případů odběr krve u malých ryb znamená smrt (Witeska a kol., 2022). Bezprostředně po odběru se ryby usmrtí přestřihnutím míchy za hlavou. Při odběru krve u jeseterovitých ryb musíme tuto metodu upravit, neboť chrupavčitá chorda nedokáže zastavit jehlu. Proto se musíme orientovat pomocí vnějších znaků.



Obr. 15. – Odběr krve u ryb s hmotností větší než 200 g metodou punkce ocasních cév; převzato ze Svobodová a kol. (1986) (upraveno).

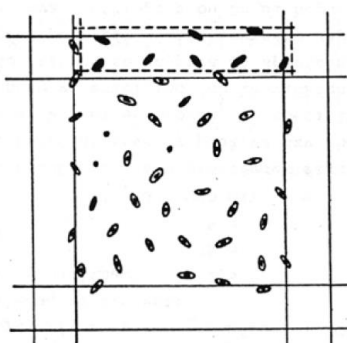
### 2.4.3. Stabilizace krve

Pro stabilizaci krve se většinou používá vodný roztok sodné soli heparinu v koncentraci  $5000 \text{ m.j.} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Pro odběr krve se využívá jehly, kterou před odběrem propláchneme heparinem (Witeska a kol., 2022). Pro stabilizaci 1 ml rybí krve stačí 0,01 ml této látky. Mírné předávkování heparinem nevyvolává žádné změny na krevních buňkách. Množství heparinu nelze udávat přesně, neboť je u ryb prokázána druhová specifická. Například větší množství heparinu pro stabilizaci krve potřebujeme u okouna říčního (*Perca fluviatilis*) nebo candáta obecného (*Sander lucioperca*) (Svobodová a kol., 2012).

## 2.4.4. Ukazatele červeného krevního obrazu

### Stanovení počtu erytrocytů (RBC, Er)

Toto stanovení se u ryb dělá pomocí heparinizované krve zředěné Hayemovým roztokem, a to v poměru 1:200 (krev: Hayemův roztok). Tento roztok se vytvoří ze sublimátu chloridu rtuťnatého  $\text{HgCl}_2$  (2,5 g), síranu sodného  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (25 g) a chloridu sodného  $\text{NaCl}$  (5 g). To vše se rozpustí v 1000 ml destilované vody. Před samotným použitím Hayemova roztoku je potřeba jej zfiltrvat přes filtrační papír. K ředění krve se využívá „baničkové metody“ dle Bürkera, kdy využíváme skleněné baničky nebo penicilinové lahvičky o objemu 15-25 ml. Do těchto nádob je nutné nejprve nadávkovat 4975  $\mu\text{l}$  Hayemova roztoku a až poté přidat 25  $\mu\text{l}$  heparinizované krve. Pomocí pipety a špičky, kterou jsme dávkovali krev, obsah promícháme. Následně lahvičku uzavřeme a 1 minutu krouživým pohybem promícháváme. Po důkladném promíchání naplníme Bürkerovu počítací komůrku zředěnou krví. Jednotlivé erytrocyty počítáme ve 20 obdélnících, které jsou stejnoměrně rozmístěné po počítací komůrce. Samotný postup počítání je takový, že spočítáme všechny erytrocyty, které jsou uvnitř obdélníku (nedotýkají se žádných stran) a poté přičteme erytrocyty dotýkající se pravé a horní strany obdélníku (Obr. 16.). Pro počítání obvykle využíváme zvětšení mikroskopu 200 $\times$ . Napočítanou hodnotu erytrocytů pak vydělíme 100 a získáme počet erytrocytů v  $\text{T}\cdot\text{l}^{-1}$ . Počty erytrocytů se u různých druhů mohou lišit, a to i v rámci jednoho druhu (Chen a Luo, 2023). Jsou také závislé na různých faktorech prostředí, například na teplotě vody (Paul a kol., 2019). Obvyklé hodnoty počtu erytrocytů jsou v rozmezí 1,1–1,8  $\text{T}\cdot\text{l}^{-1}$  u kapra obecného nebo 0,8–1,5  $\text{T}\cdot\text{l}^{-1}$  u pstruha duhového (Svobodová a kol., 2012).



Obr. 16. – Způsob počítání erytrocytů, tmavě jsou vyznačeny počítané erytrocyty; převzato ze Svobodová a kol. (1986) (upraveno).

### Stanovení množství hemoglobinu (Hb)

Pro stanovení obsahu hemoglobinu v krvi ryb se běžně používá fotometrická kyanohemoglobinová metoda (Witeska a kol., 2022). Tato metoda spočívá ve využití transformačního roztoku, který hemoglobin dostane z erytrocytů a změní jej na stálý kyanohemoglobin. Poté se kyanohemoglobin stanovuje fotometricky pomocí spektrofotometru. Transformačních roztoků existuje několik druhů. V této práci byl využit a je popsán pouze transformační roztok podle Drabkina. Ten je možné vytvořit smícháním 0,2 g ferrikyanidu draselného –  $K_3[Fe(CN)_6]$ , 0,05 g kyanidu draselného – KCN, 1 g hydrogenuhličitanu sodného –  $NaHCO_3$  a následným rozpuštěním v 1000 ml destilované vody. Vlastní analýza probíhá tak, že do zkumavky se odměří 7 ml transformačního roztoku a do něho se přidá 25  $\mu$ l čerstvě odebrané nebo heparinizované krve. Obsah se důkladně promíchá. Při použití transformačního roztoku dle Drabkina je možné vlastní měření na spektrofotometru provést po 15 až 20 minutách. Barva kyanohemoglobinu je stálá minimálně 24 hodin. Ve spektrofotometru se měření vzorků provádí při vlnové délce 540–546 nm proti transformačnímu roztoku. Pro měření se využívá 1 cm kyvety. Výsledek se odečítá z předem připravené kalibrační křivky. Obsah takto změřeného hemoglobinu v krvi ryb se běžně udává v  $g \cdot l^{-1}$ . Obsah hemoglobinu u kaprů obecných a pstruhů duhových je obdobný a pohybuje se v rozmezí od 60 do 100  $g \cdot l^{-1}$  (Svobodová a kol., 2012).

### Stanovení hematokritu (PCV, Hk)

Hematokrit je hodnota, vyjadřující podíl erytrocytů k celkovému objemu krve. Pro stanovení se využívají tenké kapiláry. Kapiláry nejprve naplníme přibližně do 2/3 čerstvě odebranou krví (případně heparinizovanou krví). Konec, kterým jsme kapiláry plnili, utěsníme pomocí modelovací hmoty (mezi krví a modelovací hmotou nesmí být vzduch). Takto připravené kapiláry vložíme do speciální hematokritové odstředivky, kde se při 14 000 otáčkách točí po dobu 3 minut. Po odstředění je nutné odečíst hodnotu hematokritu pomocí speciálního hematokritového měřidla. Toto stanovení se stalo běžnou součástí hematologického vyšetření u ryb. Dle Chena a Lua (2023) se Hk liší v rámci jednoho druhu, ale i mezidruhově a závisí na aktivitě ryby. Je ovlivněn také velikostí erytrocytů, kvalitou vody, infekčním onemocněním či léčivý (Witeska a kol., 2022). Obvyklá hodnota hematokritu se u kapra obecného pohybuje v rozmezí 0,28–0,40  $l \cdot l^{-1}$ , hodnoty pro pstruha duhového jsou obdobné 0,30–0,45  $l \cdot l^{-1}$  (Svobodová a kol., 2012).

## 2.4.5. Základní hodnoty erytrocytu

### Střední objem erytrocytu (MCV)

Střední objem erytrocytu vypočítáme ze stanovené hodnoty hematokritu („PCV“ v  $l \cdot l^{-1}$ ) a počtu erytrocytů („Er“ v  $T \cdot l^{-1}$ ). Pro výpočet využíváme vzorec uvedený níže. Výsledky se udávají ve fentolitrech (fl). Zvýšení této hodnoty je u některých ryb reakcí na anemický stav (Witeska a kol., 2022). Obvyklé hodnoty tohoto ukazatele u zdravých ryb jsou u kapra 200–300 fl a u pstruha 350–400 fl (Svobodová a kol., 2012). Witeska a kol. (2016) udává větší rozmezí MCV u kapra obecného se pohybuje v rozmezí 130,9–367,3 fl.

$$MCV = \frac{PCV \cdot 1000}{Er}$$

### Hemoglobin erytrocytu (MCH)

Hodnota tohoto ukazatele ukazuje průměrnou koncentraci hemoglobinu v erythrocytech. Je udávána v pikogramech. Výpočet provádíme dle níže uvedeného vzorce z hodnoty hemoglobinu v  $g \cdot l^{-1}$  a počtu erytrocytů v  $T \cdot l^{-1}$ . Hemoglobin erytrocytu by se u zdravých ryb měl pohybovat v rozsahu 50–60 pg u kapra obecného a 64–75 pg u pstruha duhového (Svobodová a kol., 2012). Witeska a kol. (2016) udává větší rozmezí MCH u kapra obecného a to 31,8–139,0 pg. Zvýšené hodnoty MCH a MCV byly pozorovány u ryb trpících ichthyoftiriózou (Witeska a kol., 2010).

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



### Střední barevná koncentrace (MCHC)

Tímto ukazatelem se vyjadřuje koncentrace hemoglobinu v objemové jednotce erytrocytů. Výpočet se provádí z výsledků stanovení hemoglobinu ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a z výsledků stanovení hematokritu ( $\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$ ) podle vzorce uvedeného níže. Výsledky se udávají v  $\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$ . Obvyklé hodnoty se u zdravých ryb pohybují v rozmezích 0,20–0,26  $\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$  u kapra obecného a 0,17–0,20  $\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$  u pstruha duhového (Svobodová a kol., 2012).

$$MCHC = \frac{Hb}{PCV \cdot 1000}$$

## **2.5. Biochemické vyšetření krve ryb**

V současnosti je biochemické vyšetření krve ryb neodmyslitelnou součástí celkového vyšetření zdravotního stavu ryb. Bez tohoto typu vyšetření se již neobejde žádný ichtyopatolog (Stoskopf, 1993), neboť informace získané biochemickým rozborem krve nám podávají informace o vnitřním stavu organismu (Masopust, 2000; Pimpão a kol., 2007). Na základě biochemického vyšetření můžeme optimalizovat postupy v akvakultuře nebo zlepšit zdraví ryb (Paulo, 2023). Biochemické a hematologické vyšetření krve ryb nám podá 60–70 % informací o vyšetřovaných rybách (Masopust, 2000). Význam biochemického vyšetření je dán tím, že:

- přináší informace o metabolických funkcích, protože jejich postižení je podkladem většiny chorob,
- je dostatečně citlivé a má velké spektrum různých testů,
- je možné jej vyjádřit číslem,
- pro jeho stanovení stačí odebrat pouze vzorek krve.

Vnitřní stav rybiho organismu je ovlivňován exogenními faktory (teplota vody, množství  $\text{O}_2$  ve vodě, roční období atd.). Rovněž jej také ovlivňují endogenní vlivy jako je například druh ryby, pohlaví či zdravotní stav (Sala-Rabanal a kol., 2003).

### 2.5.1. Odběr krve pro biochemické vyšetření

Ve většině případů se pro biochemické vyšetření využívá buďto krevního séra nebo krevní plazmy. Druhá jmenovaná se využívá častěji. Pro získání krevní plazmy ryb je nutné odebranou krev ošetřit protisrážlivou látkou. Tou bývá vodný roztok sodné soli heparinu. Odebranou krev je vhodné uchovávat v chladu (4 °C) ve zkumavkách (Kolářová a Velíšek, 2012).

### 2.5.2. Zpracování krve pro biochemické vyšetření

Odebranou krev ošetřenou protisrážlivým přípravkem je vhodné po uzavření promíchat, a to z důvodu důkladného smísení krve a protisrážlivého přípravku. Pro získání krevní plazmy jsou vzorky krve co nejrychleji odstředěny na odstředivce (1–2 minuty při 12 000–16 000 otáčkách za minutu). Po odstředění se odebere krevní plazma opatrně pipetou (Duran a kol., 2023). Neprodlené odstředění krve je důležité pro stanovení AST, CK, GLU, LDH,  $Mg^{2+}$ ,  $NH_3$  a PHOS (Kolářová a Velíšek, 2012).

### 2.5.3. Biochemické stanovení ukazatelů

Ve VÚRH Vodňany probíhá biochemické stanovení na přístroji VETTEST 8008. Tento přístroj je schopen měřit následující ukazatele: albumin (ALB), alkalickou fosfatázu (ALKP), alanin aminotransferázu (ALT), amylázu (AMYL), asparát aminotransferázu (AST), kalcium ( $Ca^{2+}$ ), cholesterol (CHOL), kreatin kinázu (CK), kreatinin (CREA), gama-glutamyltransferázu (GGT), glukózu (GLU), laktát dehydrogenázu (LDH), lipázu (LIPA), magnezium ( $Mg^{2+}$ ), čpavek ( $NH_3$ ), anorganický fosfát (PHOS), celkový bilirubin (TBIL), triglyceridy (TRIG) a močovinu (UREA). Níže jsou popsány jednotlivé ukazatele, se kterými bylo pracováno při vyhodnocení výsledků pokusu v této práci.

#### GLU – glukóza

Glukóza je hlavním zdrojem energie v organismu, udává se v  $mmol \cdot l^{-1}$ . Velmi snížená hodnota glukózy v krvi u ryb indikuje selhání jater, neboť dojde k náhlému vyčerpání glykogenu. Naopak, pokud u ryb nalézáme vyšší koncentrace glukózy ( $10\text{--}30 mmol \cdot l^{-1}$ ) naznačuje to, že je ryba ve stresu. Dalšími faktory, které ovlivňují

množství glukózy v krvi ryb, jsou teplota vody, složení a množství potravy nebo množství kyslíku rozpuštěného ve vodě (Polakof a kol., 2012). Obvyklé hodnoty glukózy u kapra obecného se pohybují v rozmezí 1,3– 6,9 mmol·l<sup>-1</sup> (Kolářová a Velíšek, 2012).

#### TP – celkové bílkoviny (total protein)

Koncentrace TP v krevní plazmě představuje všechny bílkoviny nacházející se ve vodné fázi krve. U zdravých ryb tvoří hlavní složku albumin (ALB) a zbylé proteiny jsou alfa, beta a gama globuliny. Množství globulinů (GLOB) je možné stanovit oddělením albuminu od TP. Množství celkových bílkovin sleduje poruchu funkce jater a ledvin (Kolářová a Velíšek, 2012). Zvýšené hodnoty celkových bílkovin naznačují poškození buněk v ledvinách a játrech (Walmsley a kol., 1992). Nižší hodnoty TP indikují dlouho probíhající infekci nebo otravu – například pesticidy na bázi triazinů (Velíšek a kol., 2008). Obvyklé hodnoty celkových bílkovin u kapra se pohybují v rozmezí 16–45 g·l<sup>-1</sup> (Kolářová a Velíšek, 2012).

#### ALB – albuminy

Plazmatické bílkoviny jsou tvořeny z 40–60 % albuminem, který je tvořen především v játrech. Stejně jako u předchozího ukazatele, tak i ALB sleduje poškození jater a ledvin. Množství ALB v krvi může také být ovlivněno potravou, neboť převážně rostlinná potrava hodnotu ALB v krvi snižuje (Chernyavskikh a kol., 2019). Albuminy se u kapra obecného pohybují v rozsahu 1–10 g·l<sup>-1</sup> (Kolářová a Velíšek, 2012).

#### GLOB – globuliny

Jak je již uvedeno výše, globuliny je možno stanovit oddělením albuminu od celkové bílkoviny. Dělíme je na 3 frakce (alfa, beta, gama). U kapra obecného se obvykle globuliny pohybují v rozmezí 17–40 g·l<sup>-1</sup> (Kolářová a Velíšek, 2012). Vyšší koncentrace globulinů v krvi ryb značí probíhající zánět (Kaplan a Pesce, 1989).

#### AST – asparát aminotransferáza

Asparát aminotransferáza je enzym, který můžeme nalézt uvnitř mitochondrií a v cytoplazmatické tekutině. Nejvyšší aktivitu tohoto enzymu můžeme nalézt uvnitř jater a svalových buněk. Do krevního oběhu se cytoplazmatický isoenzym AST dostává při zvýšení permeability buněčných membrán. Zvýšení mitochondriální AST je způsobené těžším poškozením, narušujícím membránu mitochondrií. Výrazné zvýšení asparát aminotransferázy značí nekrózu jaterního parenchymu. Fyziologicky zvýšená aktivita

AST je u juvenilních ryb (Folmar, 1993). Obvyklé hodnoty u kapra obecného dosahují 0,55–6,64  $\mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$  (Kolářová a Velíšek, 2012).

#### ALT – Alanin aminotransferáza

Je enzym nacházející se v cytoplasmě především jaterních buněk. Do krve je vyplavován při zvyšování permeability hepatocytární membrány již při menším poškození. Pokud dojde k vysokému zvýšení alanin aminotransferázy, značí to toxické poškození jater a metabolické vady s participací jater (Neff, 1985). U kapra obecného dosahuje alanin aminotransferáza obvykle hodnot 0,1–1,6  $\mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$  (Kolářová a Velíšek, 2012).

#### LDH – laktát dehydrogenáza

Laktát dehydrogenáza je cytoplazmatický enzym, který není pro jaterní parenchym specifický. Do krve se uvolňuje již při malém poranění. Můžeme ho označit tedy jako citlivý indikátor poškození tkání (Yousaf a Powell, 2012). Jeho význam hraje roli při diferenciální diagnostice poškození jater. LDH tvoří čtyři podjednotky dvou typů: sval (M) a srdce (H). Dle zastoupení jednotek jsme schopni dále rozlišit 5 isoenzymů. Ty jsou poté to jisté míry tkáňově specifické. Stanovení aktivity laktát dehydrogenázy indikuje poškození srdeční a kosterní svaloviny a také jater, případně některá nádorová onemocnění. Obvyklé hodnoty LDH u kapra obecného se běžně pohybují v rozmezí 9,9–22,0  $\mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$  (Kolářová a Velíšek, 2012).

#### ALP – Alkalická fosfatáza

Alkalická fosfatáza je enzym vázaný na buněčnou membránu, vyskytující se v řadě tkání. Známe množství jeho patologických i normálních izoenzymů. Normální izoenzymy (kostní, jaterní, střevní) představují značnou část plazmatické aktivity alkalické fosfatázy. Tento enzym má vliv na membránový transport, syntézu proteinů a metabolismus glykogenu (Bhavan a Geraldine, 2001). Změny v aktivitě alkalické fosfatázy naznačují onemocnění jater související s biliárním systémem. U kapra obecného dosahuje ALP obvykle hodnot 0,05–1,72  $\mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$  (Kolářová a Velíšek, 2012).

#### Ca – vápník (kalcium)

Vápník je esenciální biogenní prvek. Podílí se například na enzymatické aktivitě, krevní srážlivosti či osmoregulaci a je důležitý také při tvorbě kostí (Fazio a kol., 2021). V krvi ryb je přibližně 40–45 % vápníku navázáno na bílkoviny, 50 % ionizovaného

a 5–10 % je v komplexu s kyselinami. Nízká hladina vápníku v krvi naznačuje problémy s onemocněním ledvin, kosterního aparátu a defekty metabolismu vápníku. U kapra obecného se pohybuje koncentrace vápníku v krvi v rozmezí  $0,92\text{--}3,23 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Kolářová a Velíšek, 2012).

#### PHOS – anorganický fosfát

Důležitý je fosfor jako prvek především v metabolických procesech a obsažen také v nukleových kyselinách, fosfolipidech a nukleotidech. Podílí se také při růstu a mineralizaci kostí (Fazio a kol., 2021). Rovněž fosfáty hrají roli v pufrujících systémech uvnitř tkáňových tekutin. Pokud dojde ke změnám hladiny PHOS, značí to těžké poškození ledvin. U kapra obecného dosahují hodnoty PHOS rozmezí  $0,72\text{--}3,89 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Kolářová a Velíšek, 2012).

#### TRIG – triglyceridy

Triglyceridy je možné využít při hodnocení výživného stavu a metabolismu lipidů u sladkovodních ryb. Změny jejich hladin v rybí krvi mohou naznačovat vznik některých patologických stavů jako je například poškození ledvin, problémy s ukládáním glykogenu, problémy s metabolismem lipidů nebo stres vyvolaný toxickými látkami ve vodním prostředí (Colombo, 1994; Yang a Chen, 2003; Agrahari a kol., 2007). K rybám se většinou triglyceridy dostávají spolu s předkládaným krmivem nebo jsou syntetizovány v játrech. Běžné koncentrace triglyceridů u kapra obecného se pohybují v rozmezí  $0,49\text{--}2,83 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Kolářová a Velíšek, 2012).

### 3. Materiál a metodika

Vlastní test probíhal v období 26.11.–29.11.2023 v akvariijní místnosti Laboratoře vodní toxikologie a ichthyopatologie ve VÚRH Vodňany. Pro test bylo použito 54 kaprů obecných (*Cyprinus carpio* L.). Tyto ryby byly dovezeny z chovu FROV JU – rybník Velká Okrouhlice. Průměrná hmotnost ryb byla  $906 \pm 235$  g. Všechny ryby byly aklimatizovány po dobu 48 hodin a následně byly rozděleny do 9 akvárií seřazených do 3 řad. Pro test byla využita akvária o objemu 300 l, která byla naplněna vodou do objemu 200 l. Tato akvária byla před započítím testu vydezinfikována přípravkem, obsahujícím 5 % chlornanu sodného a důkladně očištěna vodou. Do jednotlivých akvárií (Obr. 17.) bylo nasazeno 6 kaprů. Každá řada akvárií (3 akvária) představovala jednu skupinu testovaných ryb, které byly vystaveny stejné látce (kontrola bez aplikované látky, kyselina peroctová a peroxid vodíku). V průběhu testu byla každých 24 hodin prováděna výměna poloviny objemu vody v každém akváriu. Fyzikální parametry vody (pH, teplota, množství rozpuštěného kyslíku) byly měřeny denně pomocí přístroje MultiLine P4. Aerace všech akvárií byla zajištěna v průběhu celého testu neustálým vzduchováním pomocí vzduchovacích kamenů umístěných na dně akvárií. Při testu nebylo využito žádného umělého osvětlení (zářivky, lampy atd.), všechna akvária byla zajištěna deskami proti výskokům ryb. Vždy po dokončení výměny vody v akváriích byla provedena aplikace chemikálií (Obr. 18.) dle testovaných skupin:

- Kontrolní skupina (K) – pouze výměna vody
- Skupina kyselina peroctová (KPO) –  $1,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$
- Skupina peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) –  $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$



Obr. 17. – Akvária s rybami, kde probíhal vlastní test; foto: J. Kocour.

Pro přípravu koupele s kyselinou peroctovou bylo využito přípravku Persteril 15% v dávce 1,3 ml do 200 l, což se rovná koncentraci  $1,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  kys. peroctové. Koupel s peroxidem vodíku byla vytvořena z peroxidu vodíku 30% p.a. Do akvárií o objemu 200 l bylo aplikováno 33 ml peroxidu vodíku, což odpovídá koncentraci  $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ .



Obr. 18. – Přípravky, ze kterých byly namíchané koupele pro léčbu ryb; A - Persteril 15%, B - Peroxid vodíku 30%; foto J. Kocour.

Po ukončení testu byla všem rybám nejprve odebrána krev. Následně byl proveden stěr na bakteriologické vyšetření z kůže a ze žaber. Poté byly rybám provedeny dva stěry vzorků na parazitologické vyšetření, jeden z kůže a druhý ze žaber. Nakonec byly všechny ryby usmrceny tupým úderem do hlavy.

### 3.1. Hematologické vyšetření

Po ukončení testu byla všem rybám odebrána krev. Ryba po odchycení byla fixována pomocí vlhkého hadru a položena na pravý bok. Krev byla odebrána punkcí ocasní cévy pomocí heparinizované injekční stříkačky, která byla rybě zavedena do těla pod úhlem 45° v místech za řitní ploutví (viz. kapitola 2.4.2. Odběr krve). Takto odebraná krev byla ihned po odebrání zpracována tak, aby mohly být vyšetřeny následující parametry (Obr. 19.): počet erytrocytů (RBC, Er), množství hemoglobinu (Hb), hematokrit (PCV, Hk), střední objem erytrocytu (MCV), hemoglobin erytrocytu (MCH), střední barevná koncentrace (MCHC). Postup stanovení těchto parametrů je upřesněn v kapitole 2.4. Hematologie. Všechny tyto parametry byly stanovovány dle metodiky Svobodová a kol. (2012).



Obr. 19. – Příprava kapilár pro stanovení hematokritu; foto: J. Kocour.



### 3.2. Biochemické vyšetření

Pro biochemické vyšetření byla využita krevní plazma získaná pomocí odstředivky Microcentrifuge MPW – 55. Krev byla odstředěna při 14 000 otáčkách po dobu 3 minut. Plazma byla poté odebrána a uchována v mrazícím boxu při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do doby biochemického vyšetření. Biochemické indikátory byly stanoveny na biochemickém analyzátoru VETTEST 8008 (IDEXX Laboratories Inc. U.S.A., firmy Medisoft), který pracuje na principu suché chemické a kolorimetrické analýzy, kde vyhodnocení probíhá na selektivních testovacích discích (Multi-laiier film slides, Kodak) laserovým čtením bar kódů. Pomocí tohoto přístroje byly stanoveny tyto parametry: GLU ( $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), ALB ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), TP ( $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), ALT ( $\text{U}\cdot\text{l}^{-1}$ ), AST ( $\text{U}\cdot\text{l}^{-1}$ ), ALP ( $\text{U}\cdot\text{l}^{-1}$ ), LDH ( $\text{U}\cdot\text{l}^{-1}$ ), PHOS ( $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), Ca ( $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), TRIG ( $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), UREA ( $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), GLOB ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

### 3.3. Bakteriologické vyšetření

K odběru vzorků pro bakteriologické vyšetření se přistoupilo po odběru krve. Bylo využito speciálních odběrových sad, skládajících se ze zkumavky s transportním médiem a odběrovým tamponem. Vlastní odběr materiálu (Obr. 20.) pro toto vyšetření probíhal vždy u 6 ryb z každé testované skupiny (2 ryby z akvária). Vzorky tedy byly odebrány 6 rybám v kontrole, 6 rybám vystaveným peroxidu vodíku a 6 rybám vystaveným kyselině peroctové. Vlastní odběr probíhal vždy 2 táhlými pohyby po kůži ryb v místech pod hřbetní ploutví nad postranní čárou a také 2 táhlými pohyby v žaberní dutině ze žaberních oblouků a žaberních lístků. Délka stěru vždy byla přibližně 5 cm. Následně byl odebraný materiál i s tamponem vložen do zkumavky s transportním médiem. Celkem tedy bylo takto odebráno 36 vzorků pro bakteriologické vyšetření. Vzorky byly hromadně zaslány svozovou linkou k vyšetření do SVÚ Jihlava – pracoviště České Budějovice. Zde došlo k základní kultivaci metodou SOP-N BAK.03 a semikvantitativnímu hodnocení kolonií bakterií (Tab. 8.).

Tab. 8. – Hodnocení kolonií bakterií (KTJ – kolonietvorná jednotka).

| Slovní hodnocení | Označení | Jiné označení | Růst bakterií (kolonie tvořící jednotku) |
|------------------|----------|---------------|--|
| slabá infekce    | 1        | +             | méně než 50 KTJ                          |
| mírná infekce    | 2        | ++            | 50–100 KTJ                               |
| střední infekce  | 3        | +++           | 100–200 KTJ                              |
| silná infekce    | 4        | ++++          | 200–300 KTJ                              |
| masivní infekce  | 5        | +++++         | > 300 KTJ                                |

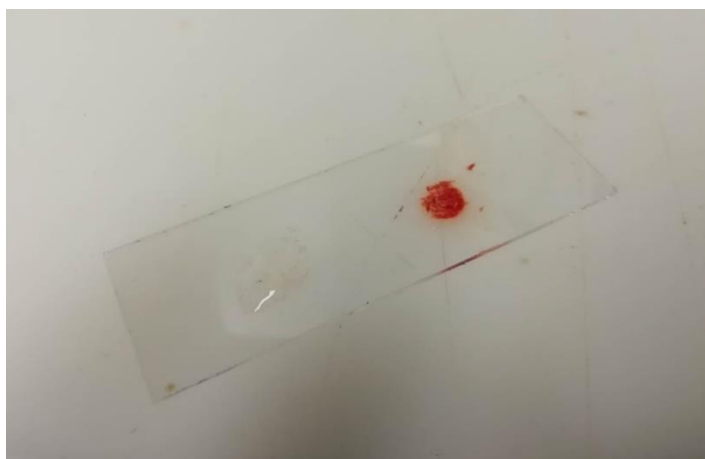


Obr. 20. – Odběr vzorku z kůže ryb na bakteriologické vyšetření; foto J. Kocour.

### 3.4. Parazitologické vyšetření kůže a žaber

Všem rybám v testu bylo provedeno také parazitologické vyšetření. Odběr vzorků proběhl pomocí skalpelu, čisté vody, podložních a krycích sklíček. Stěry na parazitologické vyšetření byly provedeny po odebrání vzorků na bakteriologické vyšetření. Konkrétně byly vyšetřovány dva stěry. První stěr byl proveden čepelí skalpelu z kůže ryb v oblasti pod hřbetní ploutví nad postranní čárou. Odebraný materiál byl ihned po odběru přenesen na podložní sklíčko (Obr. 21.), kam byla přidána kapka vody. Nakonec byl odebraný materiál zakryt krycím sklíčkem. Poté byl skalpel důkladně omyt čistou vodou, aby nedošlo k přenosu parazitů mezi jednotlivými vzorky a rybami. Druhý

stěr byl proveden ze žaber, konkrétně ze žaberních lístků prvního žaberního oblouku, kde se stíraly žaberní lístky ve směru od žaberního oblouku k okraji lístků. I tento odebraný materiál byl přenesen na podložní sklíčko, kam byla přidána kapka čisté vody a následně byl překryt krycím sklíčkem. Neprodleně byly všechny vzorky vyšetřeny pod mikroskopem při zvětšení 40–100× dle velikosti nalézáných parazitů. Následně byla zhodnocena prevalence (%) a také průměrný stupeň intenzity nalezených druhů (Tab. 9.) vypočtený z infikovaných ryb.



Obr. 21. – Odebrané vzorky připravené k parazitologickému vyšetření; foto: J. Kocour.

Tab. 9. - Determinace stupně parazitární infekce pomocí stupnice 0-4.

| Označení | Jiné označení | Nalezené množství |
|----------|---------------|-------------------|
| 0        | bez           | 0 ks              |
| 1        | oj.           | 1 ks              |
| 2        | +             | 2 ks              |
| 3        | ++            | 3 ks              |
| 4        | +++           | 4 ks              |

### **3.5. Statistické vyhodnocení**

Výsledky hematologických a biochemických rozborů byly vyhodnoceny a porovnány statistickým programem STATISTICA (verze 8.0 pro Windows, StatSoft) za použití dvoucestného ANOVA testu. Výsledky bakteriologického a parazitologického vyšetření byly porovnány za použití Mann Whitney testu. Statisticky významné rozdíly byly vyhodnoceny na hranici významnosti ( $P < 0,05$  a  $P < 0,01$ ).

## 4. Výsledky

### 4.1. Mortalita

V průběhu testu nedošlo k žádnému úhynu. Při zahájení ani v průběhu testu ryby nevykazovaly změny chování (neklid atd.).

### 4.2. Fyzikálně chemické parametry vody

Fyzikálně chemické parametry byly měřeny každý den. Výsledky těchto měření jsou uvedeny v Tab. 10. V průběhu testu nedošlo k žádným výrazným výkyvům hodnot pH, teploty vody a množství kyslíku.

Tab. 10. – Naměřené fyzikálně chemické parametry vody v průběhu testu.

|                                      | K            | KPO          | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
|--------------------------------------|--------------|--------------|-------------------------------|
| pH                                   | 7,20 ± 0,17  | 7,09 ± 0,10  | 7,23 ± 0,12                   |
| Teplota (°C)                         | 17,13 ± 0,07 | 17,03 ± 0,16 | 16,86 ± 0,17                  |
| O <sub>2</sub> (mg·l <sup>-1</sup> ) | 6,05 ± 0,83  | 5,76 ± 0,81  | 6,86 ± 0,37                   |

### 4.3. Hematologické vyšetření

Výsledné hodnoty hematologických parametrů jsou uvedeny v Tab. 11. Statisticky významně vyšší hodnoty středního objemu erytrocytu byly zaznamenány u skupiny KPO v porovnání s K.

Tab. 11. – Naměřené hodnoty hematologických parametrů.

| Parametr<br>(jednotky)    | K                           | KPO                         | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
|                           | x ± SD (n=18)               | x ± SD (n=18)               | x ± SD (n=18)                 |
| PCV (l·l <sup>-1</sup> )  | 0,29 ± 0,07 <sup>a</sup>    | 0,30 ± 0,06 <sup>a</sup>    | 0,29 ± 0,04 <sup>a</sup>      |
| Hb (g·l <sup>-1</sup> )   | 93,42 ± 14,68 <sup>a</sup>  | 95,05 ± 18,90 <sup>a</sup>  | 96,82 ± 21,32 <sup>a</sup>    |
| RBC (T·l <sup>-1</sup> )  | 1,52 ± 0,38 <sup>a</sup>    | 1,40 ± 0,22 <sup>a</sup>    | 1,42 ± 0,26 <sup>a</sup>      |
| MCV (fl)                  | 191,18 ± 22,15 <sup>a</sup> | 214,50 ± 27,13 <sup>b</sup> | 205,50 ± 30,92 <sup>ab</sup>  |
| MCH (pg)                  | 64,76 ± 17,38 <sup>a</sup>  | 67,89 ± 7,65 <sup>a</sup>   | 69,29 ± 16,24 <sup>a</sup>    |
| MCHC (l·l <sup>-1</sup> ) | 0,34 ± 0,08 <sup>a</sup>    | 0,32 ± 0,02 <sup>a</sup>    | 0,34 ± 0,07 <sup>a</sup>      |

*Odlišná písmena indikují statisticky významný rozdíl na hladině významnosti  $P < 0,05$ . Tyto změny jsou pro lepší přehlednost zvýrazněny oranžovou barvou.*

#### 4.4. Biochemické vyšetření

Biochemickým vyšetřením a následným statistickým vyhodnocením (Tab. 12.) byly zjištěny statisticky významné hodnoty glukózy a alanin aminotransferázy u všech testovaných skupin (K, KPO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Dále byly zjištěny statisticky významně vyšší hodnoty alkalické fosfatázy a anorganického fosfátu u KPO a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v porovnání s kontrolou.

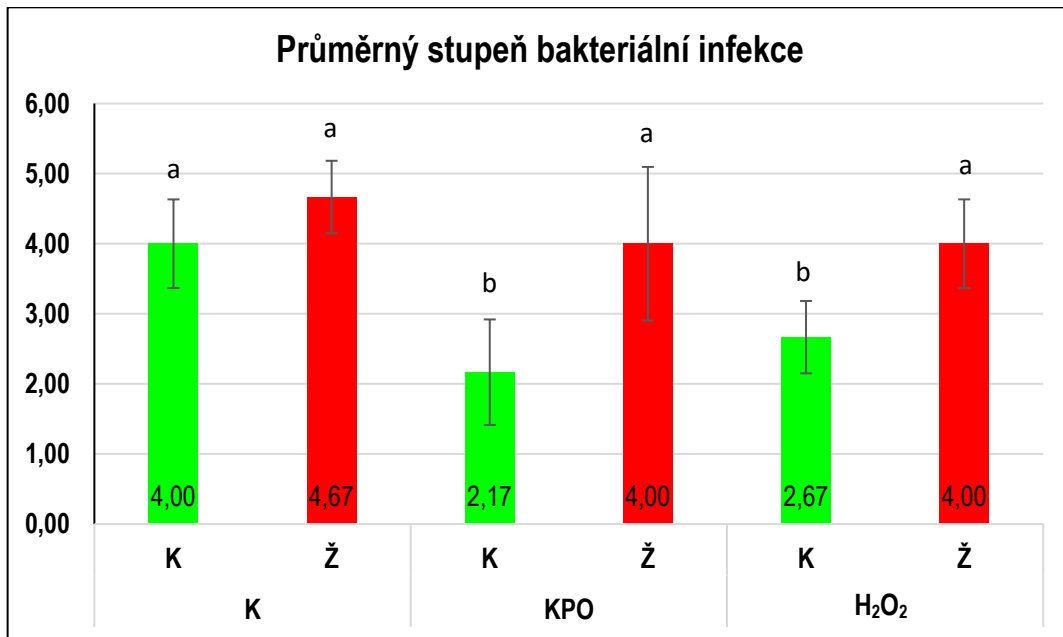
Tab. 12. – Naměřené hodnoty biochemických parametrů.

| Parametr<br>(jednotky)       | K                           | KPO                          | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|
|                              | $x \pm SD$ (n=18)           | $x \pm SD$ (n=18)            | $x \pm SD$ (n=18)             |
| ALB (g·l <sup>-1</sup> )     | 2,36 ± 1,01 <sup>a</sup>    | 2,56 ± 1,15 <sup>a</sup>     | 3,11 ± 1,13 <sup>a</sup>      |
| GLU (mmol·l <sup>-1</sup> )  | 2,90 ± 0,64 <sup>a</sup>    | 4,62 ± 0,96 <sup>b</sup>     | 6,63 ± 1,00 <sup>c</sup>      |
| TP (g·l <sup>-1</sup> )      | 39,93 ± 2,53 <sup>a</sup>   | 39,06 ± 2,75 <sup>a</sup>    | 41,78 ± 2,39 <sup>a</sup>     |
| ALT (U·l <sup>-1</sup> )     | 36,93 ± 12,90 <sup>a</sup>  | 72,89 ± 18,37 <sup>b</sup>   | 58,28 ± 11,21 <sup>c</sup>    |
| AST (U·l <sup>-1</sup> )     | 438,57 ± 60,22 <sup>a</sup> | 452,56 ± 64,51 <sup>a</sup>  | 450,11 ± 59,14 <sup>a</sup>   |
| ALP (U·l <sup>-1</sup> )     | 11,50 ± 4,26 <sup>a</sup>   | 18,94 ± 3,89 <sup>b</sup>    | 18,44 ± 3,84 <sup>b</sup>     |
| LDH (U·l <sup>-1</sup> )     | 909,07 ± 84,55 <sup>a</sup> | 943,22 ± 107,13 <sup>a</sup> | 978,44 ± 85,70 <sup>a</sup>   |
| PHOS (mmol·l <sup>-1</sup> ) | 2,18 ± 0,16 <sup>a</sup>    | 2,73 ± 0,23 <sup>b</sup>     | 2,56 ± 0,26 <sup>b</sup>      |
| Ca (mmol·l <sup>-1</sup> )   | 2,35 ± 0,26 <sup>a</sup>    | 2,37 ± 0,25 <sup>a</sup>     | 2,35 ± 0,24 <sup>a</sup>      |
| TRIG (mmol·l <sup>-1</sup> ) | 1,63 ± 0,26 <sup>a</sup>    | 1,84 ± 0,41 <sup>a</sup>     | 2,14 ± 0,37 <sup>b</sup>      |
| GLOB (g·l <sup>-1</sup> )    | 37,57 ± 2,31 <sup>ab</sup>  | 36,50 ± 3,11 <sup>a</sup>    | 38,78 ± 2,53 <sup>b</sup>     |

*Odlíšná písmena indikují statisticky významný rozdíl. Tyto změny jsou pro lepší přehlednost zvýrazněny oranžovou barvou.*

## 4.5. Bakteriologické vyšetření

Semikvantitativní zhodnocení bakteriálních kolonií ze stěru kapra je uvedeno v Grafu 1. Z výsledků je patrný statisticky významný pokles ( $P < 0,05$ ) bakteriální infekce u obou skupin ryb na kůži. Na druhou stranu, na žábřích ryb byl zjištěn nevýznamný pokles bakteriální infekce u všech skupin.



Graf 1. – Průměrný stupeň bakteriální infekce žaber a kůže ryb u všech testovaných skupin;

K - kůže ryb, Ž - žábry ryb.

*Statisticky významné rozdíly na hladině významnosti  $P < 0,05$  mezi skupinami jsou indikovány rozdílnými písmeny.*



#### 4.6. Parazitologické vyšetření kůže ryb

Parazitologicky bylo na kůži ryb identifikováno 5 druhů parazitů. Konkrétně se jednalo o *Trichodina* sp., *Ichthyophthirius* sp., *Gyrodactylus* sp., *Apiosoma* sp., *Argulus* sp. K úplné eliminaci parazitů a statisticky významnému poklesu ( $P < 0,05$ ) *Trichodina* sp. došlo ve skupině ryb, které byly vystaveny kyselině peroctové (viz. Tab. 13.).

Tab. 13. - Prevalence (%) a průměrný stupeň intenzity parazitární infekce kůže vyšetřovaných ryb u všech testovaných skupin (n=18).

| Skupina                       | Prevalence % / stupeň infekce |                         |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
|                               | <i>Trichodina</i> sp.         | <i>Gyrodactylus</i> sp. |
| K                             | 100/2,3 <sup>a</sup>          | 6/1,0                   |
| KPO                           | 0/0,0 <sup>b</sup>            | 33/1,0                  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 100/2,1 <sup>a</sup>          | 22/1,0                  |

*Statisticky významné rozdíly na hladině významnosti  $P < 0,05$  jsou indikovány odlišnými písmeny. Tyto změny jsou pro lepší přehlednost zvýrazněny oranžovou barvou.*

#### 4.7. Parazitologické vyšetření žaber ryb

Parazitologickým vyšetřením žaber bylo nalezeno 8 druhů parazitů. Nalezeni byly příslušníci druhů: *Trichodina* sp., *Ichthyophthirius* sp., *Ichthyobodo* sp., *Gyrodactylus* sp., *Chilodonella* sp., *Apiosoma* sp., *Eudiplozoon* sp., *Dactylogyru* sp. Úplně byly eliminovány parazité (Tab. 14.) a také zde došlo ke statisticky významnému poklesu ( $P < 0,05$ ) *Trichodina* sp. Také došlo k eliminaci *Ichthyobodo* sp. u skupiny ryb, vystavených kyselině peroctové.

Tab. 14. - Prevalence (%) a průměrný stupeň intenzity parazitární infekce žaber vyšetřovaných ryb u všech testovaných skupin (n=18).

| Skupina                       | Prevalence % / stupeň infekce |                         |                        |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------|
|                               | <i>Trichodina</i> sp.         | <i>Gyrodactylus</i> sp. | <i>Ichthyobodo</i> sp. |
| K                             | 100/1,2 <sup>a</sup>          | 33/1,0                  | 44/2,0                 |
| KPO                           | 0/0 <sup>b</sup>              | 39/1,1                  | 0/0                    |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 100/1,6 <sup>a</sup>          | 17/1,1                  | 6/2,1                  |

*Statisticky významné rozdíly na hladině významnosti  $P < 0,05$  jsou indikovány odlišnými písmeny. Tyto změny jsou pro lepší přehlednost zvýrazněny oranžovou barvou.*

## 5. Diskuze

Akvakultura se ve světě neustále rozrůstá a pravděpodobně ještě bude do budoucna růst. Jelikož se rozrůstá i počet chovaných druhů ryb, dochází k zanášení nových parazitů a také nemocí do chovů ryb. Pro jejich eliminaci existuje řada metod. Například různé koupele či biologické metody kontroly (Buchmann, 2022). V této práci byla hodnocena účinnost dlouhodobých koupelí kyseliny peroctové (KPO) a peroxidu vodíku ( $H_2O_2$ ). Obě dvě látky bývají hlavní složkou různých desinfekčních přípravků. Jak KPO, tak i  $H_2O_2$  jsou látky, které mají potenciál využívání v akvakultuře, protože nezanechávají v prostředí žádná rezidua. Kyselina peroctová netvoří žádné mutagenní ani jinak toxické produkty rozkladu (Payne, 1988; Monarca a kol., 2002) a peroxid vodíku je ve vodě nestálý a podléhá rychlému rozkladu na kyslík a vodu (Block, 2001). Z toho důvodu se jeví obě látky jako vhodné pro koupele ryb.

Hodnocení hematologických a biochemických parametrů u ryb se stalo důležitým prostředkem k pochopení normálních a patologických procesů a toxikologických dopadů. Krevní ukazatele často podléhají změnám v závislosti na stresu a faktorech prostředí (Hlavová, 1993). Více biochemického toxikologického výzkumu bylo provedeno na savcích než na rybách. Není však překvapivé, že mezi druhy obratlovců existuje mnoho biochemických podobností (Hochachka a Mommsen, 1995). V našem testu došlo v hematologickém vyšetření pouze k ovlivnění hodnot MCV, kde byly zaznamenány statisticky vyšší ( $P < 0,05$ ) hodnoty u skupiny vystavené kyselině peroctové ( $214,50 \pm 27,13$  fl). Tyto hodnoty sice byly statisticky významně odlišné od hodnot naměřených v kontrole, ale i tak se hodnoty u všech skupin pohybují v rozmezí udávaným Svobodovou a kol. (2012) pro kapra 200–300 fl. Witeska a kol. (2016) udává větší rozmezí pro kapra, a to 130,9–367,3 fl. I do tohoto rozmezí se zjištěné hodnoty spolehlivě vejdu.

U dvou parametrů krve ryb vystavených KPO a  $H_2O_2$ , u kterých nebyl zaznamenán žádný statistický významný vliv byly naměřeny hodnoty, které nespádaly do uvedených fyziologických mezí. Po stanovení a porovnání hodnot prvního parametru MCH bylo zjištěno, že hodnoty ve skupinách KPO i  $H_2O_2$  jsou lehce vyšší v porovnání s tím, co udává Svobodová a kol. (2012). Witeska a kol. (2016) i u tohoto parametru udává větší rozsah hodnot a to 31,8–139,0 pg. Do tohoto rozsahu se naměřené hodnoty s přehledem vejdu. Druhým parametrem naměřeným mimo rozsah byl u obou skupin (KPO i  $H_2O_2$ )

MCHC. Zde byly naměřeny hodnoty překračující rozmezí udávané Svobodovou a kol. (2012) ( $0,20-0,26 \text{ l}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Jak MCH, tak i MCHC jsou ukazatele, které nejsou přímo stanovovány ze vzorku, ale jsou zjišťovány výpočtem. V další studii došlo u pstruha duhového po 30minutové krátkodobé koupeli v přípravku Aquastar (4 % kyselina peroctová, 10 % kyselina octová a 23 % peroxid vodíku), v koncentraci  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  kyseliny peroctové, ke staticky významnému zvýšení PCV, Hb a MCH (Hushangi a Shekarabi, 2018).

Biochemické vyšetření krve je laboratorní stanovení vlastností a složení krve. Biochemické vyšetření a jeho výsledky v sobě odrážejí změnu metabolismu, tudíž jsou i odrazem zdravotního stavu organismu. Často mohou ukázat změny ještě před vypuknutím příznaků nemoci, mají tedy i významnou prognostickou hodnotu. Chupani a kol. (2014) u amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*) prokázali vliv koupele kyseliny peroctové na biochemické parametry LDH a AST. V našem testu byl testován kapr obecný (*Cyprinus carpio* L.), nebyly však zaznamenány žádné statisticky významné změny LDH a AST. Byl však zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi skupinami ryb u GLU, ALT, ALP, PHOS ( $P < 0,01$ ) a u TRIG a GLOB ( $P < 0,05$ ). Hodnoty glukózy, jakožto hlavního zdroje energie v organismu, se lišily mezi všemi skupinami. U všech skupin byly naměřeny hodnoty pohybující se v udávaném rozmezí pro kapra  $1,3-6,9 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Kolářová a Velíšek, 2012). Množství glukózy lze použít jako indikátor stresu (Yin a kol., 1995). To proto, že pokud je organismus ve stresu, začne využívat energetické zásoby. Těmito zásobami je většinou glykogen ve svalech a játrech, který zvyšuje množství glukózy v plazmě (Barton a kol., 1987). U skupin ryb vystaveným KPO a  $\text{H}_2\text{O}_2$  byly naměřeny vyšší hodnoty glukózy než u kontrolní skupiny. To značí zvýšení stresu u ryb v nádržích s desinfekčními látkami oproti rybám v kontrole.

Alanin aminotransferáza (ALT) je enzym vyskytující se v plazmě a různých tkáních, nejčastěji však játrech, kde indikuje jejich poškození. Rastiannasab a kol. (2016) zjistili, že u kaprů infikovaných *Gyrodactylus* sp. a *Dactylogyrus* sp. došlo ke zvýšení alanin aminotransferázy, aspartát aminotransferázy a dalších látek. Přestože v našem testu byly ryby infikované těmito parazity a naše naměřené výsledky ukázaly statisticky významné rozdíly mezi všemi testovanými skupinami, hodnoty i přes to splňovaly fyziologické rozmezí udávané Kolářovou a Velískem (2012).

Na metabolismu glykogenu, syntéze proteinů a membránovém transportu se podílí alkalická fosfatáza. Je to enzym ze skupiny enzymů vázaných na buněčnou membránu. Vyšší hodnoty tohoto enzymu se v organismu vyskytují především pokud organismus trpí nějakým onemocněním (Misáilá a kol., 2008). Přestože v našem testu byly zjištěny statisticky významné odlišnosti mezi kontrolou a skupinami vystavenými kyselině peroctové a peroxidu vodíku, nedošlo k žádnému ohrožujícímu zvýšení aktivity tohoto enzymu. Naměřené hodnoty se totiž pohybovaly ve spodních hodnotách rozmezí udávaného Kolářovou a Velískem (2012). Stejně statisticky významné rozdíly vyšly u anorganického fosforu, kde se také odlišovaly testované skupiny od kontrolní skupiny a rovněž koncentrace fosforu byla v rozmezí udávaném pro zdravé ryby. Co se týká triglyceridů, jejich abnormální hodnoty u kaprů mohou být způsobeny vysokým podílem tuků v potravě (Nasir a Al-Sraji, 2013). V našem testu ryby nebyly krmeny a zaznamenali jsme statisticky významně vyšší hodnoty pouze u skupiny, která byla vystavena peroxidu vodíku. Jejich naměřené hodnoty se ale spolehlivě vešly do rozmezí udávaného Kolářovou a Velískem (2012). U globulinů také nebyly zaznamenány žádné vysoké koncentrace, naznačuje to tedy, že u ryb neprobíhaly žádné zánětlivé procesy (Kaplan a Pesce, 1989).

Ryby žijí v prostředí, kde se přirozeně vyskytují mikroorganismy. Hojně se vyskytují v recirkulačních systémech (Liu a kol., 2018). Bakterie se mohou stát zdravotní hrozbou pro ryby. Imunitní systém ryb dokáže rozlišit komenzální a patogenní bakterie. Komenzální bakterie imunitní systém toleruje, naopak patogenní bakterie imunitní systém ryb reguluje různými pochody (Gomez a kol., 2013). Bakteriální onemocnění ryb může podpořit také výskyt parazitů (Holzer a kol., 2006). Z těchto důvodů je vhodné snižovat bakteriální zatížení vody. Dle výsledků bakteriálního vyšetření našeho pokusu můžeme usuzovat, že obě látky ovlivňují výskyt bakterií, a to zejména na povrchu (kůži) ryb, kde byl zaznamenán statisticky významný pokles ( $P < 0,05$ ). Co se týká žaber ryb, nebyl v množství bakterií zaznamenán statisticky významný rozdíl. Lze usuzovat, že větší hodnoty bakterií jsou dány tím, že ryba přes žábry přefiltruje jen určitý objem vody s léčivem. Proto nejsou pravděpodobně hodnoty poklesu statisticky významné jako u bakteriálního vyšetření kůže, kde je kůže ryb ve styku s v podstatě nekonečným objemem vody, podle toho, jak ryba plave. Rozdíl mezi bakteriálním osídlením kůže u ryb, konkrétně mezi skupinami vystaveným kyselině peroctové a peroxidu vodíku, je pravděpodobně dán tím, že kyselina peroctová je silnější oxidační desinfekční prostředek

než peroxid vodíku a rozkládá se na biologicky odbouratelné zbytky (Kitis, 2004). Navíc bylo prokázáno, že koncentrace kyseliny peroctové  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  snižuje růst patogenních bakterií v akvakultuře, jako jsou *Flavobacterium columnare*, *Yersinia ruckeri* a *Aeromonas salmonicida* (Marchand a kol., 2012; Meinelt a kol., 2015). Liu a kol. (2018), potvrdily, že opakovaná aplikace kyseliny peroctové ( $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$   $2 \times$  týdně) snižuje přítomnost bakterií ve vodě recirkulačního systému a pozitivně působí na jejich žábry a celkové zdraví ryb. Russo a kol. (2007) potvrdily, že i peroxid vodíku se dá využít ke snížení počtu bakterií, což se částečně potvrdilo i v našem testování.

Při parazitologickém vyšetření byla vyšetřována kůže a žábry ryb. Počáteční nízká prevalence všech druhů parazitů byla dána tím, že pokus probíhal v době, kdy je voda přirozeně chladná, ne optimální pro rychlé parazitární množení, tudíž ani prevalence parazitů nebývá vysoká. Naopak v letním období při vyšší teplotě vody bývá prevalence parazitů vyšší. V pokusu proto bylo nalezeno jen devět druhů parazitů, z nichž 6 druhů bylo s velmi nízkou prevalencí. Jejich prevalence a intenzita tedy nemohla být statisticky hodnocena. Nalezené druhy *Trichodina* sp., *Gyrodactylus* sp. a *Ichthyobodo* sp. jsou běžnými parazity ryb (Todal a kol., 2004; Maciel a kol., 2018; Roohi a kol., 2019). *Trichodina* sp. parazituje jak na žábrách, tak i kůži ryb (Woo, 2006). To se potvrdilo i v našem pokusu, kde jsme našli *Trichodinu* sp. na žábrách i kůži všech ryb ve všech skupinách. Avšak u skupiny ryb, která byla vystavena kyselině peroctové, se nenašla na žábrách ani kůži ryb žádná *Trichodina* sp. Byl zaznamenán statisticky významný pokles ( $P < 0,05$ ) a úplná eliminace, a to za pouhé čtyři dny aplikace kyseliny peroctové. Abu-Elala a kol. (2021) pozorovali eliminaci *Trichodiny* sp. až po 7 dnech opakované aplikace kyseliny peroctové ( $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$   $2 \times$  denně) u *Oreochromis niloticus*. Z toho můžeme usuzovat, že kyselina perocotvá má vliv na *Trichodinu* sp. Je zajímavé, že došlo k úplnému vymizení *Ichthyobodo* sp. na žábrech stejných ryb, vystaveným kyselině peroctové. Vymizení *Ichthyobodo* sp. po aplikaci kyseliny peroctové pozorovali i Jaafar a kol. (2013), kteří doporučují aplikaci kyseliny peroctové u pstruha duhového. Snížení počtu *Ichthyobodo* sp. jsme pozorovali i u skupiny ryb, které byly vystaveny  $\text{H}_2\text{O}_2$ . To potvrzují i Russo a kol. (2007), kteří doporučují peroxid vodíku k léčbě *Ichthyobodo* sp., ale potvrzují, že peroxid vodíku v jejich studii byl neefektivní na léčbu *Trichodina* sp., a také *Gyrodactylus* sp., což v našem pokusu můžeme také částečně pozorovat. My jsme zaznamenali výskyt *Gyrodactylus* sp. jak na žábrách, tak i na kůži ryb, kde vzhledem k nízké počáteční prevalenci nelze efekt aplikace daných látek hodnotit.

## 6. Závěr

Hlavním cílem této práce bylo posoudit vliv dlouhodobých koupelí kyseliny peroctové a peroxidu vodíku na ryby. Obě dvě látky se jeví jako vhodné pro koupele ryb, neboť po sobě ve vodním prostředí nezanechávají žádná nebezpečná rezidua ani se nekumulují v rybím mase. Kapři obecní (*Cyprinus carpio*) byly vystaveny kyselině peroctové (skupina KPO -  $1,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), peroxidu vodíku (skupina  $\text{H}_2\text{O}_2$  -  $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a vodovodní vodě bez přídavku látek (skupina K) po dobu 4 dnů. K výměně vody a aplikaci látek docházelo vždy po 24 hodinách. Po skončení testu byl hodnocen vliv látek na hematologické (PCV, Hb, MCV, RBC, MCH a MCHC) a biochemické (GLU, ALB, TP, ALT, AST, ALP, LDH, PHOS, Ca, TRIG a GLOB) parametry a také bylo provedeno parazitologické a bakteriologické semikvantitativní hodnocení stěrů žaber a kůže ryb.

Hematologickým vyšetřením nebyly zjištěny žádné alarmující změny hodnot vyšetřovaných parametrů naznačující alteraci zdravotního stavu ryb. Jediný statisticky významný rozdíl ( $P < 0,05$ ) byl zaznamenán u středního objemu erytrocytu (MCV).

Biochemickým vyšetřením byly zjištěny statisticky významné rozdíly ( $P < 0,01$ ) GLU, ALT, ALP, PHOS a statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ) TRIG a GLOB. Změněné parametry stále byly v mezích fyziologických hodnot pro daný druh ryb.

Bakteriologické vyšetření ukázalo, že obě dvě látky mají statisticky významný ( $P < 0,05$ ) vliv na bakteriální osídlení kůže. Na bakteriální zatížení žaber však testované látky statisticky významný vliv neměly.

Parazitologické vyšetření ukázalo, že u skupiny ryb vystavených kyselině peroctové došlo k úplné eliminaci *Trichodiny* sp., zatímco u peroxidu vodíku nikoliv. U ostatních parazitů se dá hovořit pouze o určitých trendech, neboť počáteční prevalence byla nízká.

Na podkladě výsledků lze obě látky doporučit k dlouhodobým koupelím ryb, protože neohrozily fyziologické funkce ani zdraví ryb a příznivě působily na snížení bakteriálního a parazitárního zatížení ryb. U kyseliny peroctové můžeme hovořit o tom, že byly prokázány její antibakteriální a antiparazitární účinky. Zatímco u peroxidu vodíku byly prokázány pouze antibakteriální účinky.

## 7. Seznam použité literatury

- Abdelhalim, A. I., Lewis, J. W., Boxshall, G. A., 1991. The life-cycle of *Ergasilus sieboldi* Nordmann (Copepoda: Poecilostomatoida), parasitic on British freshwater fish. *Journal of Natural History*. 25(3), 559-582.
- Abdollahi, M., Hosseini, A., 2014. Formaldehyde. *Encyclopedia of Toxicology*. 653-656.
- Abu-Elala, N., Attia, M., Abd-Elsalam, R., Gamal, A., Younis, N., 2021. Peracetic acid treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora: Ichthyophthiriidae) and *Trichodina* spp. reduces the infection by *Aeromonas hydrophila* and improves survival in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 538, 1-9.
- Agrahari, S., Pandey, K. C., Gopal, K., 2007. Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 88(3), 268-272.
- Allen, P., 1994. Evaluation of a technique for sampling blood from small fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 107(2), 413-418.
- Arvin, E., Pedersen, L. F., 2015. Hydrogen peroxide decomposition kinetics in aquaculture water. *Aquacultural Engineering*. 64, 1-7.
- Bakke, T. A., Harris, P. D., Cable, J., 2002. Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans: observations on gyrodactylid monogeneans. *International Journal for Parasitology*. 32(3), 281-308.
- Barker, D., Cone, D., Burt, M., 2002. *Trichodina murmanica* (Ciliophora) and *Gyrodactylus pleuronecti* (Monogenea) parasitizing hatchery-reared winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): effects on host growth and assessment of parasite interaction. *Journal of Fish Diseases*. 25(2), 81-89.
- Barton, B. A., Iwama, G. K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*. 1, 3-26.
- Barton, B. A., Schrenck, C. B., Barton, L. D., 1987. Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2, 173-185.



- Basson, L., Van As, L., Fishelson, L., 1990. A new species of *Trichodina* (Ciliophora: Peritrichia) from the intestine of the surgeonfish *Acanthurus xanthopterus*. *International Journal for Parasitology*. 20(6), 785-787.
- Bhavan, P. S., Geraldine, P., 2001. Biochemical Stress Responses in Tissues of the Prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on Exposure to Endosulfan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 70(1), 27-41.
- Blažeković-Dimovska, D., Stojanovski, S., 2020. First record of *Apiosoma piscicola* (Blanchard, 1885) (Ciliophora: Epistylididae) in common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) (Pisces: Cyprinidae) from aquaculture facilities in North Macedonia. *Annals of Parasitology*. 66(2), 227-230.
- Block, S. S., 2001. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. 5th edition. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 1481 s.
- Buchmann, K., 2022. Control of parasitic diseases in aquaculture. *Parasitology*. 149(14), 1985-1997.
- Cable, J., Harris, P. D., 2002. Gyrodactylid developmental biology: historical review, current status and future trends: historical review, current status and future trends. *International Journal for Parasitology*. 32(3), 255-280.
- Cable, J., Tinsley, R. C., Harris, P. D., 2002. Survival, feeding and embryo development of *Gyrodactylus gasterostei* (Monogenea: Gyrodactylidae). *Parasitology*. 124(1), 53-68.
- Colombo, J. P., 1994. *Klinisch-chemische Urindiagnostik*. Labolife - Verlagsgemeinschaft, Rotkreuz Schweiz, 153s.
- Corliss, J. O., 1979. *The Ciliated protozoa: Characterization, Classification and Guide to the Literature*. Oxford: Pergamon Press, 455 s.
- Darwish, A. M., Griffin, B. R., Straus, D. L., Mitchell, A. J., 2002. Histological and Hematological Evaluation of Potassium Permanganate Exposure in Channel Catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*. 14(2), 134-144.
- Dezfuli, B. S., Giari, L., Konecny, R., Jaeger, P., Manera, M., 2003. Immunohistochemistry, ultrastructure and pathology of gills of *Abramis brama* from Lake Mondsee, Austria, infected with *Ergasilus sieboldi* (Copepoda). *Diseases of Aquatic Organisms*. 53, 257-262.
- Dubský, K., Kouřil, J., Šrámek, J., 2003. *Obecné rybářství*. Praha: Informatorium, 308 s.

- Duran, U., Çenesiz, S., Şahin, B., 2023. Blood Sampling Techniques and Preparing for Analysis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Black Sea Journal of Agriculture. 6(1), 1-6.
- Dvořák, P., Pyszko, M., Velišek, J., Dvořáková Lišková, Z., Andreji, J., 2020. Anatomie a fyziologie ryb. 2. aktualizované vydání. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 231 s.
- Eiras, J.C., Segner, H., Wahli, T., Kapoor, B. G., 2008. Fish Diseases. Vol. 1. Enfield, New Hampshire, U.S.A.: Science Publishers, 1338 s.
- Elia, A., Anastasi, V., Dörr, A., 2006. Hepatic antioxidant enzymes and total glutathione of *Cyprinus carpio* exposed to three disinfectants, chlorine dioxide, sodium hypochlorite and peracetic acid, for superficial water potabilization. Chemosphere. 64(10), 1633-1641.
- Ewing, M., Kocan, K., Ewing, S., 1983. *Ichthyophthirius multifiliis*: Morphology of the Cyst Wall. Transactions of the American Microscopical Society. 102(2), 122-128.
- Fazio, F., Saoca, C., Capillo, G., Iaria, C., Panzera, M., Piccione, G., Spanò, N., 2021. Intra-variability of some biochemical parameters and serum electrolytes in rainbow trout (Walbaum, 1792) bred using a flow-through system. Heliyon. 7(2), 1-5.
- Ferraz, E., Sommerville, C., 1998. Pathology of *Piscinoodinium* sp. (Protozoa: Dinoflagellida), parasites of the ornamental freshwater catfishes *Corydoras* spp. and *Brochis splendens* (Pisces: Callichthyidae): Dinoflagellida. Diseases of Aquatic Organisms. 33, 43-49.
- Folmar, L. C., 1993. Effects of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish: A bibliography and synopsis of selected effects. Environmental Toxicology and Chemistry. 12(2), 337-375.
- França, J. G., Paiva, M. J. T. R., Carvalho, S., Miashiro, L., Lombardi, J. V., 2011. Toxicity of the therapeutic potassium permanganate to tilapia *Oreochromis niloticus* and to non-target organisms *Ceriodaphnia dubia* (microcrustacean cladocera) and *Pseudokirchneriella subcapitata* (green microalgae). Aquaculture. 322-323, 249-254.
- Frimeth, J., 1994. General Procedures for Parasitology. American Fisheries Society. 1-7.
- Gaze, W., Wootten, R., 1998. Ectoparasitic species of the genus *Trichodina* (Ciliophora: Peritrichida) parasitising British freshwater fish. Folia Parasitologica. 45(3), 177-190.
- Gelnar, M., Whittigton, I., Chisholm, L., 1998. Preface – 3rd International Symposium on Monogenea. International Journal for Parasitology. 28, 1479-1480.

- Geus, A., 1960. Biologie des Fischpathogenen Dinoflagellater *Oodinium pillularis* Schaperclaus. Aquarien Terrarien Zoologica. (13), 305-306.
- Gomez, D., Sunyer, J. O., Salinas, I., 2013. The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. Fish & Shellfish Immunology. 35(6), 1729-1739.
- Grabda, J., 1963. Life cycle and morphogenesis of *Lernaea cyprinacea* L. Acta Parasitologica Polonica. 11, 169-198.
- Griffin, B. R., Davis, K. B., Darwish, A., Straus, D. L., 2002. Effect of Exposure to Potassium Permanganate on Stress Indicators in Channel Catfish *Ictalurus punctatus*. Journal of the World Aquaculture Society. 33(1), 1-9.
- Hartman, P., Regenda, J., 2016. Praktika v rybníkářství. 2. vydání. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 375 s.
- Hayward, C. J., Iwashita, M., Crane, J. S., Ogawa, K., 2001. First report of the invasive eel pest *Pseudodactylogyrus bini* in North America and in wild American eels. Diseases of Aquatic Organisms. 44, 53-60.
- Hlavová, V., 1993. Reference values of the haematological indices in grayling (*Thymallus thymallus* linnaeus). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology. 105(3), 525-532.
- Hochachka, P. W., Mommsen, T. P., 1995. Metabolic biochemistry. Elsevier, 515s.
- Holzer, A. S., Sommerville, C., Wootten, R., 2006. Molecular studies on the seasonal occurrence and development of five myxozoans in farmed *Salmo trutta* L. Parasitology. 132(2).
- Hossain, M., 2018. Biology of anchor worms (*Lernaea cyprinacea*). Journal of Entomology and Zoology Studies. 1(6), 910-917.
- Hushangi, R., Shekarabi, S. P. H., 2018. Effect of a Peracetic Acid-Based Disinfectant on Growth, Hematology and Histology of Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fishes. 3(1), 1-8.
- Chatterjee, A., Bhattacharya, R., Chatterjee, S., Saha, N., 2021. Lambda cyhalothrin induced toxicity and potential attenuation of hematological, biochemical, enzymological and stress biomarkers in *Cyprinus carpio* L. at environmentally relevant concentrations: A multiple biomarker approach. Comparative Biochemistry and Physiology. 250, 1-11.

- Chen, H., Luo, D., 2023. Application of haematology parameters for health management in fish farms. *Reviews in Aquaculture*. 15(2), 704-737.
- Chernyavskikh, S. D., Borodaeva, Z. A., Ostapenko, S. I., Galtseva, O. A., 2019. Blood protein spectrum in representatives of the fish superclass. *Eurasian Journal of Biosciences*. 13, 979-981.
- Chettri, J., Kuhn, J., Jaafar, R., Kania, P., Møller, O., Buchmann, K., 2014. Epidermal response of rainbow trout to *Ichthyobodo necator*: immunohistochemical and gene expression studies indicate a Th1-/Th2-like switch. *Journal of Fish Diseases*. 37(9), 771-783.
- Chupani, L., Stará, A., Velíšek, J., Zusková, E., 2014. Evaluation of the toxic effect of peracetic acid on grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) juveniles. *Neuroendocrinology Letters*. 35(2), 86-92.
- Innes Taylor, N., Ross, L. G., 1988. The use of hydrogen peroxide as a source of oxygen for the transportation of live fish. *Aquaculture*. 70(1-2), 183-192.
- Isaksen, T., Karlsbakk, E., Watanabe, K., Nylund, A., 2011. *Ichthyobodo salmonis* sp. n. (Ichthyobodonidae, Kinetoplastida), an euryhaline ectoparasite infecting Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Parasitology*. 138, 1164-1175.
- Jaafar, R. M., Kuhn, J. A., Chettri, J. K., Buchmann, K., 2013. Comparative Efficacies of Sodium Percarbonate, Peracetic Acid, and Formaldehyde for Control of *Ichthyobodo necator*—An Ectoparasitic Flagellate from Rainbow Trout. *Acta Ichthyologica Et Piscatoria*. 43(2), 139-143.
- Jinadasa, B.K.K.K., Elliott, C., Jayasinghe, G. D. T. M., 2022. A review of the presence of formaldehyde in fish and seafood. *Food Control*. 136, 1-8.
- Kaplan, L. A., Pesce, A. J., 1989. *Clinical Chemistry*. St. Louis: CV Mosby Company, 186 s.
- Karvonen, A., Rintamäki, P., Jokela, J., Tellervo Valtonen, E., 2010. Increasing water temperature and disease risks in aquatic systems: Climate change increases the risk of some, but not all, diseases. *International Journal for Parasitology*. 40(13), 1483-1488.
- Kitis, M., 2004. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review: a review. *Environment International*. 30(1), 47-55.
- Kolářová, J., Velíšek, J., 2012. Stanovení a vyhodnocení biochemického profilu krve ryb. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Fakulta rybářství a ochrany vod, 54 s.

- Kolářová, J., Zusková, E., Steinbach, C., Velíšek, J., 2017. Praktické návody k provádění vyšetřovacích a léčebných postupů u vybraných parazitárních onemocnění ryb. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 55 s.
- Kotob, M., Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Abdelzaher, M., El-Matbouli, M., 2017. The impact of co-infections on fish: a review. *Veterinary research*. 47(98), 1-12.
- Koyuncu, C., Dönmez, A., 2006. Mersin Bölgesinde Yetiştiriciliği Yapılan Bazı Akvaryum Balıkları (POECİLİDAE)'nda Rastlanılan *Lerna cyprinaceae* (Linnaeus, 1758) Enfeksiyonu. *Su Ürünleri Dergisi*. 23, 265-267.
- Kuperman, B., Matey, V., Barlow, S., 2002. Flagellate *Cryptobia branchialis* (Bodonida: Kinetoplastida), ectoparasite of tilapia from the Salton Sea. *Hydrobiologia*. (473), 93-102.
- Laniková, J., Mikula, P., Blahová, J., Tichý, F., Mareš, J., Enevová, V., Chmelová, L., Svobodová, Z., 2021. Sodium chloride bath - A cheap and safe tool for antiparasitic treatment of fish. *Veterinární medicína*. 66(12), 530-538.
- Lawrence, M. J., Raby, G. D., Teffer, A. K., Jeffries K. M., Danylchuk A. J., Eliason E. J., Hasler C. T., Clark T. D., Cooke S. J., 2020. Best practices for non-lethal blood sampling of fish via the caudal vasculature. *Journal of Fish Biology*. 97(1), 4-15.
- Lieke, T., Meinelt, T., Hoseinifar, S. H., Pan, B., Straus, D. L., Steinberg, C. E. W., 2020. Sustainable aquaculture requires environmental-friendly treatment strategies for fish diseases. *Reviews in Aquaculture*. 12(2), 943-965.
- Li, L., Desser, S., 1983. *Trichodina algonquinensis*, a new species of peritrich ciliate from Ontario freshwater fish, and observations on its transmission. *Canadian Journal of Zoology*. 61(5), 1159-1164.
- Li, M., Wang, J., Zhu, D., Gu, Z., Zhang, J., Gong, X., 2008. Study of *Apiosoma piscicola* (Blanchard 1885) occurring on fry of freshwater fishes in Hongze, China with consideration of the genus *Apiosoma*. *Parasitology Research*. 102(5), 931-937.
- Li, S., Liu, Y., Zhao, G., Li, J., Hou, J., Gao, M., Li, Y., 2006. Mechanism of blood coagulation in common carp (*Cyprinus carpio*). *Integrative Zoology*. 1, 117-121.
- Ling, F., Tu, X., Huang, A., Wang, G., 2016. Morphometric and molecular characterization of *Dactylogyrus vastator* and *D. intermedius* in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitology Research*. 115(5), 1755-1765.

- Liu, D., Straus, D. L., Pedersen, L. F., Meinelt, T., 2018. Periodic bacterial control with peracetic acid in a recirculating aquaculture system and its long-term beneficial effect on fish health. *Aquaculture*. 485, 154-159.
- Liu, H., Yang, J., Dong, X., Tan, B., Zhang, S., Chi, S., Yang, Q., Liu, H., Yang Y., 2020. Effects of different dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth, plasma biochemical indexes, digestive, and immune enzymes activities of sub-adult orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 46(4), 1409-1420.
- Lloret, J., Faliex, E., Shulman, G. E., Raga, J. A., Sasal, P., Muñoz, M., Casadevall, M., Ahuir-Baraja, A. E., Montero, F. E., Repullés-Albelda, A., Cardinale, M., Rätz, H. J., Vila, S., Ferrer, D., 2012. Fish Health and Fisheries, Implications for Stock Assessment and Management: The Mediterranean Example. *Reviews in Fisheries Science*. 20(3), 165-180.
- Lom, J., 1958. A Contribution to the Systematics and Morphology of Endoparasitic Trichodinids from Amphibians, with a Proposal of Uniform Specific Characteristics. *The Journal of Protozoology*. 5(4), 251-263.
- Lom, J., 1966. Sessiline peritrichs from the surface of some freshwater fishes. *Folia Parasitologica*. 1, 36-56.
- Lom, J., 1980. *Cryptobia branchialis* Nie from fish gills: ultrastructural evidence of ectocommensal function. *Journal of Fish Diseases*. 3(5), 427-436.
- Lom, J., Dyková, I., 1992. *Protozoan Parasites of Fishes: Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, Volume 26. 1. vydání. Elsevier Science, 316 s.
- Lom, J., Haldar, D., 1976. Observations on Trichodinids Endocommensal in Fishes. *Transactions of the American Microscopical Society*. 95(4), 527-541.
- Lusková, V., 1996. Annual Cycles and Normal Values of Hematological Parameters in Fishes. *Acta Scientiarum Naturalium Academiae Scientiarum Bohemicae Brno*. 31, 1-70.
- Maciél, P. O., Garcia, F., Chagas, E. C., Fujimoto, R. Y., Tavares-Dias, M., 2018. Trichodinidae in commercial fish in South America. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 28(1), 33-56.
- Mahoney, J., McNulty, J., 1992. Disease - associated blood changes and normal seasonal hematological variation in winter flounder in the Hudson - Raritan Estuary. *Transactions of the American Fisheries Society*. 12, 261-268.

- Máchová, J., Svobodová, Z., Svobodník, J., Piačka, V., Vykusová, B., Kocová, A., 1996. Persistence of malachite green in tissues of rainbow trout after a long-term therapeutic bath. *Acta Veterinaria Brno.* (65), 151-159.
- Mallatt, J., 1985. Fish Gill Structural Changes Induced by Toxicants and Other Irritants: A Statistical Review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 42(4), 630-648.
- Marchand, P. A., Phan, T. M., Straus, D. L., Farmer, B. D., Stüber, A., Meinelt, T., 2012. Reduction of in vitro growth in *Flavobacterium columnare* and *Saprolegnia parasitica* by products containing peracetic acid. *Aquaculture Research.* 43(12), 1861-1866.
- Masopust, J., 2000. *Klinická biochemie.* Praha: Karolinum, 429 s.
- Matthews, R., Matthews, B., Ekless, L., 1996. *Ichthyophthirius multifiliis*: observations on the life-cycle and indications of a possible sexual phase. *Folia Parasitologica.* (43), 203-208.
- Meinelt, T., Phan, T. M., Behrens, S., Wienke, A., Pedersen, L. F., Liu, D., Straus, D. L., 2015. Growth inhibition of *Aeromonas salmonicida* and *Yersinia ruckeri* by disinfectants containing peracetic acid. *Diseases of Aquatic Organisms.* 113(3), 207-213.
- Misăilă, C., Neacșu, I., Misăilă, E. R., Vasile, G., Atrenie, V., 2008. Modification of some biochemical parameters and of the concentration of some serum ions in *Cyprinus carpio* L. species grown under different sanitary-veterinary conditions. *Analele Științifice Ale Universității Alexandru Ioan Cuza din Iași, Secțiunea II A : Genetica și Biologie Moleculară.* 9, 35-42.
- Modrá, H., Svobodová, Z., Kolářová, J., 1998. Comparison of Differential Leukocyte Counts in Fish of Economic and Indicator Importance. *Acta Veterinaria Brno.* 67(4), 215-226.
- Monarca, S., Richardso, S., Feretti, D., Grotto, M., Thruston, A. D., Zani, C., Navazio, G., Ragazzo, P., Zerbini, I., Alberti, A., 2002. Mutagenicity and disinfection by-products in surface drinking water disinfected with peracetic acid. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 21(2), 309-318.
- Moravec, F., 2001. Checklist of the metazoan parasites of fishes of the Czech Republic and the Slovak Republic (1873-2000). Praha: Academia, 168 s.
- Murray, A. G., Peeler, E. J., 2005. A framework for understanding the potential for emerging diseases in aquaculture. *Preventive Veterinary Medicine.* 67(2-3), 223-235.
- Nanney, D. L., 1980. *Experimental ciliatology: An introduction to genetic and developmental analysis in ciliates.* New York: Wiley and Sons, 304 s.

- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 470/2009 ze dne 6. května 2009, kterým se stanoví postupy Společenství pro stanovení limitů reziduí farmakologicky účinných látek v potravinách živočišného původu.
- Nařízení Komise (EU) č. 37/2010 ze dne 22. prosince 2009 o farmakologicky účinných látkách a jejich klasifikaci podle maximálních limitů reziduí v potravinách živočišného původu.
- Nasir, N. A., Al-Sraji, A. Y. J., 2013. Effect of Different Dietary Protein and Fats on Some Biochemical Blood Parameters in Common Carp Fingerlings (*Cyprinus Carpio* L.) Reared in Float Cages. Asian Journal Experimental Biology Science. 4(2), 293-296.
- Navrátil, S., Svobodová, Z., Lucký, Z., 2000. Choroby ryb. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 155 s.
- Neff, J. M., 1985. Use of Biochemical Measurements to Detect Pollutant-Mediated Damage to Fish. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment. 155-183.
- Noga, E. J., 2000. Fish Disease Diagnosis and Treatment. Iowa, USA: Iowa State University Press, 543 s.
- Noga, E. J., 2011. Fish Disease: Diagnosis and Treatment. 2nd edition. USA: John Wiley, 518 s.
- Nur, F. M., Batubara, A. S., Fadli, N., Rizal, S., Siti-Azizah, M. N., Wilkes, M., Muchlisin, Z. A., 2022. *Lernaea cyprinacea* Linnaeus, 1758 (Copepoda: Lernaeidae) infection on *Betta rubra* Perugia, 1893 (Anabantiformes: Osphronemidae) from Aceh Province, Indonesia. Brazilian journal of veterinary parasitology. 31(1), 1-9.
- Oláh, J., Farkas, J., 1978. Effect of temperature, pH, antibiotics, formalin and malachite green on the growth and survival of *Saprolegnia* and *Achlya parastica* on fish. Aquaculture. 13(3), 273-288.
- Palíková, M., Piačková, V., Navrátil S., Zusková, E., Papežiková, I., Kolářová, J., Pojezdal, E., Dyková, I., Scholz, T., Gelnar, M., Svobodová, Z., Řehulková, E., Mareš, J., Modrá, H., Blažek, R., Veselý, T., 2019. Nemoci a chorobné stavy ryb. 1. vydání. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 462 s.
- Paperna, I., Van As, J., 1983. The pathology of *Chilodonella hexasticha* (Kiernik). Infections in cichlid fishes. Journal of Fish Biology. 23(4), 441-450.
- Pasternak, A., Mikheev, V., Valtonen, E., 2004. Growth and development of *Argulus coregoni* (Crustacea: Branchiura) on salmonid and cyprinid hosts. Diseases of Aquatic Organisms. 58, 203-207.



- Paulo, N., 2023. The Role of Fishery Biochemistry in Aquaculture. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*. 12, 1-2.
- Paul, T., Shukla, S. P., Kumar, K., Poojary, N., Kumar, S., 2019. Effect of temperature on triclosan toxicity in *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878): Hematology, biochemistry and genotoxicity evaluation. *Science of The Total Environment*. 668, 104-114.
- Payne, K. R., 1988. *Industrial Biocides*. New York, USA: Wiley and Sons, 126 s.
- Picón-Camacho, S., Leclercq, E., Bron, J., Shinn, A., 2012. The potential utility of the leopard pleco (*Glyptoperichthys gibbiceps*) as a biological control of the ciliate protozoan *Ichthyophthirius multifiliis*. *Pest Management Science*. 68, 557-563.
- Pimpão, C. T., Zampronio, A. R., Silva De Assis, H. C., 2007. Effects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 88(2), 122-127.
- Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J. L., Moon, T. W., 2012. Glucose metabolism in fish: a review. *Journal of Comparative Physiology B*. 182(8), 1015-1045.
- Poly, W. J., 2008. Global diversity of fishlice (Crustacea: Branchiura: Argulidae) in freshwater: Branchiura. *Hydrobiologia*. 595(1), 209-212.
- Rahman, M. M., 1995. Some aspects of the biology of a freshwater fish parasite, *Argulus foliaceus* (L.) (Argulidae, Branchiura, Crustacea). *Bangladesh Journal of Zoology*. 23, 77-86.
- Rach, J. J., Schreier, T. M., Redman, S. D., 1997. Effect of species, life stage, and water temperature on the toxicity of hydrogen peroxide to fish. *The Progressive Fish Culturist*. 59, 41-46.
- Rastiannasab, A., Afsharmanesh, S., Rahimi, R., Sharifian, I., 2016. Alternations in the liver enzymatic activity of Common carp, *Cyprinus carpio* in response to parasites, *Dactylogyrus* spp. and *Gyrodactylus* spp. *Journal of Parasitic Diseases*. 40(4), 1146-1149.
- Reed, P., Francis-Floyd, R., Klinger, R. E., 2009. *Monogenean Parasites of Fish*. Fisheries and Aquatic Sciences. University of Florida, 28, 1-4.
- Roberts, R. J., 2012. *Fish Pathology*. 4th ed. Blackwell Publishing Ltd., 590 s.
- Rogers, W. A., 1968. Eight New Species of *Gyrodactylus* (Monogenea) from the Southeastern U.S. with Redescriptions of *G. fairporti* Van Cleave, 1921, and *G. cyprini* Diarova, 1964. *The Journal of Parasitology*. 54(3).

- Roohi, J. D., Asl, A. D., Pourkazemi, M., Shamsi, S., 2019. Occurrence of dactylogyrid and gyrodactylid Monogenea on common carp, *Cyprinus carpio*, in the Southern Caspian Sea Basin. *Parasitology International*. 73, 1-6.
- Russo, R., Curtis, E. W., Yanong, R. P. E., 2007. Preliminary Investigations of Hydrogen Peroxide Treatment of Selected Ornamental Fishes and Efficacy against External Bacteria and Parasites in Green Swordtails. *Journal of Aquatic Animal Health*. 19(2), 121-127.
- Rusthon-Mellor, S. K., 1992. Discovery of the fish louse, *Argulus japonicus* Thiele (Crustacea: Branchiura), in Britain. *Aquaculture and Fisheries Management*. 32, 269-271.
- Sala-Rabanal, M., Sánchez, J., Ibarz, A., Fernández-Borràs, J., Blasco, J., Gallardo, M. A., 2003. Effects of low temperatures and fasting on hematology and plasma composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 29(2), 105-115.
- Santos, R. F. B., Dias, H. M., Fujimoto, R. Y., 2012. Acute toxicity and histopathology in ornamental fish amazon bluespotted corydora (*Corydoras melanistius*) exposed to formalin. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 84(4), 1001-1007.
- Sellose, P. M., Rowland, S. J., 1990. Use of common salt to treat ichthyophthiriasis in Australian warmwater fishes. *Progress Fish Cult*. 2(52), 124-127.
- Shafiq, A., Abbas, F., Hafeez-Ur-Rehman, M., Khan, B. N., Aihetasham, A., Amin, I., Hmidullah, Mothana, R. A., Alharbi, M. S., Khan, I., Khalil, A. A. K., Ahmad, B., Mubeen, N., Akram, M., 2023. Parasite Diversity in a Freshwater Ecosystem. *Microorganisms*. 11(8), 1-16.
- Shäperclaus, W., 1951. Der Colisa-Parasit, ein Krankheitserreger bei Aquarienfischen. *Die Aquarien und Terrarien Zeitschrift*. (4), 169-171.
- Shariff, M., 1983. Occurrence of *Chilodonella hexasticha* (Kiernik, 1909) (Protozoa: Ciliata) on big carp *Aristichthys nobilis* (Richardson) in Malaysia. *Tropical Biomedicine*. (1), 69-75.
- Shinn, A. P., Pratoomyot, J., Bron, J. E., Paladini, G., Brooker, E. E., Brooker, A. J., 2015. Economic costs of protistan and metazoan parasites to global mariculture. *Parasitology*. 142(1), 196-270.
- Schreier, T. M., Rach, J. J., Howe, G. E., 1996. Efficacy of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride on fungal-infected rainbow trout eggs. *Aquaculture*. 140(4), 323-331.
- Speare, D. J., Carvajal, V., Horney, B. S., 1999. Growth Suppression and Branchitis in Trout Exposed to Hydrogen Peroxide. *Journal of Comparative Pathology*. 120(4), 391-402.

- Stammer, J., 1959. Beiträge zur Morphologie, Biologie und Bekämpfung der Karpfenläuse. Zeitschrift für Parasitenkunde. 19, 135-208.
- Stoskopf, M. K., 1993. Fish Medicine. USA: W. B. Saunders Company, 882 s.
- Straus, D., Meinelt, T., Liu, D., Pedersen, L., 2018. Toxicity of Peracetic Acid to Fish: Variation among Species and Impact of Water Chemistry: Variation among Species and Impact of Water Chemistry. Journal of the World Aquaculture Society. 49(4), 715-724.
- Sudová, E., Máchová, J., Svobodová, Z., Veselý, T., 2007. Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. Veterinární medicína. 52(12), 527-539.
- Sula, E., Aliko, V., Pagano, M., Faggio, C., 2020. Digital light microscopy as a tool in toxicological evaluation of fish erythrocyte morphological abnormalities. Microscopy Research and Technique. 83(4), 362-369.
- Svobodová, Z., Kolářová, J., Navrátil, S., Veselý, T., Chloupek, P., Tesarčík, J., Čítek, J., 2007. Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb. 4. přepracované vydání. Praha: Informatorium, 264 s.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Modrá, H., 2012. Metody hematologického vyšetřování ryb. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 38 s.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Paláčková, J., 1986. Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb. Vodňany: Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, 36 s.
- Tavares-Dias, M., 2021. Toxic, physiological, histomorphological, growth performance and antiparasitic effects of copper sulphate in fish aquaculture. Aquaculture. 535, 1-29.
- Tavares-Dias, M., 2022. Toxicity, physiological, histopathological, handling, growth and antiparasitic effects of the sodium chloride (salt) in the freshwater fish aquaculture. Aquaculture Research. 53(3), 715-734.
- Tavolga, W., Nigrelli, R. F., 1947. Studies on *Costia Necatrix* (Henneguy). Transactions of the American Microscopical Society. (66), 366-378.
- Thompson, S., Kirkegaard, D., Jahn, T. L., 1946. *Scyphidia ameiuri*, n.sp. peritrichous ciliate from the gills of the bullhead *Ameiurus melas melas*. Transactions of the American Microscopical Society. 116, 315-317.

- Thoney, D. A., Hargis, W. J., 1991. Monogenea (platyhelminthes) as hazards for fish in confinement. *Annual Review of Fish Diseases*. 1, 133-153.
- Todal, J. A., Karlsbakk, E., Isaksen, T. E., Plarre, H., Urawa, S., Mouton, A., Hoel, E., Koren, C. W. R., Nylund, A., 2004. *Ichthyobodo necator* (Kinetoplastida)-a complex of sibling species. *Diseases of Aquatic Organisms*. 58, 9-16.
- Valtonen, E., Koskivaara, M., Brummer-Korvenkontio, H., 1987. Parasites of fishes in central Finland in relation to environmental stress. *Biology Research Report University of Jyvaeskylae*. 10, 129-130.
- Van As, J., Basson, L., 1996. An endosymbiotic trichodinid, *Trichodina rhinobatae* sp. n. (Ciliophora: Peritrichia) found in the lesser guitarfish, *Rhinobatos annulatus* Smith, 1841 (Rajiformes: Rhinobatidae) from the South African coast. *Acta Protozoologica*. 35(1), 61-67.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Piačková, V., Novotný, L., Bláhová, J., Sudová, E., Malý, V., 2008. Effects of metribuzin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinární medicína*. 53(6), 324-332.
- Volf, P., Horák, P., Čepička, I., Flegr, J., Lukeš, J., Mikeš, L., Svobodová, M., Vávra, J., Votýpka, J., 2007. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton, 318 s.
- Vyhláška č. 344/2008 Sb. o používání, předepisování a výdeji léčivých přípravků při poskytování veterinární péče.
- Walker, P., Harris, J., Van Der Veld, G., Wendelaar Bonga, S., 2008. Differential host utilisation by different life history stages of the fish ectoparasite *Argulus foliaceus* (Crustacea: Branchiura). 55, 141–149.
- Walmsley, R. N., Watkinson, L. R., Koay, E. S. C., 1992. *Cases In Chemical Pathology: A Diagnostic Approach*. 3th edition. Singapore: World Scientific Publishing, 464 s.
- Wang, Z., Bourland, W., Zhou, T., Yang, H., Zhang, C., Gu, Z., 2020. Morphological and molecular characterization of two *Trichodina* (Ciliophora, Peritrichia) species from freshwater fishes in China. *European Journal of Protistology*. 72, 1-15.
- Weber, E., Govett, P., 2009. *Parasitology and Necropsy of Fish*. Compendium. 31, 1-7.
- Witeska, M., Kondera, E., Lugowska, K., 2010. The effects of ichthyophthiriasis on some haematological parameters in common carp. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*. 34(3), 267-271.

- Witeska, M., Kondera, E., Ługowska, K., Bojarski, B., 2022. Hematological methods in fish – Not only for beginners. *Aquaculture*. 547, 1-17.
- Witeska, M., Ługowska, K., Kondera, E., 2016. Reference values of hematological parameters for juvenile *Cyprinus carpio*. *Bulletin European Association of Fish Pathologists*. 36(4), 1-12.
- Woo, P. T. K., 2006. *Fish Diseases and Disorders: Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections* Second Edition. 2. vydání. London: CABI Publishing, 791 s.
- Xu, D., Shoemaker, C., Martins, M., Pridgeon, J., Klesius, P., 2012. Enhanced susceptibility of channel catfish to the bacterium *Edwardsiella ictaluri* after parasitism by *Ichthyophthirius multifiliis*. *Veterinary Microbiology*. 158(1-2), 216-219.
- Yakhnenko, V., Klimenkov, I., Sudakov, N., Belyshenko, A., Glyzina, O., Mamontov, A., Sapozhnikova, Y., Sukhanova, L., 2016. Morphofunctional peculiarities of erythrocytes in wild and farmed Coregonid fishes from Lake Baikal. *Contemporary Problems of Ecology*. 9(2), 219-228.
- Yang, J. L., Chen, H. C., 2003. Effects of gallium on common carp (*Cyprinus carpio*): acute test, serum biochemistry, and erythrocyte morphology. *Chemosphere*. 53(8), 877-882.
- Yanong, R. P. E., 2008. *Use of Hydrogen Peroxide in Finfish Aquaculture*. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida: Gainesville. 1-6.
- Yin, Z., Lam, T. J., Sin, Y. M., 1995. The effects of crowding stress on the non-specific immuneresponse in fancy carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology*. 5(7), 519-529.
- Yousaf, M. N., Powell, M. D., 2012. The Effects of Heart and Skeletal Muscle Inflammation and Cardiomyopathy Syndrome on Creatine Kinase and Lactate Dehydrogenase Levels in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *The Scientific World Journal*. 2012, 1-9.
- Zákon č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon) ve znění pozdějších předpisů.

## 8. Abstrakt

### Možnosti léčby smíšených infekcí ryb

Onemocnění ryb mohou být jedním z faktorů zpomalující současný rozvoj akvakultury. Častými původci nemocí jsou patogenní bakterie a paraziti. Cílem práce bylo otestovat vliv kyseliny peroctové (KPO) a peroxidu vodíku ( $H_2O_2$ ) na hematologické a biochemické ukazatele a dále na bakteriální a parazitární zatížení ryb. Kapři obecní (*Cyprinus carpio* L.) byli vystaveni KPO ( $1,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a  $H_2O_2$  ( $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) po dobu 4 dní. Po skončení testu byla rybám odebrána krev pro stanovení hematologických a biochemických ukazatelů a byly provedeny stěry žaber a kůže pro bakteriální a parazitologické vyšetření. Hematologicky byly stanoveny: hematokrit (PCV), množství hemoglobinu (Hb), střední počet erytrocytů (RBC), střední objem erytrocytu (MCV), hemoglobin erytrocytu (MCH) a střední barevná koncentrace (MCHC). Z krevní plazmy byly hodnoceny následující biochemické ukazatele: množství glukózy (GLU), celkové bílkoviny (TP), albuminy (ALB), alanin aminotransferáza (ALT), aspartát aminotransferáza (AST), alkalická fosfatáza (ALP), laktát dehydrogenáza (LDH), anorganický fosfát (PHOS), vápník (Ca), triglyceridy (TRIG) a globuliny (GLOB).

Hematologickým vyšetřením byl zjištěn statisticky významný rozdíl pouze u středního objemu erytrocytu ( $P < 0,05$ ), kdy došlo ke zvýšení MCV u testovaných látek. Biochemické vyšetření ukázalo statisticky významné ( $P < 0,01$ ) zvýšení hodnot GLU, ALT, ALP a PHOS. U TRIG došlo ke statisticky významnému ( $P < 0,05$ ) zvýšení pouze u skupiny ryb vystavených  $H_2O_2$ . Poslední statisticky významný ( $P < 0,05$ ) rozdíl byl zjištěn u GLOB, kdy u skupiny ryb vystavených KPO došlo ke snížení a u ryb vystavených  $H_2O_2$  ke zvýšení. Bakteriologickým vyšetřením byl zjištěn statisticky významný ( $P < 0,05$ ) rozdíl ve snížení počtu bakterií na kůži ryb u obou testovaných látek. Parazitologickým vyšetřením byl zjištěn statisticky významný ( $P < 0,05$ ) vliv KPO na výskyt *Trichodina* sp., kdy došlo k úplné eliminaci těchto parazitů jak na kůži, tak i na zábrách.

Výsledky ukázaly, že hematologické a biochemické ukazatele byly oproti kontrole změněny jen velmi mírně. Lze usuzovat, že aplikace KPO a  $H_2O_2$  v testovaných koncentracích organismus ryb příliš nezatíží. Také bylo potvrzeno, že KPO má antibakteriální i antiparazitární účinky, zatímco  $H_2O_2$  má pouze antibakteriální účinky.

**Klíčová slova:** kyselina peroctová, peroxid vodíku, parazitární onemocnění, bakteriální vyšetření, kapr obecný, koupele

## 9. Abstract

### Treatment options for mixed fish infections

Fish diseases can be one of the factors slowing down the current development of aquaculture. Frequent causes of these diseases are pathogenic bacteria and parasites. The aim of this study was to test the effects of peracetic acid (PAA) and hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) on haematological and biochemical indicators as well as on the bacterial and parasitic load in fish. Common carp (*Cyprinus carpio* L.) were exposed to PAA ( $1.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) for a period of 4 days. After the test ended, blood was collected from the fish to determine haematological and biochemical indicators, and swabs from gills and skin were taken for bacterial and parasitological examination. Haematologically, the following were determined: haematocrit (PCV), haemoglobin content (Hb), mean erythrocyte count (RBC), mean erythrocyte volume (MCV), erythrocyte haemoglobin (MCH), and mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC). From the blood plasma, the following biochemical indicators were assessed: glucose (GLU), total protein (TP), albumin (ALB), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH), inorganic phosphate (PHOS), calcium (Ca), triglycerides (TRIG), and globulins (GLOB).

The haematological examination showed a statistically significant difference only in the mean erythrocyte volume ( $P < 0.05$ ), with an increase in MCV for the tested substances. Biochemical examination revealed statistically significant ( $P < 0.01$ ) increases in GLU, ALT, ALP, and PHOS levels. In TRIG, a statistically significant increase ( $P < 0.05$ ) occurred only in the group of fish exposed to  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The last statistically significant ( $P < 0.05$ ) difference was observed in GLOB, with a decrease in the group of fish exposed to PAA and an increase in those exposed to  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Bacteriological examination showed a statistically significant ( $P < 0.05$ ) difference in the reduction of bacterial counts on the skin of the fish for both tested substances. Parasitological examination revealed a statistically significant ( $P < 0.05$ ) effect of PAA on the occurrence of *Trichodina* sp., leading to the complete elimination of these parasites on both the skin and gills.

The results showed that the haematological and biochemical indicators were only slightly altered compared to the control. It can be inferred that the application of PAA and  $\text{H}_2\text{O}_2$  at the tested concentrations does not significantly stress the fish organism. It was also confirmed that PAA has antibacterial and antiparasitic effects, while  $\text{H}_2\text{O}_2$  has only antibacterial effects.

**Key words:** peracetic acid, hydrogen peroxide, parasitic diseases, bacterial examination, common carp, baths