

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Diplomová práce

**Testování účinnosti vybraných antiparazitik na metacerkárie
motolice oční (*Diplostomum spathaceum*) u amura bílého
(*Ctenopharyngodon idella*).**

Autor: Bc. Jarmila Michálková

Vedoucí diplomové práce: MVDr. Eliška Zusková, PhD.

Konzultantka diplomové práce: MSc. Latifeh Chupani

Studijní program a obor: N4103 – Zootechnika, Rybářství

Forma studia: prezenční

Ročník: 3.

České Budějovice 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz, provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 5. 5. 2017

.....

Jarmila Michálková

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce MVDr. Elišce Zuskové, PhD., za možnost pracovat na tomto zajímavém tématu. Především však za její trpělivost, vstřícnost a poskytnutí volnosti během praktické i písemné části práce. Mé konzultantce MSc. Latifeh Chupani za pomoc při statistickém vyhodnocení výsledků, Bc. Petru Dobrovolnému, Dis. a Ing. Marii Šandové za pomoc během praktické části práce, Ing. Zdeňku Ipserovi za fotodokumentaci, podnětné připomínky a rady v průběhu práce a Bc. Janu Fialovi za kontrolu typografie. Dále pak patří můj velký dík mé rodině a všem přátelům, i včetně těch výše jmenovaných, za psychickou podporu a poskytnuté zázemí během tvorby této diplomové práce.

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jarmila MICHÁLKOVÁ**
Osobní číslo: **V14N005P**
Studijní program: **N4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Testování účinnosti vybraných antiparazitik na metacerkárie motolice oční (*Diplostomum spathaceum*) u amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*)**
Zadávající katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

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

Cílem práce je posoudit účinnost vybraných antiparazitik - praziquantelu (PQ) a mebendazolu (MB) na amury bílé (*Ctenopharyngodon idella*) infikované metacerkáriemi motolice oční (*Diplostomum spathaceum*). Na podkladě zjištěných výsledků pak navrhnout nejpříjemnější aplikační schéma daného přípravku využitelného v rybářské praxi. Dalším cílem je posoudit a porovnat výhody a nevýhody aplikace daných použitých antiparazitik.

Metodický postup: Infikované ryby motolicí oční budou rozděleny do 4 skupin. Z toho 2 skupinám bude podáváno medikované krmivo s různou koncentrací PQ, jedné skupině krmivo s obsahem MB a poslední skupina bude sloužit jako kontrolní. Ryby budou v pravidelných intervalech parazitologicky vyšetřovány a bude hodnocena intenzita a prevalence sledované infekce v porovnání s kontrolní neléčenou skupinou. Medikovaným rybám bude dále po parazitologickém vyšetření odebrán vzorek svaloviny a jater určený pro stanovení reziduí dané látky. Určování reziduí bude provedeno následovně: K přibližně 0,5 g vzorku (svalu nebo jater) v Eppendorfově zkumavce bude přidán vnitřní standard, extrakční činidlo (acetonitril a isopropanol, 1:1) a homogenizační kulička. Vzorek bude homogenizován (1800/min; 10 min) a centrifugován (9600 x g; 10 min; 4 °C). Supernatant bude dále filtrován (celulózový filtr; 0,45 μm) a uložen do mrazáku do -20 °C na 24 hod. Poté bude supernatant vyndán, rozmražen a znovu centrifugován. Alikvótní podíl bude odpipetován do vialek. Koncentrace antiparazitik v dané tkáni pak bude měřena kapalinovou chromatografií s hybridní tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/HRMS).

Rozsah grafických prací: **podle potřeby s ohledem na získané podklady**
Rozsah pracovní zprávy: **50-70 stran**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Treves-Brown, K. M., 2000. Applied Fish Pharmacology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 310 s.

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

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

Svobodová, Z., Faina, R., 1992. Prevence Diplostomózy ryb, Edice Metodik VÚRH č. 41, 12 s.

Szekely, C., Molnar, K., 1991. Praziquantel (droncit) is effective against Diplostomosis of grasscarp *Ctenopharyngodon idella* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. Diseases of Aquatic Organisms 11, 147- 150 s.

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

Datum zadání diplomové práce: **19. října 2015**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2016**


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

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


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 19. října 2015

Obsah:

1. Úvod	8
2. Literární řešerše	9
2.1. Obecná charakteristika motolic.....	9
2.2. Charakteristika motolic rodu <i>Diplostomum</i>	9
2.2.1. Životní cyklus rodu <i>Diplostomum</i>	10
2.2.2. Vliv <i>Diplostomum spathaceum</i> na rybího hostitele	13
2.3. Charakteristika modelového organismu-Amur bílý (<i>Ctenopharyngodon idella</i>) ...	14
2.4. Trematodózy	16
2.4.1. Diplostomóza	17
2.4.1.1. Klinické příznaky onemocnění	17
2.4.1.2. Diagnostika onemocnění.....	18
2.4.1.3. Preventivní opatření	18
2.4.1.4. Léčba onemocnění	20
2.5. Antiparazitika ve veterinární medicíně	20
2.6. Vybraná antiparazitika (antihelminatika)	23
2.6.1. Praziquantel (PQ).....	23
2.6.2. Mebendazol (MB).....	26
3. Metodika	28
3.1. Místo pokusu.....	28
3.2. Experimentální ryby.....	28
3.3. Design pokusu	29
3.4. Medikovaná krmná směs a způsob aplikace testované látky	29
3.5. Kontrolní parazitologické vyšetření	32
3.6. Vyhodnocení dat	35
3.6.1. Grafické vyhodnocení.....	35
3.6.2. Statistické vyhodnocení.	35
4. Výsledky	36
4.1. Testování účinnosti praziquantelu na infekci způsobenou metacerkáriemi <i>Diplostomum spathaceum</i>	36
4.2. Testování účinnosti mebendazolu na infekci způsobenou metacerkáriemi <i>Diplostomum spathaceum</i>	40

5. Diskuse	43
5.1. Testování účinnosti praziquantelu na infekci způsobenou metacerkáriemi <i>Diplostomum spathaceum</i>	43
5.2. Testování účinnosti mebendazolu na infekci způsobenou metacerkáriemi <i>Diplostomum spathaceum</i>	45
6. Závěr	47
7. Seznam použité literatury	48
8. Seznam zkratk	59
9. Abstrakt	60
10. Abstract	61

1. Úvod

Motolice způsobují celou řadu závažných onemocnění u člověka, domácích, hospodářských i volně žijících zvířat včetně ryb (Galaktionov *et* Dobrovolský, 2003; Volf *et* Horák, 2007; Noga, 2010). Velmi závažnou trematodózou u ryb je diplostomóza, způsobená motolicí oční (*Diplostomum spathaceum*) ve stádiu metacerkárie, která napadá oční čočku a způsobuje poškození rybí obsádky a s tím spojené velké ekonomické ztráty chovatelům (Svobodová *et al.*, 2007). Preventivní opatření u této infekce je ztížené vlivem složitého vývojového cyklu, v němž ryba figuruje pouze jako mezipřenositel (Chappell *et al.*, 1994). Aplikace antiparazitik v průběhu léčby tedy hraje klíčovou roli v ekonomice chovu ryb.

V současnosti však nejsou k dispozici žádná registrovaná antiparazitika speciálně zacílená proti motolicím u ryb v České republice. Velmi často tak chovatelé k léčbě ryb používají necílená endoparazitika určená primárně pro jiné druhy zvířat, která nejsou dostatečně ověřená na rybách (Kolářová *et* Nepejchalová, 2015; Zusková *et al.*, 2015).

Z tohoto důvodu jsme se rozhodli ověřit účinnost dvou vybraných antiparazitik (praziquantelu a mebendazolu). Praziquantel byl vybrán pro svou účinnost prokázanou v celé řadě studií zabývajících se léčbou helmintóz u ryb (Williams *et al.*, 2007; Iles *et al.*, 2012; Shirakashi *et al.*, 2012). Mebendazol, jako benzimidazolový derivát, byl zvolen pro svou účinnost na hlístice zažívacího traktu a vybrané motolice hospodářských zvířat (Martins *et al.*, 2001; Dayan, 2003; Chagas *et al.*, 2016).

Práce má tedy za cíl posoudit účinnost vybraných antiparazitik – praziquantelu (PQ) a mebendazolu (MB) na amury bílé (*Ctenopharyngodon idella*) infikované metacerkáriemi motolice oční (*Diplostomum spathaceum*). Na podkladě zjištěných výsledků pak navrhnout nejvhodnější aplikační schéma daného přípravku využitelného v rybářské praxi. Dalším cílem je posoudit a porovnat výhody a nevýhody aplikace jednotlivých použitých antiparazitik.

2. Literární rešerše

2.1. Obecná charakteristika motolic

Motolice (Trematoda: Digenea) jsou velmi rozsáhlou a významnou skupinou parazitických plochých červů (Platyhelminthes: Neodermata) s velkým množstvím lékařsky i veterinárně významných taxonů. Do současnosti bylo popsáno více než 25 000 taxonů, jejichž zástupce lze nalézt ve sladkovodních i mořských ekosystémech téměř po celém světě (Kearn, 1998; Esch *et al.*, 2001; Galaktionov *et* Dobrovolský, 2003; Roberts *et* Janovy, 2005). I přes velkou diverzifikaci této skupiny lze uvést některé společné charakteristické znaky. Jejich těla jsou většinou dorzoventrálně zploštělá, podélně oválovitá až lístkovitá, opatřená dvěma přísavkami sloužícími k přichycení. Povrch těla motolic je tvořen tegumentem, jež slouží k absorpci výživných látek, přestože hlavní absorpční funkce připadá na střevo (Kearn, 1998; Roberts *et* Janovy, 2005). Celá skupina je také charakteristická složitými vývojovými životními cykly, zahrnujícími řadu ontogenetických stádií, které ke svému vývoji nejčastěji využívají dva až tři hostitele. Prvními mezihostiteli bývají zpravidla měkkýši (Molusca) s výjimkou krevních parazitů ryb čeledi Aporocotylidae využívající mnohoštětinatce a některých mořských zástupců, jejichž prvním mezihostitelem jsou kroužkovci (Polychaeta). Druhým mezihostitelem může být jakýkoli taxon z říše živočichů. Třetím definitivním hostitelem se stávají obratlovci nejčastěji ze tříd ryb a ptáků. U některých skupin motolic (Schistosomatidae, Fasciolidae a Notocotilidae) může být životní cyklus zkrácený o druhého mezihostitele (Esch *et al.*, 2001; Combes *et al.*, 2002; Galaktionov *et* Dobrovolský 2003; Volf *et* Horák, 2007). I přes tyto společné znaky poplatné pro všechny druhy motolic můžeme uvést také řadu významných odlišností v morfologii či ekologii (Cribb *et al.*, 2003). Velká rozmanitost je patrná ve tvaru a velikosti těla (pohybuje se od stovek mikrometrů až po několik centimetrů), v rozmístění několika přísavek, v místech lokalizace infekce, v projevech onemocnění či výskytu parazitů (Esch *et al.*, 2002; Roberts *et* Janovy, 2005; Svobodová *et al.*, 2007).

2.2. Charakteristika motolic rodu *Diplostomum*

Motolice rodu *Diplostomum* Nordmann, 1832 (Diplostomidae), do kterého se řadí i motolice oční *Diplostomum spathaceum* (Rudolphi, 1819) je široce, téměř kosmopolitně

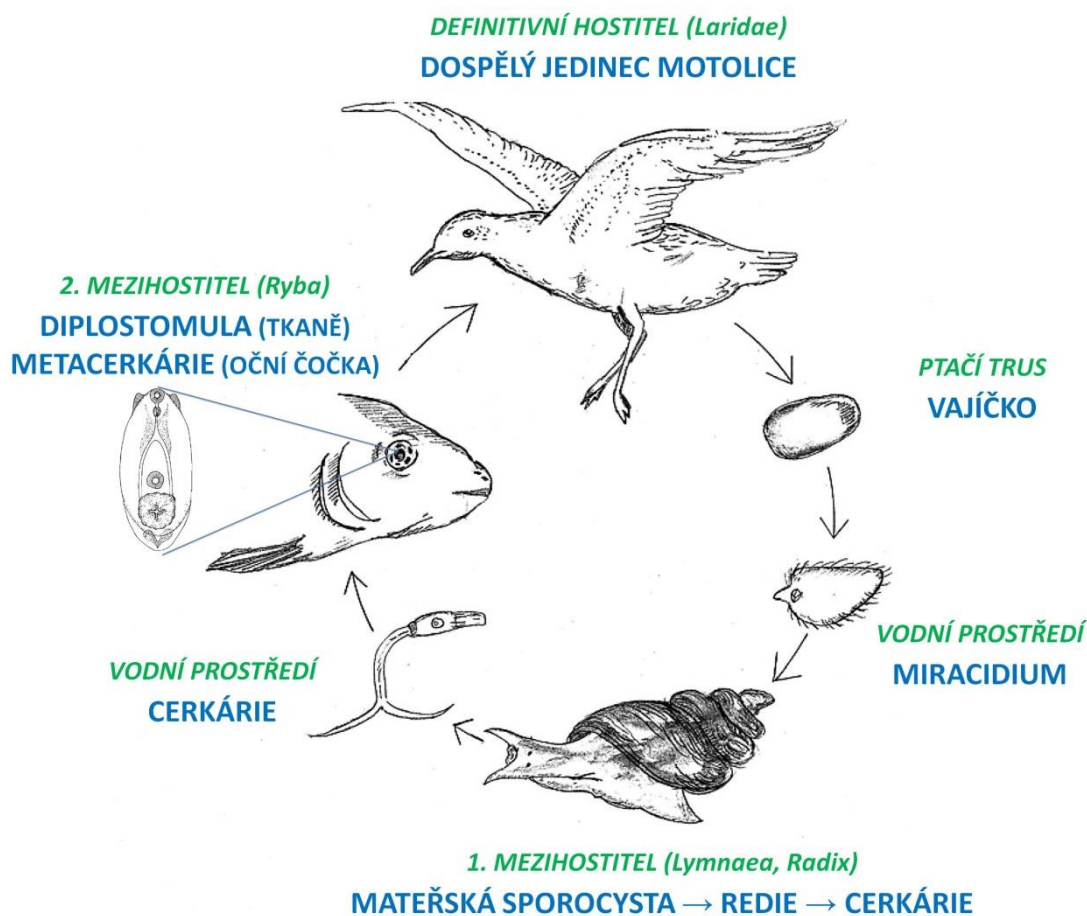
rozšířenou skupinou parazitů, čítající okolo třiceti druhů (Niewiadomska *et* Laskowski, 2002). Výskyt je zmapován především v Eurasii a Severní Americe (Höglund *et* Thulin, 1992; Marcogliese *et al.*, 2001; Niewiadomska *et* Laskowski, 2002; Locke *et al.*, 2010; Blasco-Costa *et al.*, 2014; Aksenova *et al.*, 2016). Taxonomie tohoto rodu je dosti nejasná, jelikož je velmi obtížné tyto druhy od sebe odlišit pouze na základě morfologie. Některé druhy mají totiž zcela nepatrné morfologické rozdíly mezi jednotlivými vývojovými stádii, což způsobuje značné potíže v jejich identifikaci (Niewiadomska *et* Laskowski, 2002). Především ve fázi metacerkárie – larválního stádia, které má jednoduchou morfologii bez jasných rozdílů mezi taxony (Niewiadomska, 1986). Životní cykly jsou také velmi podobné (Niewiadomska *et* Laskowski, 2002), složené ze dvou mezihostitelů a jednoho definitivního hostitele (Chappell *et al.*, 1994). Z těchto důvodů byly v minulosti po celé Evropě motolice rodu *Diplostomum*, nalezené v očních čočkách ryb, plošně označovány za motolici oční (*Diplostomum spathaceum*), i přesto že se v některých případech jednalo o jiný druh (Niewiadomska, 1986). Například druhy *D. paracaudum* a *D. spathaceum* nemají mezi sebou žádné viditelné morfologické rozdíly ve stádiu výskytu v definitivním hostiteli. Tato podobnost může být příčinou toho, že *D. paracaudum* v tomto definitivním hostiteli nebyl pozorován, přestože jsou cercárie tohoto druhu u mezihostitelských plžů častější než *D. spathaceum* (Niewiadomska, 1987). Pro přesnou determinaci druhu je tedy velmi vhodné využít molekulárních analýz, jež dokáží přesně určit druh v jakémkoli vývojovém stádiu parazita (Locke *et al.*, 2010; Rellstab *et al.*, 2011; Georgieva *et al.*, 2013; Brabec *et al.*, 2015; Aksenova *et al.*, 2016).

2.2.1. Životní cyklus rodu *Diplostomum*

Vývojový cyklus všech druhů rodu *Diplostomum* (Obr. 1) má nepřímý vícehostitelský charakter tvořený dvěma mezihostiteli (plžem a rybou) a jedním definitivním hostitelem (rybožravým ptákem) z čeledi Laridae (Chappell *et al.*, 1994). Definitivní hostitel má ve svém tenkém střevě dospělé jedince daného rodu motolice, kteří se pohlavně množí a produkují vajíčka. Ty jsou pak spolu s trusem uvolňovány do vodního prostředí. Vlivem příznivých teplotních, světelných a chemických podmínek se z vajíček líhnou obrvené larvy (miracidia), které přežívají pouze 24–48 hodin, nepřijímají potravu, ale aktivně se pohybují a vyhledávají prvního mezihostitele (McKeown *et* Irwin, 1995). Aktivní pohyb jim umožňují cilie (jemné vláknité výrůstky)

na povrchu těla a díky očním skvrnám a chemickým receptorům jsou schopny identifikovat přesně svého prvního mezihostitele, kterým se stává vodní plicnatý plž – plovatka – *Lymnaea stagnalis*, *Lymnaea peregra* (podle nové klasifikace *Radix peregra*) nebo *Radix auricularia* (McKeown *et Irwin*, 1995; Georgieva *et al.*, 2013). Miracidium se aktivně přes pokožku dostává do vnitřních orgánů plovatky, kde napadá převážně hepatopankreat. Při tomto procesu dochází k odhození cilií a z miracidia se stává mateřská sporocysta, která nemá střevo a příjem živin uskutečňuje pomocí tělního tegumentu. Po čase začne mateřská sporocysta produkovat redie, které na rozdíl od ní mají trávicí soustavu s vakovitým střevem a aktivně se živí tkání mezihostitele a zároveň přijímají živiny celým povrchem těla (Hoffman, 1999; Volf *et Horák*, 2007). Tyto redie se velmi rychle a intenzivně nepohlavně množí a vytváří tak denně až desetitisíce cercárií (Karvonen *et al.*, 2004a; Seppälä *et al.*, 2008), které aktivně opouští tělo plže a vyhledávají druhého mezihostitele, kterým se stávají sladkovodní druhy ryb (Chappell, 1995). Takto vzniklé cercárie (podle morfologického dělení označované jako furkocercárie) se skládají z tělní části (základ pro budoucí dospělou motolici, nesoucí charakteristické znaky, jakými jsou např. přísavky) a ocásku, sloužícímu k pohybu (Volf *et Horák*, 2007). Aktivita a životaschopnost cercárií je ovlivněna časem (než najdou druhého mezihostitele) a teplotou vody (Lyholt *et Buchmann*, 1996; Karvonen *et al.*, 2003). Cercárie totiž opouští plovatky až při teplotě vody nad 10 °C a se zvyšující se teplotou se zvyšuje i počet uvolněných cercárií a jejich aktivita (Valtonen *et Gibson*, 1997). Největší množství cercárií se uvolňuje při teplotě vody nad 18 °C, kdy je popisována i jejich nejvyšší aktivita (18–22 °C). Životaschopnost cercárií je udávána okolo dvou dní, přičemž se snižuje s klesající teplotou a dobou pobytu mimo tělo plže (Svobodová *et Faina*, 1992). Do krevního oběhu druhého mezihostitele (ryby) se cercárie dostávají skrz pokožku a žaberní lístky (Svobodová *et al.*, 2007). Během tohoto procesu ztrácejí cercárie ocásek a mění se na diplostomuly, které jsou zaneseny krví do oka, kde se usadí v kortikální oblasti oční čočky (Ratanarat-Brockleman, 1974; Shariff *et al.*, 1980; Whyte *et al.*, 1991; Volf *et Horák*, 2007). V oční čočce dochází k růstu a změně diplostomuly na metacercárii, jejíž velikost se pohybuje okolo 0,4–0,5 mm (Čítek *et al.*, 1997). Přeměna diplostomuly v metacercárii v oční čočce trvá okolo 45 dní při teplotě vody mezi 13–15 °C, a při teplotě vyšší, mezi 18–20 °C je vývoj dokončen už za 30 dní (Svobodová *et Faina*, 1992). Metacercárie jsou dlouhověké, neencystované a svým výskytem a působením v oční čočce mohou způsobit vznik mléčného zakalení, čímž se čočka stává neprůhlednou. Tento proces může vést až k

oslepnutí ryb (Shariff *et al.*, 1980; Karvonen *et Seppälä* 2008). Na začátku jsou totiž metacerkárie lokalizovány pouze v povrchových vrstvách čočky pod jejím pouzdrem, následně prostupují do vlastní hmoty čočky, kde svým pohybem vytváří malé laguny. Pokud je čočka masivně napadena parazity (60–100 kusů a více) dochází k mléčnému zakalení. Dále může také docházet k odloupení sítnice, nadzvednutí pouzdra čočky, změnám ve velikosti a povrchu čočky, narušení rohovky, vytlačení oka z očníce až úplné slepotě (Svobodová *et Faina*, 1992; Svobodová *et al.*, 2007). Takto vzniklé metacerkárie se do definitivního hostitele snaží dostat skrze cílenou změnu chování napadeného mezihostitele. Zvyšují riziko jeho predace a tím i procento možného přenosu parazita a dokončení vývojového cyklu. Proces ovlivňování však nastává až v případě, že je parazit zcela schopen úspěšně nakazit definitivního hostitele. To dokládá i studie Seppälä *et al.* (2005a), jež uvádí, že metacerkárie začínají vytvářet výrazné mléčné zakalení oční čočky až po dokončení svého vývoje. Pokud se parazitu podaří dostatečně zmanipulovat mezihostitele a ten je následně sežrán rybožravým ptákem, dochází poté pomocí trávicích enzymů v trávicím traktu k uvolnění parazitů z oční čočky a jejich usazení v tenkém střevě. Zde metacerkárie pohlavně dozrávají a začínají produkovat vajíčka a celý cyklus se opakuje (Chappell *et al.*, 1994).



Obr. 1: Vývojový cyklus motolice oční (*Diplostomum spathaceum*). Zelený text – stanoviště, modrý text – vývojové stádium motolice (podle Karvonen *et al.*, 2005; upravila Michálková, J.).

2.2.2. Vliv *Diplostomum spathaceum* na rybiho hostitele

Vývojová stádia *Diplostomum spathaceum* ovlivňují a způsobují poškození ryb hned několika způsoby. V místech kde do organismu proniká cercárie, dochází k lokálnímu zčervenání kůže nebo drobným krváceninám na žábrách a často se zde rozvíjí bakteriální infekce (Svobodová *et Faina*, 1992; Pylkkö *et al.*, 2006). Během migrace cercárie organismem, v podobě diplostomuly, jsou poškozovány cévy a vnitřní orgány (Svobodová *et Faina*, 1992). Konečným stádiem v rybím hostiteli je metacerkárie, která především poškozuje tkáň oční čočky (Svobodová *et Faina*, 1992; Svobodová *et al.*, 2007). Metacerkárie svou lokalizací významně zhoršují zrak, orientaci v prostoru a vytváří změny v potravním a antipredačním chování, což má za následek snížený příjem

potravy, zpomalení růstu a ovlivnění celkové kondice jedince (Crowden *et* Broom, 1980; Shariff *et al.*, 1980; Owen *et al.*, 1993; Buchmann *et* Uldal, 1994; Karvonen *et al.*, 2004b; Seppälä *et al.*, 2004; Voutilainen *et al.*, 2008). Vlivem zákalu oční čočky se snižuje množství světla dopadajícího na sítnici, což způsobuje u napadených jedinců změnu ve vnímání okolního prostředí. To se jim jeví jako tmavší, než ve skutečnosti je, což má za následek, že takto napadené ryby tmavnou, vlivem přizpůsobování se tomuto zdánlivě tmavšímu prostředí (Rintamäki-Kinnunen *et al.*, 2004; Seppälä *et al.*, 2005b). Ryby se také častěji vyskytují u hladiny, jelikož dávají přednost prosvětleným vodám, kde jsou však snadnější kořisti pro rybožravé ptáky (Crowden *et* Broom, 1980). Podle studie Seppälä *et al.* (2004) je také ovlivněna jejich úniková rychlost v porovnání se zdravými rybami.

2.3. Charakteristika modelového organismu– Amur bílý (*Ctenopharyngodon idella*)

Amur bílý (*Ctenopharyngodon idella*) Valenciennes, 1844 se řadí do čeledi Cyprinidae. Původní areál rozšíření tohoto druhu je východní Asie (Čína, Rusko). V současnosti je rozšířen téměř po celém světě, především díky úspěšné umělé reprodukci. Na našem území se jedná o nepůvodní druh, poprvé vysazený do našich rybníků v roce 1961 (Baruš *et* Oliva, 1995). Tento druh je teplomilný a vyskytuje se v nižších polohách (Dubský *et al.*, 2003). Obývá střední a dolní úseky řek, údolní nádrže, rybníky či říční ramena (Dubský *et al.*, 2003; Hanel *et* Lusk, 2005). Amur vykazuje vysokou odolnost vůči poklesu obsahu rozpuštěného kyslíku ve vodě (0,5–0,9 mg.l⁻¹), zakalení vody a zároveň toleruje i vyšší salinitu (11–12 ‰), což mu umožňuje přežít i v brakických vodách (Baruš *et* Oliva, 1995; Hanel *et* Lusk, 2005).

Tělo má protáhlé, válcovité, ze strany mírně zploštělé, pokryté relativně velkými a pevně přisedlými cykloidními šupinami (mimo břišní oblast jsou na zadním okraji temně lemovány). Hlavu širokou, shora zploštělou, plynule přecházející v trup. Oči nízko posazené po stranách hlavy, se zlatavou oční duhovkou. Ústa bezvousá, koncová a široká. U dvouřadých požerákových zubů jsou typické černě vroubkované koncové plošky s pilovitými okraji sloužícími k drcení tvrdých porostů. Výstelka tělní dutiny je načernalá. Hřbetní část těla má tmavě olivově zelenou barvu, boky jsou se stříbřitým (vegetační období) nebo zlatitým zabarvením (podzim a zima). Břicho je světlé, hřbetní a řitní ploutve krátké. Hřbetní ploutev má hnědozelenou, prsní ploutve žlutošedou,

břišní světlou barvu se slabě hnědozeleným nádechem, řitní a ocasní jsou temně zelenohnědé (Hanel *et Lusk*, 2005).

Jedná se o typickou hejnovou rybu vyskytující se v celém vodním sloupci (Dubský *et al.*, 2003). Je poměrně plachá, při vyrušení vyskakuje vysoko nad hladinu (Hanel *et Lusk*, 2005). Nejvyšší pohybová a potravní aktivita byla zaznamenána při teplotě vody 20–28 °C (Baruš *et Oliva*, 1995; Dubský *et al.*, 2003; Hanel *et Lusk*, 2005). Plůdek se zprvu živí jemným zooplanktonem, zoobentosem a řasami a následně přijímá makrovegetaci (Dubský *et al.*, 2003). Rychlost růstu závisí na teplotě vody a dostupnosti potravy. V případě zajištění optimálních teplotních a potravních podmínek je amur schopen ve věku 5–6 let dosáhnout hmotnosti 18–20 kg (Baruš *et Oliva*, 1995). Průměrně se dožívá 15 let (Dubský *et al.*, 2003).

V našich podmínkách nedochází k přirozenému výtěru (Hanel *et Lusk*, 2005; Hartman *et Regenda*, 2014). Tato typická reofilní ryba podniká v předvýtěrovém období ve své domovské oblasti poměrně dlouhé migrace (Dubský *et al.*, 2003) a je u ní patrný pohlavní dimorfismus – jikernačky mají objemnější břišní partii a mlíčáci zdrsňelou pokožku na prsních ploutvích (Baruš *et Oliva*, 1995). U mlíčáků je typická více fázová tvorba spermatu. Jikry jsou šedivé, nelepivé, silně bobtnavé a vznášející se ve vodním sloupci, díky vyššímu obsahu tuku (Baruš *et Oliva*, 1995; Hartman *et Regenda*, 2014). Amur je též pelagofilním druhem (Dubský *et al.*, 2003).

Tento doplňkový druh ryby je nejčastěji vysazován v polykulturních obsádkách s kaprem či línem, na potlačení rozvoje makrovegetace a tím pádem zvýšení přirozené produkce v rybníce. V monokultuře je amur chován ve většině případů jen jako plůdek (Hartman *et Regenda*, 2014).

Tato hospodářsky ceněná ryba však může být také napadena celou řadou parazitů z kmene Protozoa (prvoci) – *Apiosoma piscicola* (Blanchard, 1885), *Balantidium ctenopharyngodoni* (Chen, 1955), *Cryptobia branchialis* (Nie, 1956), *Epistylis lwoffii* (Fauré-Fremiet, 1943), *Eimeria saurogobii* (Chen, 1964), *Hemiophrys branchiarum* (Wenrich, 1924), *Chilodonella cyprini* (Moroff, 1902), *Chloromyxum cristatum* (Léger, 1906), *Chloromyxum cyprini* (Fujita, 1927), *Ichthyobodo necator* (Henneguy, 1883), *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876), *Myxobolus pseudodispar* (Gorbunova, 1936), *Spironucleus elegans* (Lavie, 1936), *Trichodina acuta* (Lom, 1961), *Trichodina pediculus* (O.F.Müller, 1786), *Trichodinella epizootica* (Raabe, 1950), *Trichophrya*

piscium (Bütschli, 1889), *Tripartiella copiosa* (Lom, 1959). Monogenea (žábrolísti) – *Dactylogyrus lamellatus* (Achmerow, 1952), *Dactylogyrus ctenopharyngodonis* (Achmerow, 1952), *Dactylogyrus vistulae* (Prost, 1957), *Gyrodactylus* sp., *Diplozoon paradoxum* (Nordmann, 1832). Trematoda (motolice) – metacerkárie – *Rhipidocotyle illense* (Ziegler, 1883), *Diplostomum spathaceum* (Rudolphi, 1819), *Posthodiplostomum cuticola* (Nordmann, 1832), *Apharyngostrigea cornu* (Zeder, 1800), *Metagonimus yokogawai* (Katsurada, 1912). Cestoda (tasemnice) – *Bothriocephalus acheilognathi* (Yamaguti, 1934), larvy: *Ligula intestinalis* (Linnaeus, 1758), *Gryporhynchus cheilancristrotus* (Wedl, 1855). Nematoda (hlístice) – *Pseudocapillaria tomentosa* (Dujardin, 1843). Acanthocephala (vrtejší) – *Pomphorhynchus laevis* (Müller, 1776), *Neoechinorhynchus rutili* (Müller, 1780). Hirudinea (pijavice) – *Piscicola geometra* (Linnaeus, 1761). Copepoda (klanonožci) – *Ergasilus sieboldi* (Nordmann, 1832), *Lernaea ctenopharyngodontis* (Yin, 1960) a Branchiura (kapřivci) – *Argulus foliaceus* (Linnaeus, 1758) (Baruš *et* Oliva, 1995).

Plůdek amura je především velmi citlivý na výskyt tasemnice *Bothriocephalus acheilognathi*, jejímž mezihostitelem jsou buchanky, skrz které se může plůdek snadno nakazit již na začátku své exogenní výživy, což může vést k ucpaní lumenu střeva a následnému úhynu obsádky (Hartman *et* Regenda, 2014). Velká citlivost je také vůči výskytu motolice *Diplostomum spathaceum*, jejímž mezihostitelem jsou plovatky, které způsobují velké potíže rybám a ekonomické ztráty chovatelům (Crowden *et* Broom, 1980; Shariff *et al.*, 1980; Owen *et al.*, 1993; Buchmann *et* Uldal, 1994; Karvonen *et al.*, 2004b; Seppälä *et al.*, 2004; Voutilainen *et al.*, 2008; Hartman *et* Regenda, 2014; Zusková *et al.*, 2015).

2.4. Trematodózy

Infekční onemocnění způsobené helminty ze třídy Trematoda jsou souhrnně nazývány trematodózy. Mezi závažná onemocnění vyskytující se v našich podmínkách u ryb můžeme zařadit sanguinikolózu, u níž ryba představuje definitivního hostitele a parazit se v ní vyskytuje jako dospělec a diplostomózu, způsobenou larválním stádiem parazita a ryba zde vystupuje v roli mezihostitele. Méně častými onemocněními jsou postodiplostomóza, vyvolaná metacerkáriemi motolice *Posthodiplostomum cuticola*, parazitujícími v kůži a podkoží ryb a vyvolávající tzv. černou skvrnitost. Ta je

způsobena nahromaděním velkého množství melaninu v podkoží. Další významnou trematodózou ryb z hlediska zoonotického potenciálu je metagonimóza, jejíž metacerkárie lze nalézt encystované převážně v šupinách různých druhů ryb. Poškození ryb touto infekcí není tak závažné, významný je však možný přenos na člověka (Svobodová *et al.*, 2007).

2.4.1. Diplostomóza

Jedná se o velmi časté onemocnění volně žijících ryb, při kterém je oční čočka napadena parazity rodu *Diplostomum*. Podle studie Niewiadomska *et Laskowski* (2002) může být jedna oční čočka napadena metacerkáriemi hned několika druhů z rodu *Diplostomum* současně. Larvální stádium – metacerkárie daného druhu motolice se v jedinci vyvíjí a ovlivňuje daného jedince. Toto onemocnění je běžné převážně u lososovitých a býložravých druhů ryb chovaných v rybnících. Nejnáchylnější k napadení jsou především juvenilní stádia těchto druhů. Silné napadení tímto parazitem bylo zjištěno u síha peledě (*Coregonus peled*), síha severního marény (*Coregonus maraena*) a kaprovce velkoustého (*Ictiobus cyprinellus*). Z hospodářsky významných druhů prokázal největší odolnost proti této nemoci lín obecný (*Tinca tinca*) (Svobodová *et Faina*, 1992; Svobodová *et al.*, 2007).

2.4.1.1. Klinické příznaky onemocnění

Juvenilní stádia ryb bývají neklidná a mají drobná, ale viditelná poranění na kůži a žábřácích. K úhynu dochází pouze výjimečně u velmi masivního napadení (tzv. akutní diplostomózy) mladých jedinců. V počátku napadení oční čočky metacerkáriemi bývají příznaky nevýrazné (Shariff *et al.*, 1980; Svobodová *et al.*, 2007). Je patrné poškození zraku a tmavé zbarvení silně napadených ryb, především pstruhů (Rintamäki-Kinnunen *et al.*, 2004; Seppälä *et al.*, 2005b). V průběhu onemocnění se začíná objevovat mléčné zakalení oční čočky (parazitární zákal oční čočky), dislokace čočky (umístění čočky mimo optickou osu oka), změny její velikosti a tvaru, exoftalmie (vytlačení oka z očníce), slepota, změna rychlosti růstu a úbytek hmotnosti, což může vést až ke smrti jedince (Shariff *et al.*, 1980; Svobodová *et Faina*, 1992; Svobodová *et al.*, 2007).

2.4.1.2. Diagnostika onemocnění

Diagnóza se stanovuje na základě vyšetření oční čočky a nálezu metacerkárií. Před samotným vyšetřením se ryba usmrtí. Oko se vyšetří adspekcí (pohledem) a následně je z oka vyjmuta oční čočka, která se umístí mezi dvě podložní sklíčka a postupným zvyšováním tlaku na sklíčko se čočka komprimuje a vytvoří se tzv. kompresní preparát, který se mikroskopuje, popřípadě sleduje pomocí binolupy. Vyšetřují se vždy obě oči a zaznamenává se počet metacerkárií v každém z nich (Svobodová *et Faina*, 1992; Karvonen *et al.*, 2004c).

2.4.1.3. Preventivní opatření

U většiny nemocí ryb spočívá prevence v pravidelných kontrolách zdravotního stavu jedinců, u diplostomózy tomu není jinak. V případě výskytu motolic ve větším množství, je žádoucí přerušit vývojový cyklus parazita. Jednou možností je eliminace definitivních hostitelů (rybožravých ptáků) v místě chovu ryb, což v současnosti není možné podle ustanovení § 5a odst. 1 zákona č. 114/1992 Sb., O ochraně přírody a krajiny, ve znění pozdějších předpisů. Proto se přistupuje k používání ochranných sítí na pstruhových rybnících, sloužících k omezení náletů těchto ptáků (Semenas, 1998; Svobodová *et al.*, 2007), není tím však zcela eliminována možnost přenosu trusem. Druhou variantou je eliminace potencionálních mezihostitelů (plovatek) hned několika způsoby: mechanickou, fyzikální, chemickou či biologickou cestou. Avšak ani jedna z uváděných metod není dostatečně účinná sama o sobě, proto se doporučuje jednotlivé metody kombinovat (Svobodová *et al.*, 2007).

Mechanická metoda spočívá v pravidelném odstraňování plovatek z rybochovných rybníků, nádrží a objektů a zabránění jejich opětovnému návratu. Toto lze provést umístěním uhelony (v případě rybochovných objektů) a sítí z drátěného pletiva (v případě rybníků) na přítok. Tato síta jsou v rybnících umístěna po celou dobu odchovu ryb a je nutné je pravidelně kontrolovat a čistit, neboť i plovatky zachycené na sítěch jsou schopné uvolňovat cercárie (Svobodová *et Faina*, 1992; Semenias, 1998; Svobodová *et al.*, 2007). Pískové filtry a bubnové filtry s mikrosítami používané v rybochovných zařízeních mohou také zmírnit průnik plovatek do systému a výrazně zpomalit průchod cercárií, což následně může vést ke snížení schopnosti invadovat rybího mezihostitele. Žádný z těchto filtrů však není schopen zachytit 100 % cercárií

(Svobodová *et Faina*, 1992; Field *et Irwin* 1994; Larsen *et al.*, 2005). V případě bubnového filtru se doporučuje použít mikrosíto o velikosti ok 32 mikrometrů, jež v laboratorních podmínkách dokázalo zadržet až 99 % cercárií (Larsen *et al.*, 2005).

Fyzikální metoda spočívá v důkladném vysušení a vymrznutí dna rybníků a nádrží, což se provádí v zimním období (Svobodová *et Faina*, 1992; Semenas, 1998; Svobodová *et al.*, 2007).

Chemický způsob likvidace se dá provést s využitím preparátů s moluskocidními účinky. Zásah se provádí na jaře, kdy se napustí rybník z jedné třetiny až poloviny vodou, přičemž je nutné, aby bylo zatopeno celé rybníční dno, následně dojde k uvolnění plovatek ze dna rybníka a je aplikován moluskocid. V minulosti se hojně používala celá řada moluskocidních přípravků na bázi mědi, cínu, či organických sloučenin fosforu či pálené vápno (Svobodová *et Faina*, 1992). Například při likvidaci plovatky bahenní (*Lymnaea stagnalis*) se používal moluskocidní přípravek Kuprikol 50 v dávce 30 kg.ha⁻¹ při průměrné hloubce 1 metr (Svobodová *et al.*, 2007). Mnohé z těchto moluskocidních preparátů jsou však dnes považovány za látky pro zdraví nebezpečné a nakládání s nimi je značně omezeno nebo zcela zakázáno podle ustanovení § 39 zákona č. 254/2001 Sb., O vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon).

Poslední používanou metodou v boji proti plovatkám je metoda biologická. V našich podmínkách lze použít kapra K₂ o hmotnosti nad 500 g nebo lína L₃ při hustotě obsádky 500–600 ks.ha⁻¹, který je schopen likvidovat malé juvenilní plovatky (Svobodová *et al.*, 2007). Dále se jako přirozený predátor osvědčil amur černý ve věku tří až pěti let, u kterého byla podle studie Ben-Ami *et Heller* (2001) prokázána schopnost likvidace měkkýšů až o 66 % v závislosti na množství predátorů a přirozených úkrytů měkkýšů v prostředí. Hlavním preventivním opatřením diplostomózy u akvariálních ryb je zamezení přenosu plovatek z přírody do akvárií. Vlivem zvýšení teploty by totiž mohlo dojít k masivnímu uvolnění cercárií a následné diplostomóze (Svobodová *et al.*, 2007).

Plošné preventivní podávání antiparazitik hospodářským druhům ryb se neprovádí, z důvodu vzniku možné rezistence na použitá antiparazitika (zejm. praziquantel) hojně využívaná k léčbě závažnějších onemocnění u člověka (Ismail, 1999; Zusková, 2016 in verb).

2.4.1.4. Léčba onemocnění

V minulosti se léčba diplostomózy v rybářské praxi neprováděla (Svobodová *et Faina*, 1992). V současnosti se ke snížení výskytu metacerkárií *Diplostomum spathaceum* v oční čočce ryb doporučuje podávání antiparazitika praziquantelu, buď perorální aplikací ve formě medikované krmné směsi (Noga, 1995; Svobodová *et al.*, 2007; Zusková *et al.*, 2015) nebo pomocí léčebných koupelí (Noga, 2010).

Medikovaná krmná směs se doporučuje podávat v množství 50 mg PQ.kg⁻¹ hmotnosti obsádky podle studie Bylund *et Sumari* (1981) provedené u pstruhů a vranek, či podávat jednorázové dávky 330 mg PQ.kg⁻¹ hmotnosti obsádky podle studie Székely *et Molnár* (1991) provedené u amura a tolstolobika. Ve studii Zusková *et al.*, 2015 se uvádí, že nejvhodnější aplikační schéma k dosažení úplného vymizení *D. spathaceum* u amura bílého ve venkovních podmínkách je podání 6× 50 mg PQ.kg⁻¹ hmotnosti obsádky (obden), čtrnáct dní pauza a opět podání 6× 50 mg PQ.kg⁻¹ hmotnosti obsádky. Celková dávka tedy činí 600 mg PQ.kg⁻¹ hmotnosti obsádky.

Pro aplikaci praziquantelu pomocí léčebné koupele se doporučuje prozpustit 10 mg praziquantelu v jednom litru vody a ryby do této lázně ponořit na jednu hodinu. Podle studie Székely *et Molnár* (1991) tak dojde k eliminaci více než 90 % metacerkárií *D. spathaceum* u amura bílého a tolstolobika bílého. Nebo připravit lázeň o koncentraci 1 mg PQ.l⁻¹ vody a ryby v ní ponechat 90 hodin, zde má podle studie Székely *et Molnár* (1991) dojít se 100% odstranění metacerkárií *D. spathaceum* u amura bílého a tolstolobika bílého. V jiné studii, provedené na sumečkovi tečkovaném se doporučuje připravit lázeň obsahující 2 mg PQ.l⁻¹ vody a ryby v ní ponechat po dobu 2 a 4 hodin, léčbu je však třeba opakovat po dobu 21 dní, což podle studie Plumb *et Rogers* (1990) zajistí eliminaci 86 % metacerkárií *D. spathaceum* v případě dvouhodinové lázně a 90 % metacerkárií *D. spathaceum* u čtyřhodinové lázně.

2.5. Antiparazitika ve veterinární medicíně

Jedná se o látky, které lze využít při léčbě onemocnění či preventivních opatřeních. Pro efektivní léčbu je však důležité znát životní cyklus a biologii parazita a správně diagnostikovat onemocnění na základě klinických příznaků a vyšetření.

Antiparazitika můžeme rozdělit na endoparazitika (působící proti vnitřním parazitům), ektoparazitika (působící proti vnějším parazitům) a endektoparazitika (látky působící na vnější i vnitřní parazity zároveň). Antiparazitika mohou díky svému účinku působit na specifické enzymy parazitů nebo na enzymy, které jsou pro parazity nezbytné. Tyto enzymy však nemusí být zcela nezbytné pro hostitelský organismus. Antiparazitika mohou rovněž ovlivňovat biochemické pochody v těle parazita a působit na jeho energetický metabolismus či neuromuskulární aparát (Riviere *et* Papich, 2009; Lamka *et* Ducháček, 2014).

Způsob podání antiparazitik se u jednotlivých zvířat liší. U ryb přichází v úvahu tři způsoby aplikace léčebné látky. Perorální aplikaci (podání léčebné látky ústy) je možné provést podáváním medikované krmné směsi obsahující dané antiparazitikum nebo zavedením daného antiparazitika pomocí jícnové sondy do gastrointestinálního traktu (GIT) (Svobodová *et al.*, 2007; Sudová *et al.*, 2009; Sudová *et al.*, 2010). Perorální aplikace se používá především při léčbě endoparazitóz. V současnosti však na našem trhu není žádný registrovaný medikovaný premix obsahující dané antiparazitikum pro ryby. Z tohoto důvodu se pro výrobu medikované krmné směsi používají buď premixy s povolenou výjimkou Státní veterinární správy ČR a Ústavu pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv dle § 46 odst. 1 zákona č. 378/2008 Sb., O léčivech, jakým je v současnosti např. Prazicest (s účinnou látkou praziquantel, vyráběný společností Pharmagal s.r.o, Slovensko), nebo veterinární lékař na vlastní zodpovědnost aplikuje léčbu „off label“ tedy s užitím léčiva pro jiný druh zvířete či jinou indikaci nebo léčivo humánní (Kolářová *et* Nepejchalová, 2015). Hlavní výhodou podání antiparazitika perorální cestou ve formě medikované krmné směsi je, že nedochází k nadměrnému stresu ryb a tento způsob je vcelku nenáročný. Hlavní nevýhoda však spočívá v tom, že je téměř nemožné zajistit rovnoměrnou distribuci medikované krmné směsi všem rybám v obsádce. Snazší tomu je u lososovitých druhů ryb, které jsou schopné přijímat medikovanou krmnou směs ihned u hladiny, na rozdíl od kaprovitých ryb, jež přijímají potravu ze dna. Často se také stává, že ryby vlivem onemocnění přijímají potravu jen v omezeném množství či trpí nechutenstvím (Noga, 2010; Kolářová *et* Nepejchalová, 2015). Podání antiparazitika pomocí jícnové sondy se téměř neprovádí. Hlavní nevýhodou totiž je náročné vpravení připraveného antiparazitika do GIT ryb, při kterém dochází k nadměrnému stresu ryb vlivem manipulace. Díky tomu, je tento způsob spíše vhodný k experimentálním účelům a z časového hlediska jej lze

uplatnit jen u malého počtu ryb (Svobodová *et al.*, 2007). Injekční aplikaci lze provést intramuskulárně (vpravením léčebné látky do svalu) a subkutánně (vpravením léčebné látky do podkoží). Tohoto způsobu aplikace se využívá především v chovu lososovitých ryb (Noga, 2010). Hlavní výhodou totiž je, že ryba dostane přesné množství léčebné látky. Avšak tato metoda je manuálně i časově náročná a může vést ke stresu a poškození ryb (Svobodová *et al.*, 2007; Noga, 2010). Další způsob aplikace antiparazitik je pomocí léčebných koupelí ryb, kdy jsou ryby vystaveny koncentraci daného antiparazitika rozpuštěného ve vodě (Treves-Brown, 2000). Tato aplikace se provádí zejména při léčbě ektoparazitóz, kdy látka působí na infekci na žábách a kůži. A zároveň dochází ke vstřebávání účinné látky přes kůži a žábry do těla ryby, kde tato látka působí jako endoparazitikum. Hlavní výhodou této jednoduché a finančně nenáročné metody je to, že je možné takto ošetřit velké množství napadených ryb a zajistit rovnoměrnou distribuci účinné látky (Kolářová *et Nepejchalová*, 2015).

Proces vstřebávání účinné látky, může být tedy buď ze střeva, žaludku, podkoží či přes kůži do krevního řečiště a orgánů. Metabolizace látky probíhá většinou v játrech a vylučování je močí a trusem (Riviere *et Papich*, 2009; Lamka *et Ducháček*, 2014).

Antiparazitika můžeme také rozdělit do několika skupin podle cílového parazita, na kterého působí. Antiprotozoika (působící na jednobuněčné parazity), antitrematoda (proti motolicím), anticestoda (proti tasemnicím), antinematoda (proti oblym červům). Komplexně můžeme poslední tři jmenované označit jako antihelminatika (Riviere *et Papich*, 2009; Lamka *et Ducháček*, 2014).

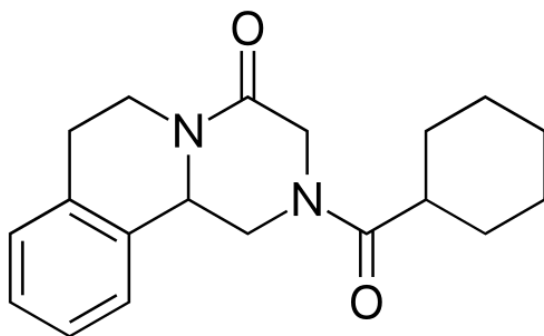
Antihelminatika se používají k léčbě helmintóz způsobených celou řadou parazitů z kmene Nematoda. Jednou z nejčastěji se vyskytujících helmintóz u ryb je diplostomóza, jež způsobuje velké potíže rybám a ekonomické ztráty chovatelům (Zusková *et al.*, 2015). Jako první léčivo proti parazitům z kmene Nematoda, vyskytujících se v zažívacím traktu domácích zvířat bylo použito léčivo na bázi thiabendazolu. V současnosti je tato látka používána pouze jako antimykotikum, jelikož při vyšší koncentraci může působit teratogenně a neurotoxicky. Doposud jsou však používány jiné deriváty thiabendazolu ze skupiny benzimidazolů (heterocyklických aromatických sloučenin vzniklých fúzí benzenu a imidazolu) v boji proti infekcím způsobeným motolicemi ze třídy Trematoda a tasemnicemi třídy Cestoda u domácích zvířat. Mezi tyto deriváty se řadí albendazol, fenbendazol, flubendazol, mebendazol a oxibendazol. Léčba motolic může být také provedena dalšími látkami jako rafoxanid,

klorsulon a praziquantel. U tasemnic se využívají látky na bázi niklosamidu, nitroskanátu a praziquantelu (Dobšíková *et al.*, 2012). V současné době však na našem území není k dispozici žádná registrovaná látka určená primárně v boji proti endoparazitům zacílená na tasemnice a motolice ryb a ani žádný registrovaný léčivý přípravek antiparazitárního charakteru pro ryby (Kolářová *et Nepejchalová*, 2015).

2.6. Vybraná antiparazitika (antihelmintika)

2.6.1. Praziquantel (PQ)

Systematický název praziquantelu je 2-cyklohexylkarbonyl-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isochinolin-4-on (Cioli *et Pica-Mattoccia*, 2003).



Obr. 2: Chemická struktura praziquantelu (Dayan, 2003).

Jedná se o bílý krystalický prášek nahořklé chuti, hydroskopického charakteru. Taje při teplotě 136–140 °C. Má snadnou rozpustnost v chloroformu, dimethylsulfoxidu a ethanolu a malou rozpustnost ve vodě (Cioli *et Pica-Mattoccia*, 2003; Doenhoff, 2008).

Mechanismus účinku spočívá v narušení funkce neuromuskulární soustavy a energetického metabolismu parazita (Bylund *et Sumari*, 1981; Björklund *et Bylund*, 1987). Při kontaktu parazita s praziquantelem totiž dochází k vzájemnému působení fosfolipidů a bílkovin, což vede k nevratnému poškození tegumentu parazita, poklesu hladiny vápníku v těle a následným tělním kontrakcím parazita. To vše je doprovázeno velkými ztrátami glukózy a působení proteolytických enzymů (Treves-Brown, 2000).

Původně byla tato látka testována společností Merck, jako potencionální složka léků proti chorobné úzkosti a strachu. V 70. letech společnost Bayer odhalila antiparazitické účinky této látky a výzkum se přesunul k rozvoji léků proti helmintům (Cioli *et Pica-*

Mattoccia, 2003). Na trhu se tak objevily preparáty jako Biltricid, užívaný k léčbě lidí postižených helmintózami a Droncit („EMBAY 8440“, Praziquantel) používaný pro veterinární účely, především v boji proti mnoha druhům parazitů ze třídy Trematoda a Cestoda (Gönnert *et* Andrews 1977; Thomas *et* Gönnert 1977). V současnosti je na světovém trhu spousta komerčně vyráběných preparátů obsahujících praziquantel, jako účinnou látku, od různých výrobců. Můžeme zmínit Bilharzid (Pharco), Prazitel (Cosmos), Drontal (Bayer) či Prazicest (Pharmagal) (Cioli *et* Pica-Mattoccia, 2003; Kolářová *et* Nepejchalová, 2015).

U psů, koček a koní se léčivo obsahující praziquantel používá celkem běžně (Rehbein *et al.*, 2007; Cunningham *et al.*, 2010), avšak podávání tohoto léčiva hospodářským zvířatům určeným ke konzumaci je zakázáno (Dobšíková *et al.*, 2012). Aplikace je povolena pouze v odůvodněných případech, na výjimku Státní veterinární správy ČR (SVS) a Ústavu pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv (ÚSKVBL) na vlastní zodpovědnost veterinárního lékaře. V případě, že se veterinární lékař rozhodne aplikovat praziquantel, je však nutné, aby byla dodržena standardní ochranná lhůta, tzn. nejméně 500 stupňodnů od poslední aplikace podle zákona č. 166/1999 Sb., O veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon) než je možné provést konzumaci. Počet stupňodnů se v případě aplikace rybám určí vynásobením průměrné denní teploty vody počtem dnů (Kolářová *et* Nepejchalová, 2015).

Způsob podání praziquantelu se u jednotlivých zvířat liší. U psů, koček, koní a ovcí jsou možnosti podání perorální, intramuskulární a subkutánní cestou (Dayan, 2003). U ryb je praziquantel podáván nejčastěji perorální aplikací formou medikované krmné směsi (Tubbs *et al.*, 2006; Tubbs *et al.*, 2008; Sudová *et al.*, 2010; Zusková *et al.*, 2015) a léčebných koupelí o různých koncentracích (Buchmann, 1986; Mitchell, 2004; Ward, 2007). V ojedinělých případech také pomocí jícnové sondy (Sudová *et al.*, 2010) či injekční aplikací (Lorio, 1989). Účinné množství aplikovaného praziquantelu se pohybuje v rozmezí 5–100 mg.kg⁻¹, podle druhu parazita (Treves-Brown, 2000).

V komerčních přípravcích se léčivo obvykle vyskytuje ve formě racemické směsi, v níž je stejným dílem zastoupen R - (-) – enantiomer a S - (+) – enantiomer. I přesto, že S - (+) – enantiomer je považována za neúčinnou složku (Andrews *et al.*, 1983; Xiao *et* Catto 1989; Staudt *et al.*, 1992). Podle studie Wu *et al.* (1991), ve které byl praziquantel podáván lidem buď jako R - (-) – enantiomer v dávce 20 mg.kg⁻¹ hmotnosti nebo

v racemické směsi obou enantiomerů v dávce 40 mg.kg^{-1} hmotnosti, nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl mezi těmito dvěma způsoby podání praziquantelu. Bylo však zjištěno, že léčba provedená podáním R - (-) – enantiomer v dávce 20 mg.kg^{-1} hmotnosti vyvolává u pacientů méně vedlejších účinků a je možné podání jen polovičního množství praziquantelu než v případě racemické směsi. U savců a ryb je absorpce perorálně podaného praziquantelu velmi rychlá, k metabolizaci dochází v játrech a praziquantel je vyloučen močí spolu s metabolity (Dayan, 2003; Tubbs *et al.*, 2008).

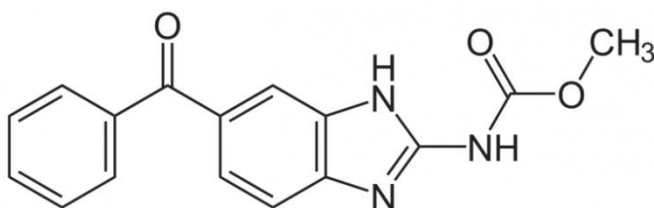
Na základě provedených testů (test akutní toxicity, akutní imobilizační test) na vodních organismech (*Poecilia reticulata* a *Daphnia magna*) provedených na VÚRH ve Vodňanech a z hlediska speciálních rizik lze praziquantel dle zákona č. 356/2003 Sb., O chemických látkách a přípravcích ve znění pozdějších předpisů a jeho prováděcí vyhlášky č. 389/2008 Sb., označit větou R52: škodlivý pro vodní organismy. Výsledky testu akutní toxicity praziquantelu pro živorodka duhovou (*Poecilia reticulata*) byly stanoveny na 96h $\text{LC}_{50} = 50\text{--}100 \text{ mg.l}^{-1}$ praziquantelu a akutní imobilizační test pro hrotnatku velkou (*Daphnia magna*) udává 48h $\text{EC}_{50} = 43$. Zjištěné letální koncentrace poukazují na vysoký terapeutický index praziquantelu (poměr dávky léčebného činidla, která vyvolá léčebný účinek, k dávce způsobující úhyn). Toto je velmi důležité, z důvodu minimalizace negativních účinků při náhodném předávkování (Zusková, 2015). Akutní toxicita praziquantelu pro juvenilní jedince amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*) byla stanovena na $63,4 \text{ mg.l}^{-1}$ (24h LC_{50}) a $60,6 \text{ mg.l}^{-1}$ (96h LC_{50}) podle studie Mitchell *et* Hobbs (2007).

V minulosti byla v celé řadě studií prokázána účinnost praziquantelu proti Monogeniím (Kim *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2011), Cestodám (Pool *et al.*, 1984; Mitchell, 2004; Ward, 2007; Mitchell *et* Darwish, 2009; Voutilainen *et al.*, 2009; Sudová *et al.*, 2010; Iles *et al.*, 2012), Neophorám (Justine *et al.*, 2009) a Trematodám (Nagano *et al.*, 2003; Shirakashi *et al.*, 2012) u celé řady rybích druhů.

Účinnost praziquantelu byla též potvrzena ve studiích zabývajících se cercáriemi a metacercáriemi *Diplostomum spathaceum* (Bylund *et* Sumari 1981; Moser *et* Sakanari, 1986; Heckmann, 1987; Plumb *et* Rogers, 1990; Székely *et* Molnár, 1991; Krum *et al.*, 1992) a *D. spathaceum* u amura bílého (Székely *et* Molnár, 1991; Zusková *et al.*, 2015).

2.6.2. Mebendazol (MB)

Systematický název mebendazolu je methyl-(5-benzoyl-1*H*-benzimidazol-2-yl) karbamát (Dayan, 2003).



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

Jedná se o bílý prášek, téměř nerozpustitelný ve vodě, ethanolu a dichlormetanu. Svým charakterem se řadí mezi antihelmintika benzimidazolové skupiny, působící na parazity trávicího traktu z kmene Nematoda (Dobšíková *et al.*, 2012). Od ostatních benzimidazolů se liší tím, že není inhibován fumarátreduktázou. Jeho působení spočívá v ireverzibilní inhibici absorpce glukózy, což vede k narušení transportu, tvorby ATP a vyčerpání zásob glukózy u parazita. Následně dochází ke snížení pohyblivosti parazita vlivem ochrnutí jeho svalové soustavy a po čase dochází ke smrti parazita (Frayha *et al.*, 1997; Corrêa, 1999; Rang *et al.*, 2007).

Vlivem špatné rozpustnosti je pouze malé procento mebendazolu absorbováno z GIT po perorálním podání ve srovnání s jinými deriváty (albendazolem či oxibendazolem). I přesto je dosahováno terapeutických účinků u domácích i hospodářských zvířat. Obecně je mebendazol málo metabolizován a většina léčiva je vyloučena v nezměněné podobě trusem (Dobšíková *et al.*, 2012).

Používání této látky je podle mezinárodního registru léčiv možné u domácích zvířat (psů, koček) hospodářských zvířat (koní, ovcí, oslů, prasat včetně jejich mláďat) (Dayan, 2003) a u spárkaté zvěře velmi často v kombinaci s rafoxanidem či metrifonátem (Dobšíková *et al.*, 2012). Také je tuto látku možné použít u zvířat určených ke konzumaci, avšak je potřeba dodržet ochrannou lhůtu sedm dní pro maso a 24 hodin pro mléko, v níž je zakázáno maso a mléko těchto zvířat konzumovat. U

oslů je kontraindikace mebendazolu během prvních čtyř měsíců březosti, u ovcí a skotu, stejně tak i u psů a koček lze tuto látku použít i v období březosti (Dayan, 2003).

Způsob podání látky je ve většině případů (u domácích a hospodářských zvířat) perorální ve formě premixů pro medikovanou krmnou směs, past, tablet a granulí (Riviere *et Papich*, 2009). U ryb se doporučuje provádět ošetření touto látkou pomocí léčebných koupelí (Noga, 2010) a též podáváním medikované krmné směsi obsahující mebendazol (Chagas *et al.*, 2016).

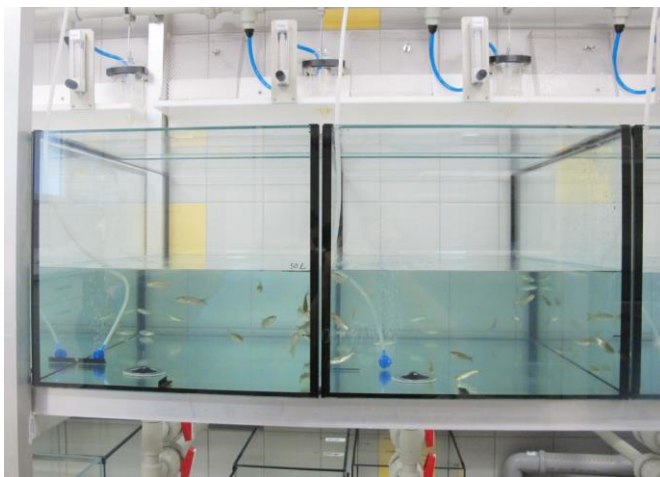
Některé studie prokázaly účinnost mebendazolu proti Monogeniím (Svobodová *et al.*, 1990; Buchmann *et al.*, 1992; Varriale *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 2001; Chagas *et al.*, 2016) a Cestodám (Durán *et al.*, 1989) jiné jeho účinnost neprokázaly (Katharios *et al.*, 2006). Testování účinnosti mebendazolu v boji proti cercáriím a metacercáriím *Diplostomum spathaceum* nebylo doposud provedeno.

3. Metodika

3.1. Místo pokusu

Celý experiment probíhal v laboratorních podmínkách VÚRH FROV ve Vodňanech. Všechna pokusná akvária byla před začátkem pokusu dezinfikována pomocí Sava (obsah chlornanu sodného 5 %) a důkladně vymyta čistou vodou. Pro experiment bylo vybráno devět stolitrových akvárií. Všechna akvária byla usazena v kovovém rámu v akvarijní místnosti v co možná nejshodnějších podmínkách (Obr. 4). Rozřazení akvárií pro jednotlivé skupiny ryb bylo provedeno náhodně.

Akvária byla naplněna vodou přibližně do poloviny svého objemu (tzn. 50 l vody). Teplota vody se pohybovala v rozmezí 18–20 °C v průběhu celého experimentu. Aerace byla zajištěna pomocí vzduchovacích kamínků. Obsah rozpuštěného kyslíku ve vodě se pohyboval v rozmezí 80–90 %. Akvária neměla implementována žádná umělá osvětlení, takže osvětlení akvárií odpovídalo venkovním světelným podmínkám (září až říjen). V pravidelných intervalech, každý druhý den, byla vyměňována polovina objemu vody (tzn. 25 l) a akvária byla mechanicky očištěna pomocí stěrky a houbičky.



Obr. 4: Pokusná akvária (Foto: Zdeněk Ipser).

3.2. Experimentální ryby

Jako pokusná ryba byl zvolen amur bílý (*Ctenopharyngodon idella*). Jednalo se o juvenilní jedince ve stáří tří měsíců. Všichni jedinci byli přirozeně nakaženi metacerkáriemi motolice oční (*Diplostomum spathaceum*) v oční čočce. Infikované

ryby (300 kusů) byly získány z venkovního chovu experimentálního rybochovného pracoviště a pokusnictví ve Vodňanech. Po převozu do laboratorních podmínek byly ryby ošetřeny lázní obsahující kyselinu peroctovou (ve formě 36% Persterilu), aby došlo k odstranění případných ektoparazitů. Ryby byly po dobu pěti dní aklimatizovány v laboratorních podmínkách a bylo jim předkládáno krmivo KP1, jimž byly následně krmeny ryby v kontrolní skupině. Před začátkem testu bylo deset náhodně vybraných kusů ryb parazitologicky vyšetřeno (průměrná hmotnost jedné ryby \pm směrodatná odchylka činila $1,6 \pm 0,1$ g; průměrný počet motolic na jednu rybu \pm směrodatná odchylka byl $21,1 \pm 8,3$) a byla zjištěna 100% prevalence metacerkárií *Diplostomum spathaceum*.

3.3. Design pokusu

Po aklimatizaci byly ryby rovnoměrně rozděleny do čtyř skupin dle následujícího schématu:

- 1. skupina
 - 2 akvária po 25 kusech ryb
 - medikovaná krmná směs Pramik 1
- 2. skupina
 - 2 akvária po 25 kusech ryb
 - medikovaná krmná směs Pramik 2
- 3. skupina
 - 2 akvária po 25 kusech ryb
 - medikovaná krmná směs s mebendazolem (MB)
- 4. skupina
 - 3 akvária po 25 kusech ryb
 - granulované krmivo KP1

3.4. Medikovaná krmná směs a způsob aplikace testované látky

Experimentálním rybám byly podávány čtyři druhy krmných směsí (Obr. 5).

První z nich bylo průmyslově vyráběné granulované krmivo KP1 kondiční, určené pro rozkrm kapřího plůdku, od výrobce VKS Stříbrné hory, obsahující šrotovanou pšenici a kukuřici, řepkové expelery (pokrutiny), krmnou pšeničnou mouku, loupaný extrahovaný toastovaný sójový šrot, rostlinný olej vyrobený ze sóje, vitamíny a minerální látky s nutričním složením: 13,21 % dusíkaté látky, 3,7 % tuku, 4,6 % vlákniny a 3,24 % popelovin. Tímto krmivem byly v průběhu experimentu krmeny ryby z kontrolní skupiny a zároveň sloužilo jako hlavní složka krmiva pro skupinu, které byl podáván mebendazol.

Medikované krmivo obohacené o mebendazol bylo připraveno dle standardního operačního postupu pro přípravu krmiva (SOP 03 RS) následujícím způsobem: Na přesných vahách bylo naváženo 0,55 kg KP1. Pomocí elektrického homogenizátoru rozemleto na jemný prášek a za použití síta o velikosti ok 2 mm odseparovány špatně rozemleté částice. Následně bylo odváženo 475 g rozemletého prosetého krmiva KP1, 25 g hladké mouky a 1,25 g mebendazolu, získaného rozdrčením tablet Vermox (obsahujících 100 mg mebendazolu v jedné tabletě). Takto vytvořená směs byla pečlivě zhomogenizována a následně zvlhčena přidáním 160 ml vodovodní vody. Pomocí elektrického homogenizátoru bylo připraveno homogenní těsto, jež se vložilo do mlýnku na maso a byly připraveny granule. Takto vzniklé vlhké granule byly rozloženy v tenké vrstvě na tácy a ponechány přirozenému vyschnutí při laboratorní teplotě po dobu 48 hodin. Po dvou dnech byly granule přesety přes cedník, který zamezil proniknutí větších hrudek, které by experimentální ryby vzhledem ke své velikosti nebyly schopny pozřít. Takto vytvořená medikovaná směs tedy obsahovala 2,5 g MB.kg⁻¹ krmiva.

Další komerčně vyráběnou medikovanou krmnou směsí, jež byla v našem pokusu použita, byl Pramik obsahující testovanou látku praziquantel ve dvou koncentracích, a to 2,5 g PQ.kg⁻¹ krmiva u Pramiku 1 a 1,25 g PQ.kg⁻¹ krmiva u Pramiku 2. Medikované krmivo vyráběné firmou Mikrop Čebín dále obsahovalo zrna obilovin, olejnatá semena, minerální a doplňkové látky s nutričním složením: 14 % dusíkaté látky, 3,4 % tuku, 2,3 % vlákniny a 3,8 % popela. Toto krmivo bylo mechanicky rozdrčeno na požadovanou velikost, kterou byly testované ryby schopny pozřít.

Všechna krmiva byla podávána perorálně, manuální aplikací bez použití automatických dávkovačů, kontrolním i testovaným rybám, pravidelně v dopoledních hodinách. Ryby byly krmeny vždy šest po sobě jdoucích dní a poté následoval den bez

krmení. Prvních pět dní byly ryby krmeny 2 % hmotnosti obsádky, což se ukázalo jako příliš velké množství (polovina krmiva nebyla zkonsumována). Proto byla krmná dávka snížena na 1 % hmotnosti obsádky, toto množství krmiva bylo okamžitě zkonsumováno (Obr. 6). Pokud byly ryby krmeny 1 % hmotnosti obsádky, přijaly v jedné podávané krmné dávce medikovaného krmiva 25 mg PQ (Pramik 1), 12,5 mg PQ (Pramik 2) a 25 mg MB (skupina s mebendazolem).

První parazitologické vyšetření pro skupiny ryb, kterým byl podáván praziquantel (Pramik 1 a Pramik 2) bylo provedeno poté, co ryby zkonsumovaly v předkládaném krmivu 500 mg PQ.kg⁻¹ hmotnosti obsádky pro skupinu Pramik 1 a 250 mg PQ.kg⁻¹ hmotnosti obsádky pro skupinu Pramik 2, v případě mebendazolu po zkonsumování 300 mg MB.kg⁻¹ hmotnosti obsádky. Jednotlivá parazitologická vyšetření v případě Pramiku byla provedena vždy, když ryby zkonsumovaly dávku PQ odpovídající 4 % hmotnosti obsádky. U mebendazolové skupiny ryb byla dávka zkonsumovaného MB mezi prvním a druhým parazitologickým vyšetřením dvojnásobná (tedy 8 % hmotnosti obsádky) a mezi třetím a čtvrtým trojnásobná (tedy 12 % hmotnosti obsádky). V období mezi parazitologickými vyšetřeními, ve kterých ryby zkonsumovaly 4 % hmotnosti obsádky, činilo množství zkonsumované testované látky obsádkou 100 mg PQ (Pramik 1), 50 mg PQ (Pramik 2) a 100 mg MB (skupina s mebendazolem). Pro snadnější orientaci je množství přijaté testované látky před provedením jednotlivých parazitologických vyšetření uvedeno v tabulce (Tab. I., Tab. II.).

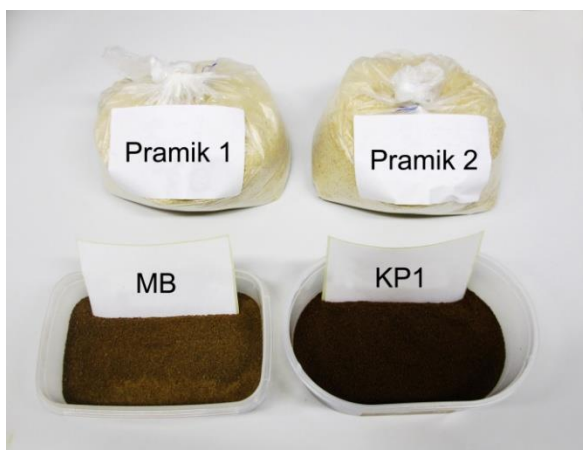
Tab. I: Množství přijatého praziquantelu pro testované skupiny Pramik 1 a Pramik 2 v mg na kg hmotnosti obsádky před provedením jednotlivých parazitologických vyšetření.

Parazitologické vyšetření	Množství přijatého praziquantelu [mg.kg ⁻¹ hmotnosti obsádky] pro testované skupiny	
	Pramik 1	Pramik 2
I.	500	250
II.	600	300
III.	700	350
IV.	800	400
V.	900	450

Tab. II: Množství přijatého mebendazolu pro testovanou skupinu krmenou mebendazolem v mg na kg hmotnosti obsádky před provedením jednotlivých parazitologických vyšetření.

Parazitologické vyšetření	Množství přijatého mebendazolu [mg.kg ⁻¹ hmotnosti obsádky] pro testovanou skupinu
	MB
I.	300
II.	500
III.	600
IV.	900

Krmná dávka byla po každém kontrolním vyšetření ryb z daného akvária snížena o počet odebraných ryb s předpokladem, že hmotnost zbývajících ryb byla beze změny (tzn. podávané množství krmiva, sloužilo pouze jako záchovná dávka).



Obr. 5: Podávané krmné směsi (Pramik 1, Pramik 2, krmná směs s mebendazolem a KP1) (Foto: Zdeněk Ipser).

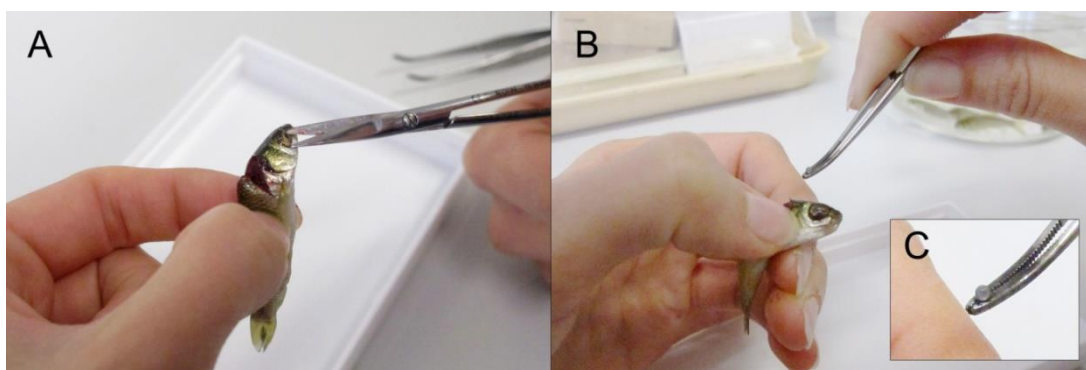


Obr. 6: Příjem medikované krmné směsi Pramik 1 amurem bílým (*Ctenopharyngodon idella*) (Foto: Zdeněk Ipser).

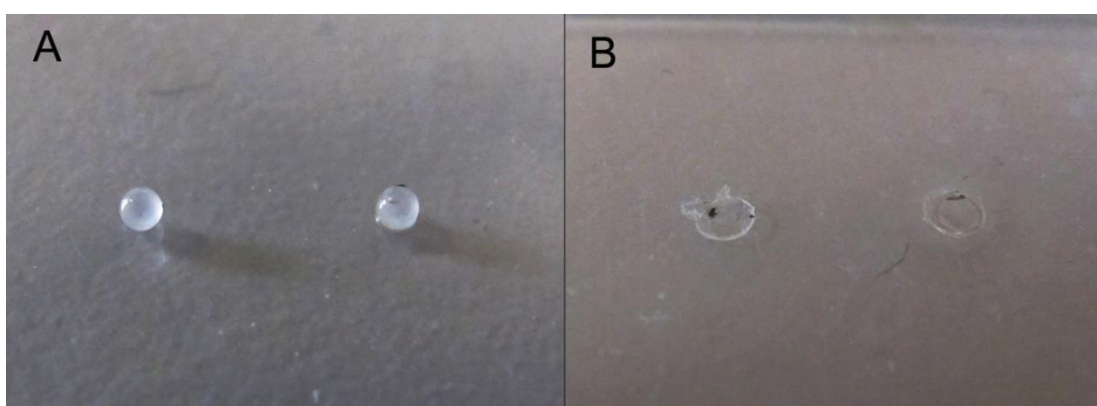
3.5. Kontrolní parazitologické vyšetření

Během kontrolního parazitologického vyšetření bylo vždy vyšetřováno deset ryb z každé testované skupiny (Pramik 1, Pramik 2 a MB), přičemž bylo odebráno pět ryb z každého akvária. Z kontrolní skupiny bylo odebráno také deset ryb, co možná nejrovnoměrněji ze tří akvárií. Odebrané ryby byly mechanicky usmrceny (přestřížením

míchy). Každá ryba byla zvážena. Následně byly rybám vypreparovány oční čočky (pomocí nůžek a pinzety – Obr. 7), které byly umístěny mezi dvě podložní sklíčka. Kompresí sklíček byl vytvořen preparát (Obr. 8) určený pro mikroskopii. V každé čočce byly zaznamenány počty metacerkárií *Diplostomum spathaceum* (Obr. 9) a následně byla stanovena prevalence infekce (tedy podíl počtu infikovaných ryb a vyšetřovaných ryb) a intenzita infekce (tedy průměrný počet motolic v jedné vyšetřované rybě). Celkem bylo provedeno pět parazitologických vyšetření pro skupiny, kterým byl podáván praziquantel (Pramik 1 a Pramik 2) a čtyři parazitologická vyšetření pro skupinu krmenu mebendazolem. Další vyšetření u MB skupiny se neprováděly z důvodů počínajících úhynů ryb ve skupině (po předpokládaném příjmu 500 mg MB.kg⁻¹ hmotnosti obsádky).



Obr. 7: Preparace oční čočky amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*): A – nastříhnutí oka; B – vyjmutí oční čočky; C – detail oční čočky (Foto: Zdeněk Ipser).

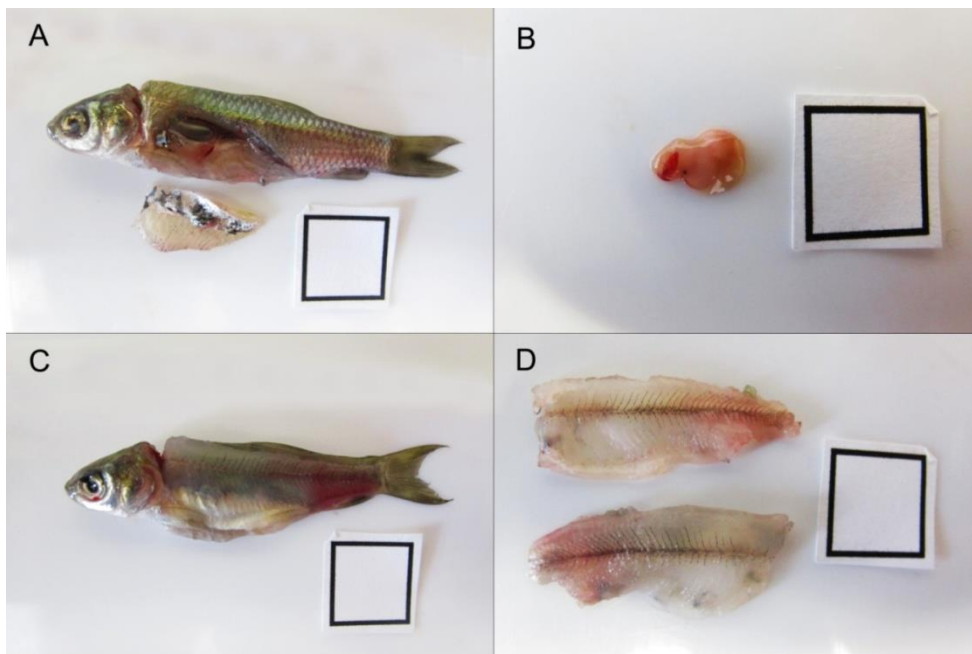


Obr. 8: Oční čočky amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*) před (A) a po kompresi (B) (Foto: Zdeněk Ipser).



Obr. 9: Metacerkárie motolice oční (*Diplostomum spathaceum*) v oční čočce amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*) (Foto: Jarmila Michálková).

Zároveň byly z každé ryby odebrány a následně zamražené vzorky jater a svaloviny (filety bez kůže) pro pozdější stanovení reziduí praziquantelu a mebendazolu pomocí chromatografie s hybridní tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/HRMS) (Obr. 10). Tyto vzorky nebyly z technických a finančních důvodů doposud vyhodnoceny a nejsou tedy předmětem výsledků této diplomové práce.



Obr. 10: Postup získání vzorků ke stanovení reziduí praziquantelu a mebendazolu pomocí chromatografie s hybridní tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/HRMS): A – otevření tělní dutiny; B – odběr vzorku jater; C – odstranění kůže z ryby; D – filety bez kůže. Čtverec představuje 1 cm². (Foto: Zdeněk Ipser).

3.6. Vyhodnocení dat

3.6.1. Grafické vyhodnocení

Grafické vyhodnocení bylo provedeno v programu GraphPad Software, Inc., version Prim 5 (2007) a Microsoft Excel 2003.

3.6.2. Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu STATISTICA (data analysis software system), StatSoft, Inc., version 8 (2007).

- V prvním kroku byl proveden test normality získaných dat pomocí Shapiro-Wilk testu na hladině významnosti $p < 0,05$ (Shapiro *et* Wilk, 1965; Razali *et* Wah, 2011). Na základě tohoto testu bylo zjištěno, že data nemají normální rozdělení.
- Z tohoto důvodu byl použit neparametrický Leveneovův test na hladině významnosti $p < 0,05$ pro zjištění homogenity variance (Nordstokke *et* Zumbo, 2010; Nordstokke *et al.*, 2011). Přičemž bylo zjištěno, že data nemají homogenitu variancí.
- Pro zjištění rozdílu mezi testovanými skupinami (kontrolní skupinou, Pramik 1, Pramik 2 a MB) v rámci jednotlivých parazitologických vyšetření byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test na hladině významnosti $p < 0,05$ (McKight *et* Najab, 2010). Z důvodu absence post hoc testu pro Kruskal-Wallisův test byly vždy dvě skupiny v každém parazitologickém vyšetření testovány mezi sebou.
- Pro zjištění rozdílu v čase, tedy mezi jednotlivými parazitologickými vyšetřeními včetně vyšetření před testem, pro jednotlivé testované skupiny (kontrolní skupina, Pramik 1, Pramik 2 a MB) byl použit Mann-Whitney-Wilcoxonův test na hladině významnosti $p < 0,05$ (Mann *et* Whitney, 1947; De Winter *et* Dodou, 2010).

4. Výsledky

4.1. Testování účinnosti praziquantelu na infekci způsobenou metacerkáriemi *Diplostomum spathaceum*

Ve všech parazitologických vyšetřeních (prvním až pátém) byl prokázán statisticky významný účinný efekt Pramik 1 a Pramik 2 v porovnání s kontrolní skupinou (Tab. III.). V průběhu vyšetření nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi testovanými skupinami krmenými Pramik 1 a Pramik 2, z čehož vyplývá, že účinnost testovaných koncentrací je statisticky shodná.

Již u prvního parazitologického vyšetření byl u skupiny, které byl podáván Pramik 1 (předpokládaný příjem 500 mg PQ.kg⁻¹ hmotnosti obsádky) pozorován významný rozdíl v počtu motolic (průměrný počet motolic na jednu rybu činil pouze 2 motolice ve srovnání s kontrolní skupinou, kde připadalo v průměru na jednu rybu 34 motolic). Nižší, přesto významný rozdíl byl pozorován i v případě Pramik 2 (předpokládaný příjem 250 mg PQ.kg⁻¹ hmotnosti obsádky), kde na jednu rybu připadalo v průměru 8 motolic v porovnání s kontrolní skupinou (34 motolic).

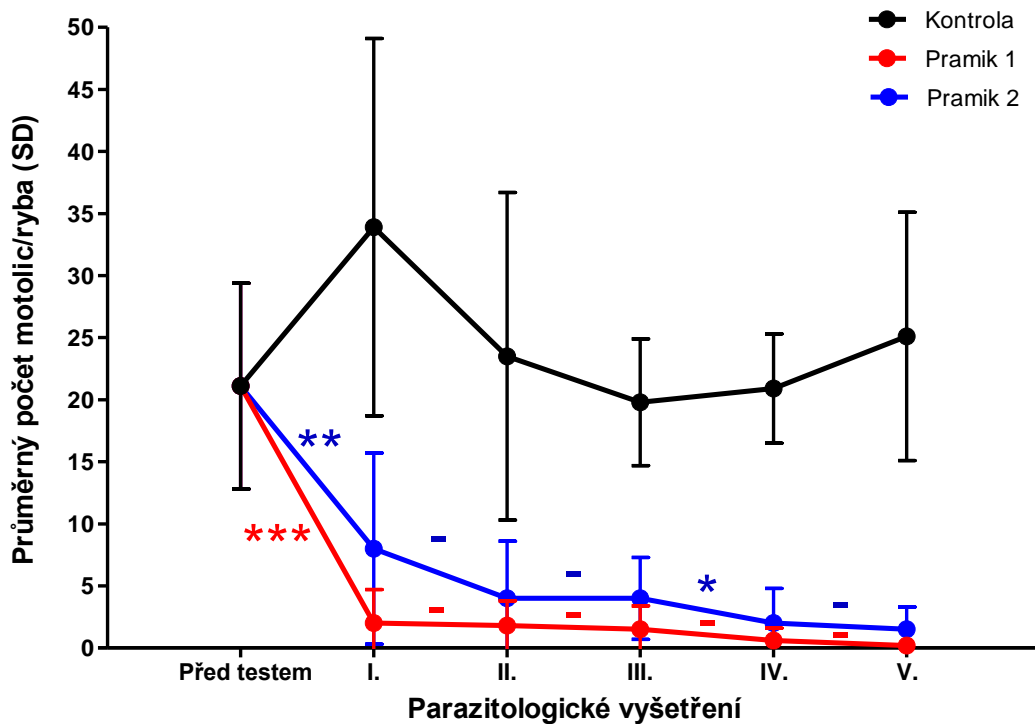
V pátém parazitologickém vyšetření u skupiny krmené Pramik 1 (předpokládaný příjem 900 PQ.kg⁻¹ hmotnosti obsádky) byl průměrný počet motolic na rybu menší než 1 (0,2) v porovnání s kontrolní skupinou (25 motolic). U skupiny ryb, které byl podáván Pramik 2 (předpokládaný příjem 450 PQ.kg⁻¹ hmotnosti obsádky) byl průměrný počet motolic na rybu menší než 2 (1,5), přičemž prevalence infekce činila 50 %.

Tab. III: Provedená parazitologická vyšetření pro zjištění účinku Pramik 1 a Pramik 2 ve srovnání s kontrolní skupinou zobrazující průměrný počet motolic na rybu a statistickou významnost mezi testovanými skupinami (Kruskal–Wallisův test na hladině významnosti $P < 0,05$; statistická významnost je znázorněna hvězdičkami: ** $P < 0,01$, * $P < 0,001$; statisticky nevýznamné rozdíly jsou znázorněny pomlčkou: – $P > 0,05$).**

Parazitologické vyšetření	Testované skupiny		Průměrný počet motolic/ryba \pm SD		Statistická významnost testovaných skupin (AxB)
	A	B	A	B	
I.	Pramik 1	Kontrola	2,0 \pm 2,7	33,9 \pm 15,2	***
	Pramik 2	Kontrola	8,0 \pm 7,7	33,9 \pm 15,2	**
	Pramik 1	Pramik 2	2,0 \pm 2,7	8,0 \pm 7,7	–
II.	Pramik 1	Kontrola	1,8 \pm 2,0	23,5 \pm 13,2	***
	Pramik 2	Kontrola	4,0 \pm 4,6	23,5 \pm 13,2	***
	Pramik 1	Pramik 2	1,8 \pm 2,0	4,0 \pm 4,6	–
III.	Pramik 1	Kontrola	1,5 \pm 1,9	19,8 \pm 5,1	***
	Pramik 2	Kontrola	4,0 \pm 3,3	19,8 \pm 5,1	***
	Pramik 1	Pramik 2	1,5 \pm 1,9	4,0 \pm 3,3	–
IV.	Pramik 1	Kontrola	0,6 \pm 1,0	20,9 \pm 4,4	***
	Pramik 2	Kontrola	2,0 \pm 2,8	20,9 \pm 4,4	***
	Pramik 1	Pramik 2	0,6 \pm 1,0	2,0 \pm 2,8	–
V.	Pramik 1	Kontrola	0,2 \pm 0,4	25,1 \pm 10,0	***
	Pramik 2	Kontrola	1,5 \pm 1,8	25,1 \pm 10,0	***
	Pramik 1	Pramik 2	0,2 \pm 0,4	1,5 \pm 1,8	–

Před začátkem testu činila prevalence infekce 100 % s intenzitou infekce (tedy průměrného počtu motolic na jednu rybu \pm směrodatná odchylka) 21,1 \pm 8,3 (Obr. 11). V období mezi vyšetřením před začátkem testu a prvním parazitologickým vyšetřením v testu byl u kontrolní skupiny patrný rozdíl v intenzitě infekce. Průměrný počet motolic ze všech parazitologických vyšetření \pm směrodatná odchylka činil u kontrolních skupin 24,6 \pm 11,2. V období mezi vyšetřením před začátkem testu a prvním parazitologickým vyšetřením byl u obou testovaných praziquantelových skupin (Pramik 1 a Pramik 2) nalezen výrazný statisticky významný rozdíl v intenzitě infekce (hvězdičky v obr. 11), ten dokresluje i průměrné počty motolic, jež se snížily v porovnání s kontrolní skupinou o 19,1 u Pramik 1 a o 13,1 u Pramik 2. Intenzita infekce byla u obou testovaných skupin během jednotlivých parazitologických vyšetření rozdílná (s výjimkou shody mezi druhým a třetím parazitologickým vyšetřením u Pramik 2), nicméně tyto rozdíly nebyly statisticky významné (pomlčky v obr. 11). Výjimku tvořil pouze statisticky významný rozdíl (hvězdička v obr. 11) mezi třetím a

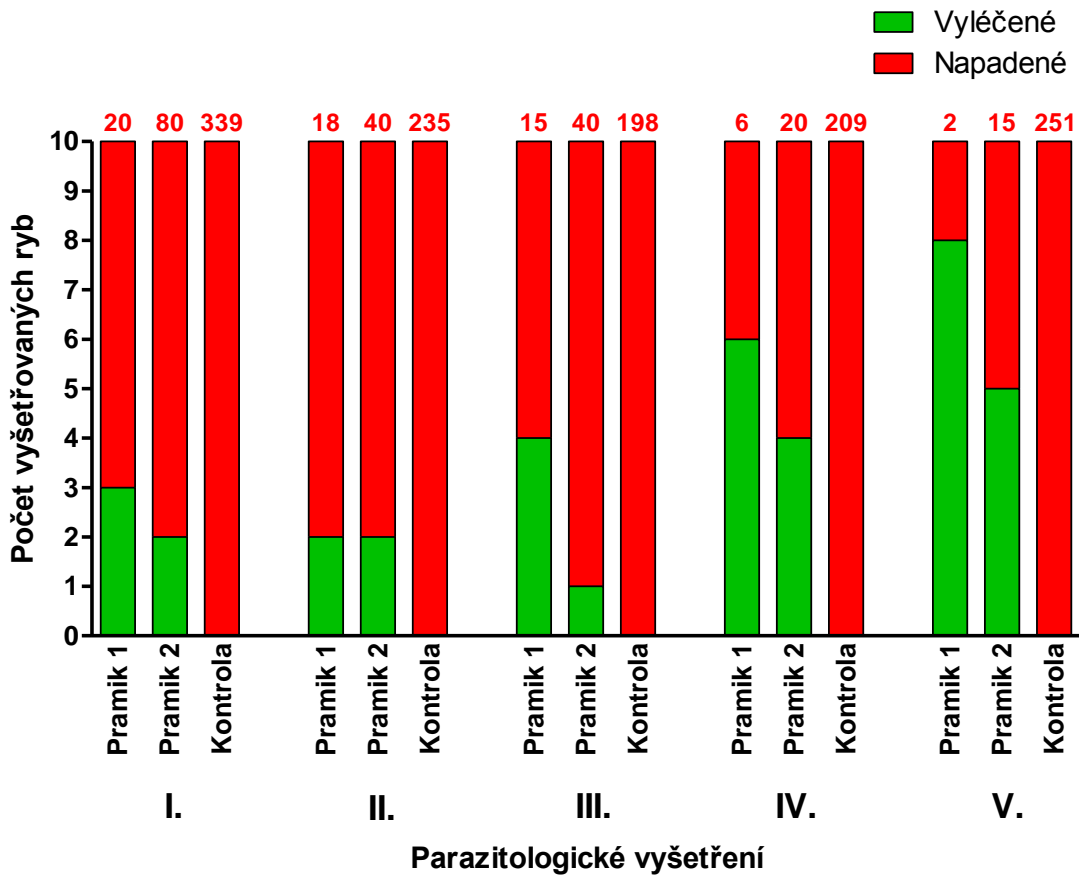
čtvrtým parazitologickým vyšetřením u Pramík 2. Celkový trend u obou testovaných praziquantelových skupin (Pramík 1 a Pramík 2) byl obdobný, po prudkém poklesu intenzity infekce mezi vyšetřením před začátkem testu a prvním parazitologickým vyšetřením následoval už jen pozvolný pokles v intenzitě napadení motolicemi.



Obr. 11: Grafické znázornění intenzity infekce (průměrného počtu motolic na jednu rybu včetně směrodatné odchylky) před testem a v průběhu pěti parazitologických vyšetření u testovaných skupin Pramík 1 a Pramík 2 (křivky: černá – kontrolní skupina, červená – Pramík 1, modrá – Pramík 2; Mann-Whitney-Wilcoxonův test: statistická významnost je znázorněna hvězdičkami: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, statisticky nevýznamné rozdíly jsou znázorněny pomlčkou: – $P > 0,05$).

V kontrolní skupině byly ve všech parazitologických vyšetřeních všechny vyšetřované ryby napadeny motolicemi (Obr. 12) – prevalence tedy činila 100 %. Oproti tomu bylo u obou skupin krměných praziquantelem vždy pozorováno několik ryb zcela vyléčených. U Pramík 1 se rozmezí vyléčených ryb pohybovalo od 2 do 8 a u Pramík 2 v rozmezí od 1 do 5. V pátém parazitologickém vyšetření bylo u Pramík 1 vyléčeno 8 ryb z deseti (prevalence infekce tedy činila 20 %), přičemž zbylé dvě ryby byly napadeny pouze jednou motolicí. Nižší rozdíl v počtu motolic byl pozorován u skupiny, které byl podáván Pramík 2, kde bylo úplně vyléčeno jen pět ryb z deseti

(prevalence infekce tedy činila 50 %). Zároveň bylo možné u obou testovaných skupin pozorovat úbytek celkového počtu motolic v průběhu podávání testované látky, výjimka byla jen u skupiny Pramik 2 během druhého a třetího parazitologického vyšetření, kde byly hodnoty totožné (Obr. 12).



Obr. 12: Grafické znázornění počtů vyléčených a napadených ryb motolicí oční v jednotlivých parazitologických vyšetřeních u testovaných skupin Pramik 1 a Pramik 2 a kontrolní skupiny (sloupce: zelené – vyléčené ryby, červené – napadené ryby; červená čísla udávají celkové množství motolic ve vyšetřované skupině).

4.2. Testování účinnosti mebendazolu na infekci způsobenou metacerkáriemi *Diplostomum spathaceum*

Ve všech parazitologických vyšetřeních (prvním až čtvrtém) nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl mezi skupinou, které byl v krmivu podáván mebendazol a kontrolní skupinou (Tab. IV.), což naznačují i průměrné počty motolic na rybu, které mají mezi sebou pouze mírný rozdíl v průběhu všech parazitologických vyšetření. Při prvním parazitologickém vyšetření (předpokládaný příjem 300 mg MB.kg⁻¹ hmotnosti obsádky) připadalo v průměru na jednu rybu 27 motolic ve srovnání s kontrolní skupinou, kde na jednu rybu v průměru připadalo 34 motolic. I při čtvrtém parazitologickém vyšetření (předpokládaný příjem 900 mg MB.kg⁻¹ hmotnosti obsádky) byl průměrný počet motolic vysoký (18 motolic na rybu) podobně jako v kontrolní skupině (22 motolic na rybu).

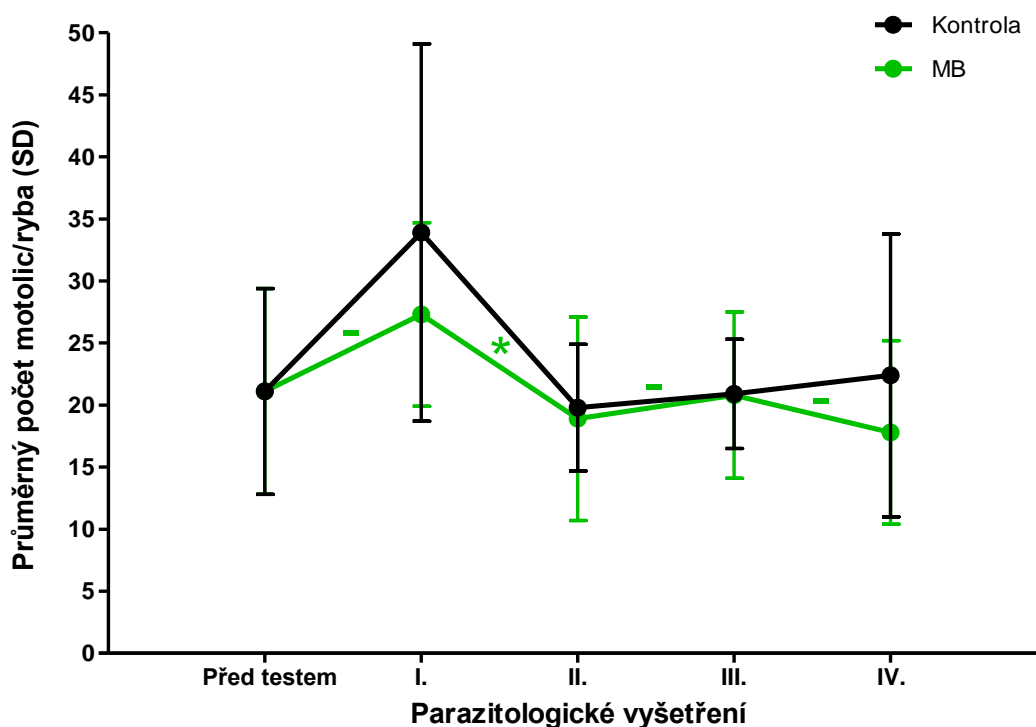
Tab. IV: Provedená parazitologická vyšetření pro zjištění účinku mebendazolu ve srovnání s kontrolní skupinou zobrazující průměrný počet motolic na rybu a statistickou významnost mezi testovanými skupinami (Kruskal–Wallisův test na hladině významnosti $P < 0,05$; statisticky nevýznamné rozdíly jsou znázorněny pomlčkou: – $P > 0,05$).

Parazitologické vyšetření	Testované skupiny		Průměrný počet motolic/ryba ± SD		Statistická významnost testovaných skupin (A×B)
	A	B	A	B	
I.	MB	Kontrola	27,3 ± 7,4	33,9 ± 15,2	–
II.	MB	Kontrola	18,9 ± 8,2	19,8 ± 5,1	–
III.	MB	Kontrola	20,8 ± 6,7	20,9 ± 4,4	–
IV.	MB	Kontrola	17,8 ± 7,4	22,4 ± 11,4	–

V období mezi vyšetřeními před začátkem testu a prvním parazitologickým vyšetřením byl u skupiny krmené mebendazolem pozorován statisticky nevýznamný rozdíl v intenzitě infekce (pomlčka v obr. 13) (průměrný počet motolic na jednu rybu ± směrodatná odchylka činil 27,3 ± 7,4 a pro porovnání byl u kontrolní skupiny průměrný počet motolic na jednu rybu ± směrodatná odchylka 33,9 ± 15,2). Mezi prvním a druhým parazitologickým vyšetřením byl nalezen statisticky významný rozdíl v intenzitě infekce (hvězdička v obr. 13) u skupiny, které byl v krmivu podáván mebendazol. Mezi druhým a třetím parazitologickým vyšetřením u MB skupiny došlo k mírnému statisticky nevýznamnému rozdílu intenzity infekce (téměř totožnému

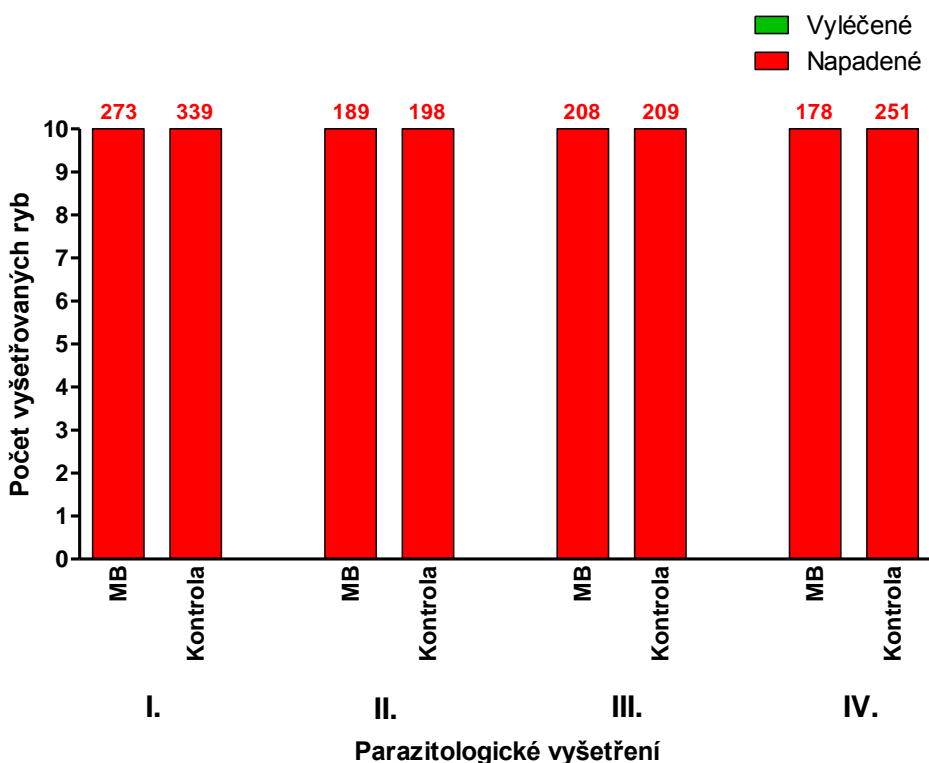
s kontrolní skupinou), na který opět navazoval mírný statisticky nevýznamný rozdíl v intenzitě napadení motolicemi (pomlčky v obr. 13).

Přes nepřiliš jasný trend mebendazolové křivky byl nalezen statisticky významný rozdíl v intenzitě infekce mezi prvním a čtvrtým parazitologickým vyšetřením (Mann-Whitney-Wilcoxonův test, $P = 0,017$), pokud však srovnáme parazitologické vyšetření provedené před začátkem testu se čtvrtým parazitologickým vyšetřením (Mann-Whitney-Wilcoxonův test, $P = 0,376$) získáme statisticky nevýznamný rozdíl v intenzitě infekce. Na základě čehož můžeme konstatovat, že v průběhu parazitologických vyšetření nedochází k léčení ryb, ale pouze to, že intenzita infekce byla v průběhu jednotlivých vyšetření rozdílná.



Obr. 13: Grafické znázornění intenzity infekce (průměrného počtu motolic na jednu rybu včetně směrodatné odchylky) před testem a v průběhu čtyř parazitologických vyšetření u skupiny, které byl podáván mebendazol (křivky: černá – kontrolní skupina, zelená – mebendazol; Mann-Whitney-Wilcoxonův test: statistická významnost je znázorněna hvězdičkou: * $P < 0,05$, statisticky nevýznamné rozdíly jsou znázorněny pomlčkou: — $P > 0,05$).

V případě skupiny krmené mebendazolem byly ve všech parazitologických vyšetřeních pozorovány jen napadené ryby (stejně jako u kontrolní skupiny činila prevalence infekce 100 %) a žádná ryba nebyla v průběhu experimentu vyléčena (Obr. 14). Zároveň i celkové počty motolic jsou velice vysoké a obdobné jako v kontrolní skupině.



Obr. 14: Grafické znázornění počtů vyléčených a napadených ryb motolicí oční v jednotlivých parazitologických vyšetřeních u testované skupiny, které byl podáván mebendazol a kontrolní skupiny (sloupce: zelené – vyléčené ryby, červené – napadené ryby; červená čísla zobrazují celkové množství motolic ve vyšetřované skupině).

Současně byl u MB skupiny zaznamenán masivní úhyn ryb, především mezi druhým a třetím parazitologickým vyšetřením, kdy byl předpokládán příjem 500 mg MB.kg⁻¹ hmotnosti obsádky a k úhynu docházelo v obou MB akváriích. Ryby jevily známky nechutenství a následné podvýživy, spojené se ztrátou hmotnosti, měly překrvená žábra a bylo u nich pozorováno zrychlené dýchání. Po úhynu měly ryby mírně zahleněné tělo a makroskopicky viditelné krváceniny v očích. Při provedené pitvě byla zjištěna nehomogenní, zvětšená játra.

5. Diskuze

5.1. Testování účinnosti praziquantelu na infekci způsobenou metacerkáriemi *Diplostomum spathaceum*

Praziquantel patří mezi často používaná antiparazitika ve veterinární i humánní medicíně (Dayan, 2003). Jeho účinnost byla prokázána u celé řady ryb napadených parazity ze tříd Monogenea (Kim *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2011), Cestoda (Mitchell *et Darwish*, 2009; Voutilainen *et al.*, 2009; Sudová *et al.*, 2010; Iles *et al.*, 2012), Neophora (Justine *et al.*, 2009) a Trematoda (Nagano *et al.*, 2003; Shirakashi *et al.*, 2012). Rovněž byla jeho účinnost potvrzena ve studiích zabývajících se eliminací metacerkárií *Diplostomum spathaceum* u ryb (Bylund *et Sumari* 1981; Heckmann, 1987; Plumb *et Rogers*, 1990; Székely *et Molnár*, 1991; Krum *et al.*, 1992) včetně amura bílého (Székely *et Molnár*, 1991; Zusková *et al.*, 2015). Způsob aplikace praziquantelu se u ryb doporučuje perorální cestou ve formě medikované krmné směsi nebo formou léčebných koupelí (Svobodová *et al.*, 2007; Noga, 2010; Zusková *et al.*, 2015).

V našem pokusu byla použita perorální aplikace komerčně vyráběné medikované krmné směsi Pramik ve dvou koncentracích účinné látky (PQ) – Pramik 1 obsahoval 2,5 g PQ.kg⁻¹ krmiva a Pramik 2 obsahoval 1,25 g PQ.kg⁻¹ krmiva. V obou koncentracích se v našem pokusu praziquantel ukázal jako velice účinné antiparazitikum pro léčbu diplostomózy u amura bílého, stejně jako ve studii Zusková *et al.* (2015). Statisticky průkazné výsledky mezi testovanými skupinami (Pramik 1 a Pramik 2) a kontrolní skupinou byly zjištěny ve všech provedených parazitologických vyšetřeních a zároveň tak i napříč všemi parazitologickými vyšetřeními. Intenzita infekce výrazně vzrostla u kontrolní skupiny v období mezi vyšetřením před začátkem testu a prvním parazitologickým vyšetřením, to mohlo být dáno variabilitou nakažení vyšetřovaných jedinců ve skupině, čemuž však měl zabránit náhodný výběr deseti vyšetřovaných ryb před začátkem testu. Z našich výsledků je však zřejmé, že účinný efekt byl průkazný již od prvního parazitologického vyšetření u Pramik 1 a Pramik 2 (předpokládaný příjem 500 mg PQ.kg⁻¹ hmotnosti obsádky a 250 mg PQ.kg⁻¹ hmotnosti obsádky). To však může být způsobeno i tím, že náš experiment byl proveden v laboratorních podmínkách, kde bylo možné sledovat příjem krmiva obsádkou a dle potřeby krmnou dávku upravit (což bylo provedeno i v našem případě, kdy denní krmná dávka byla snížena ze 2 % na

1 % hmotnosti obsádky v důsledku počátečního nižšího příjmu). V terénních podmínkách jsou takovéto úpravy založené na skutečné spotřebě krmiva nereálné. Z tohoto důvodu pak může docházet k neefektivnímu využití předkládaného množství krmiva a propočtená krmná dávka nutná k vyléčení ryb je podstatně vyšší. U obou testovaných skupin (Pramik 1 a Pramik 2) ve všech provedených parazitologických vyšetřeních bylo vždy nalezeno několik ryb zcela vyléčených, i přestože prevalence infekce na počátku pokusu činila 100 %. Téměř úplného vyléčení bylo dosaženo u skupiny Pramik 1 po předpokládaném příjmu $900 \text{ mg PQ} \cdot \text{kg}^{-1}$ hmotnosti obsádky (páté parazitologické vyšetření), kdy byl průměrný počet motolic na rybu menší než 1 (0,2) s prevalencí 20 %. Vzhledem k nízkému počtu ryb v našem provedeném pokusu, nebylo možné dosáhnout úplné eliminace metacerkárií *Diplostomum spathaceum*, dá se ale předpokládat, že v případě Pramiku 1 by stačila už jen jedna další dávka v množství $100 \text{ mg PQ} \cdot \text{kg}^{-1}$ hmotnosti obsádky a bylo by dosaženo úplné eliminaci metacerkárií *D. spathaceum*. Vhodné aplikační schéma PQ s použitím Pramiku 1 by tedy bylo podání $1000 \text{ mg PQ} \cdot \text{kg}^{-1}$ hmotnosti obsádky. Ve srovnání s jinými studii zabývajícími se eliminací metacerkárií *D. spathaceum* u ryb je spotřeba PQ v našem pokusu vyšší. Bylund *et Sumari* (1981) uvádí $50 \text{ mg PQ} \cdot \text{kg}^{-1}$ hmotnosti obsádky u pstruha duhového, Székely *et Molnár* (1991) $330 \text{ PQ} \cdot \text{kg}^{-1}$ hmotnosti obsádky u amura bílého a tolstolobika bílého a Zusková *et al.* (2015) $600 \text{ mg PQ} \cdot \text{kg}^{-1}$ hmotnosti obsádky u amura bílého. Tento rozdíl může být způsoben testováním ryb v různých věkových kategoriích, které se liší fyziologickými a metabolickými pochody v těle a celkovou odolností organismu. Plůdek v raných vývojových stádiích má omezenou schopnost trávení potravy z důvodu plně nevyvinutých enzymatických štěpných systému (Dubský *et al.*, 2003), čímž mohlo docházet ke sníženému příjmu PQ z potravy. Z ekonomického hlediska, by bylo také vhodné celkovou dávku aplikovaného PQ rozložit, vložením delší pauzy v průběhu krmení, jako tomu je ve studii Zusková *et al.* (2015). Došlo by tak k prodloužení účinnosti PQ v rybách a snížení celkového množství aplikovaného PQ v průběhu medikace. Vzhledem k tomu, že jsme v našem pokusu komerčně vyráběnou krmnou směs Pramik rozdrtili na požadovanou velikost, kterou byl schopen testovaný plůdek ryb požit, mohlo zde také dojít k rozdílné distribuci PQ v podávaném krmivu, v porovnání se studií Zusková *et al.* (2015), kde bylo rybám podáváno krmivo přímo od výrobce bez rozdrčení, jekož velikost ryb (násada) to nevyžadovala. Z tohoto důvodu je možné, že k úplné eliminaci metacerkárií *D. spathaceum* u amura bílého v našem pokusu bylo zapotřebí vyšší množství PQ než ve studii Zusková *et al.* (2015).

Vyšší množství aplikovaného PQ k dosažení eliminace metacerkárii *D. spathaceum*, je také pochopitelné ve srovnání se studiemi zabývajícími se eliminací ektoparazitů ryb (Kim *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2007), kde nemusí docházet k prostupu léčiva skrz cévy až do oka jedince. A tím pádem je zapotřebí nižší množství aplikovaného PQ pro dosažení úplné eliminace parazitů. Ve studii Kim *et al.* (2001) postačuje k eliminaci *Microcotyle sebastis* 200 mg PQ.kg⁻¹ hmotnosti obsádky u druhu *Sebastes schlegeli* a ve studii Williams *et al.* (2007) k eliminaci *Zeuxapta seriolae* a *Benedenia seriolae* 150 mg PQ.kg⁻¹ hmotnosti obsádky u druhu *Seriola lalandi*.

5.2. Testování účinnosti mebendazolu na infekci způsobenou metacerkáriemi *Diplostomum spathaceum*

Přestože mebendazol nebyl při léčbě Trematod u ryb doposud používán, jeví se tato látka jako vhodné antiparazitikum pro testování, neboť velice dobře eliminuje různé parazitické druhy zástupců tříd Monogenií u ryb (Svobodová *et al.*, 1990; Buchmann *et al.*, 1992; Varriale *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 2001; Chagas *et al.*, 2016) a Cestod (Durán *et al.*, 1989) tak i u domácích a hospodářských zvířat (Dayan, 2003; Dobšíková *et al.*, 2012). Dalším důvodem proč byla tato látka vybrána, byl fakt, že pro případnou aplikaci v rybářské praxi není potřeba žádat o výjimku Státní veterinární správu ČR, jako je tomu v případě praziquantelu, který lze podávat hospodářským zvířatům určeným ke konzumaci pouze v odůvodněných případech a na vlastní zodpovědnost veterinárního lékaře. V našem pokusu neměl mebendazol ve srovnání s kontrolní skupinou žádné statisticky průkazné výsledky, jak v jednotlivých parazitologických vyšetřeních, tak i napříč všemi parazitologickými vyšetřeními stejně jako ve studii Katharios *et al.* (2006). Při prvním parazitologickém vyšetření byl předpokládán příjem 300 mg MB.kg⁻¹ hmotnosti obsádky a ve čtvrtém 900 mg MB.kg⁻¹ hmotnosti obsádky. To jsou poměrně podobné dávky ve srovnání se studiemi, u nichž bylo pro eliminaci parazitů zapotřebí podání dávky 450 mg MB.kg⁻¹ hmotnosti obsádky u druhu *Scophthalmus maximus* (Durán *et al.*, 1989) a 1000 mg MB.kg⁻¹ hmotnosti obsádky u druhu *Colossoma macropomum* (Chagas *et al.*, 2016). Kromě toho, že během pokusu nebyly prokázány žádné léčivé účinky mebendazolu, byl zároveň zaznamenán masivní úhyn ryb, především mezi druhým a třetím parazitologickým vyšetřením, kdy byl předpokládán příjem 500 mg MB.kg⁻¹ hmotnosti obsádky. Zároveň byl

zaznamenán úhyn ryb v obou MB akváriích, což podle námi zjištěných symptomů (nechutensví, podvýživa, ztráta hmotnosti, překrvená žábra, zrychlené dýchání, mírně zahleněné tělo, krváčeniny v očích, nehomogenní a zvětšená játra) poukazuje na toxicitu MB podávaného v medikované krmné směsi u plůdku amura bílého.

6. Závěr

V našem pokusu byla potvrzena účinnost medikované krmné směsi Pramik v obou koncentracích (Pramik 1, Pramik 2), s účinnou látkou praziquantel, toto krmivo je tedy vhodné k léčbě diplostomózy ryb. K dosažení úplné eliminace metacerkárií *Diplostomum spathaceum* v oční čočce by bylo zapotřebí, aby ryby v předkládaném krmivu Pramik 1 zkonzumovaly ještě jednu dávku v množství $100 \text{ mg PQ.kg}^{-1}$ hmotnosti obsádky, tím by byla dosažena celková dávka přijatého PQ $1000 \text{ mg PQ.kg}^{-1}$ hmotnosti obsádky. Z ekonomického hlediska by bylo vhodné celkovou dávkou aplikovaného PQ rozložit, vložím delší pauzy v průběhu krmení, jako tomu je ve studii Zusková *et al.* (2015). Došlo by tak k prodloužení účinnosti PQ v rybách a snížení celkového množství aplikovaného PQ v průběhu medikace. K aplikacím PQ se však může přistoupit jen v odůvodněných případech ohrožujících život ryb na povolení Státní veterinární správy ČR, jelikož není doposud registrován pro druhy zvířat, určené ke konzumaci a podání tohoto léčiva je tak s povolením SVS na vlastní zodpovědnost veterinárního lékaře (Kolářová *et Nepejchalová*, 2015). Zároveň není možné provádět preventivní krmení rybí obsádky tímto léčivem, jelikož PQ se také používá v humánní medicíně k léčbě závažných onemocnění způsobených parazity a hrozil by rozvoj rezistence vůči PQ (Ismail, 1999). V našem pokusu bylo také zjištěno, že mebendazol je na léčbu diplostomózy u ryb zcela nevhodný.

7. Seznam použité literatury

- Aksenova, O. V., Bespalaya, Y. V., Bolotov, I. N. & Kondakov, A. V. (2016). First molecular identification of *Diplostomum spathaceum* (Rudolphi, 1819) (*Trematoda: Digenea*) from an intermediate host *Radix auricularia* (L., 1758) (*Gastropoda: Lymnaeidae*) in Russia. *Biharean Biologist*, 10(2): 90–92.
- Andrews, P., Thomas, H., Pohlke, R. & Seubert, J. (1983). Praziquantel. *Medicinal Research Reviews*, 3:147–200.
- Baruš, V. & Oliva, O. (1995). *Mihulovci a ryby (2). Fauna ČR a SR*. Academia, Praha. 698 p. ISBN: 80–200–0218–9.
- Ben-Ami, F. & Heller, J. (2001). Biological control of aquatic pest snails by the black carp *Mylopharyngodon piceus*. *Biological Control*, 22(2): 131–138.
- Björklund, H. & Bylund, G. (1987). Absorption, distribution and excretion of the anthelmintic praziquantel (Droncit) in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Zeitschrift für Parasitenkunde-Parasitology Research*, 73: 240–244.
- Blasco-Costa, I., Faltýnková, A., Georgieva, S., Skírnisson, K., Scholz, T. & Kostadinova, A. (2014). Fish pathogens near the Arctic Circle: molecular, morphological and ecological evidence for unexpected diversity of *Diplostomum* (Digenea: Diplostomidae) in Iceland. *International Journal for Parasitol*, 44: 703–15.
- Brabec, J., Kostadinova, A., Scholz, T. & Littlewood, D. T. J. (2015). Complete mitochondrial genomes and nuclear ribosomal RNA operons of two species of *Diplostomum* (Platyhelminthes: Trematoda): a molecular resource for taxonomy and molecular epidemiology of important fish pathogens. *Parasites & Vectors*, 8(1): 336.
- Buchmann, K. (1986). The effects of praziquantel on the monogenean gill parasite *Pseudodactylogyrus bini*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 28(3–4): 447–450.
- Buchmann, K., Roepstorff, A. & Waller, P. J. (1992). Experimental selection of mebendazole-resistant gill monogeneans from the European eel, *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Diseases*. 15: 393–408.
- Buchmann, K. & Uldal, A. (1994). Effects of eyefluke infections on growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in a mariculture system. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 14: 104.
- Bylund, G. & Sumari, O. (1981). Laboratory tests with Droncit against diplostomiasis in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases*, 1: 259–264.

- Cioli, D. & Pica-Mattoccia, L. (2003). Praziquantel. *Parasitology Research*, 90: 3–9.
- Combes, C., Bartoli, P. & Théron, A. (2002). Trematode transmission strategies, p. 1–12. In: Lewis, E. E., Campbell, J. F., Sukhdeo, M. V. K. (Eds.). *The Behavioral Ecology of Parasites*, CABI Publishing, New York, 359 p.
- Corrêa, G. L. B. (1999). Antihelmínticos e sua importância no controle de zoonoses parasitárias, In: Magalhães, H. M. (Eds.). *Farmacologia veterinária. Agropecuária*, Guaíba, 17–39.
- Cribb, T. H., Bray, R. A., Olson, P. D. & Littlewood, D. T. J. (2003). Life cycle evolution in the Digenea: a new perspective from phylogeny. *Advances in Parasitology*, 54: 197–254.
- Crowden, A. E. & Broom, D. M. (1980). Effects of the eyefluke, *Diplostomum spathaceum*, on the behaviour of dace (*Leuciscus leuciscus*). *Animal Behaviour*, 28(1): 287–294.
- Cunningham, F. M., Elliott, J. & Lees, P. (2010). *Comparative and veterinary pharmacology* (Vol. 199). Springer. Berlin. 348 p. ISBN: 978–3–642–10323–0.
- Čítek, J., Svobodová, Z. & Tesarčík, J. (1997). *Nemoci sladkovodních a akvarijských ryb*. Informatorium, Praha. 264 p. ISBN: 80–85927–55–1.
- Dayan, A. D. (2003). Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*, 86(2): 141–159.
- De Winter, J. C. & Dodou, D. (2010). Five-point Likert items: t-test versus Mann-Whitney-Wilcoxon. *Practical Assessment, Research & Evaluation*, 15(11): 1–12.
- Dobšíková, R., Šíroková, Z. & Blahová, J. (2012). *Farmakologie v produkci potravin pro posluchače Fakulty veterinární hygieny a ekologie; Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie; Veterinární a farmaceutická univerzita Brno; 1. vydání*. Brno. 152 p. ISBN: 978–80–7305–616–2.
- Doenhoff, M. J., Cioli, D., & Utzinger, J. (2008). Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21(6): 659–667.
- Dubský, K., Kouřil, J. & Šrámek, V. (2003). *Obecné rybářství*. 1. vydání. Informatorium, 308 p. ISBN: 80–7333–019–9.
- Durán, M. S., Caamaño-García, F., Leiro, J. & Ubeira, F. M. (1989). Anthelmintic activity of praziquantel, niclosamide, netobimin and mebendazole against *Bothriocephalus scorpii* naturally infecting turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 76(3–4): 199–201.

- Esch, G. W., Curtis, L. A. & Barger, M. A. (2001). A perspective on the ecology of trematode communities an snails. *Parasitology*, 123: 57–75.
- Esch, G. W., Barger, M. A. & Fellis, J. K. (2002). The transmission of digenetic trematodes: style, elegance, complexity. *Integrative and Comparative Biology*, 42: 304–312.
- Field, J. S. & Irwin, S. W. B. (1994). The epidemiology, treatment and control of diplostomiasis on a fish farm in Northern Ireland. In: Pike, A. W & Lewis J. W. (Eds.) *Parasitic diseases of fish*. Samara, Wales. 251 p. ISBN: 978–1873692028.
- Frayha, G. J., Smyth, J. D., Gobert, J. G. & Savel, J. (1997). The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. *General Pharmacology: The Vascular System*, 28(2): 273–299.
- Galaktionov, K. V. & Dobrovolskij, A. A. (2003). *The Biology and Evolution of Trematodes*. Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, The Netherlands, 620 p. ISBN: 978–90–481–6430–1.
- Georgieva, S., Soldánová, M., Pérez-del-Olmo, A., Dangel, D. R., Sitko, J., Sures, B. & Kostadinova, A. (2013). Molecular prospecting for European Diplostomum (Digenea: Diplostomidae) reveals cryptic diversity. *International Journal for Parasitology*, 43(1): 57–72.
- Gönnert, R. & Andrews, P. (1977). Praziquantel, a new broadspectrum antischistosomal agent. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 52: 129–150.
- Hanel, L. & Lusk, S. (2005). *Ryby a mihule České republiky: rozšíření a ochrana*. Český svaz ochránců přírody Vlašim. Vlašim. 448 p. ISBN: 80–86327–49–3.
- Hartman, P. & Regenda, J. (2014). *Praktika v rybníkářství*. FROV JU, Vodňany, 375 p. ISBN 978–80–7514–009–8.
- Heckmann, R. A. (1987). The efficacy of praziquantel and ivermectin against selected helminths of fishes. Abstracts of papers read at the 2nd International Symposium of Ichthyoparasitology, 27 Sept–3 Oct. 1987, Tihany, Hungary, 25 p.
- Hoffman, G. L. (1999). *Parasites of North American freshwater fishes*. Cornell University Press. 2. vydání, Ithaca, 539 p. ISBN: 0–80–14–3409–2.
- Höglund, J. & Thulin, J. (1992). Identification of *Diplostomum* spp. in the retina of perch *Perca fluviatilis* and the lens of roach *Rutilus rutilus* from the Baltic Sea—an experimental study. *Systematic Parasitology*, 21:1–19.
- Chagas, E. C., de Araújo, L. D., Martins, M. L., Gomes, L. C., de Oliveira Malta, J. C., Varella, A. B. & Jerônimo, G. T. (2016). Mebendazole dietary supplementation controls Monogenoidea (Platyhelminthes: Dactylogyridae) and does not alter the

- physiology of the freshwater fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Aquaculture*, 464: 185–189.
- Chappell, L. H., Hardie, L. J. & Secombes, C. J. (1994). Diplostomiasis: the disease and host-parasite interactions. In: Pike, A. W. & Lewis, J. W., (Eds.). *Parasitic diseases of fish*. Tresaith, Dyfed, U.K.: Samara Publishing Ltd; 1994. 59–86 p. ISBN: 978–1873692028.
- Chappell, L. H. (1995). The biology of diplostomatid eyeflukes of fishes. *Journal of Helminthology*, 69: 97–101.
- Iles, A. C., Archdeacon, T. P. & Bonar, S. A. (2012). Novel praziquantel treatment regime for controlling asian tapeworm infections in pond-reared fish. *North American Journal of Aquaculture*, 74(1): 113–117.
- Ismail, M., Botros, S., Metwally, A., William, S., Farghally, A., Tao, L. F., Day, T. A. & Bennett, J. L. (1999). Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from egyptian villagers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60: 932–935.
- Justine, J. L., Leblanc, P., Keller, F. & Lester, R. J. G. (2009). Turbellarian black spot disease in bluespine unicornfish *Naso unicornis* in New Caledonia, caused by the parasitic turbellarian *Piscinquilinus* sp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 85: 245–249.
- Karvonen, A., Pauku, S., Valtonen, E. T. & Hudson, P. J. (2003). Transmission, infectivity and survival of *Diplostomum spathaceum* cercariae. *Parasitology*, 127(3): 217–224.
- Karvonen, A., Hudson, P. J., Seppälä, O. & Valtonen, E. T. (2004b). Transmission dynamics of a trematode parasite: exposure, acquired resistance and parasite aggregation. *Parasitology Research*, 92: 183–188.
- Karvonen, A., Kirsi, S., Hudson, P. J. & Valtonen, E. T. (2004a). Patterns of cercarial production from *Diplostomum spathaceum*: terminal investment or bet hedging? *Parasitology*, 129: 87–92.
- Karvonen A., Seppälä, O., Valtonen, E. T. (2004c). Eye fluke-induced cataract formation in fish: quantitative analysis using an ophthalmological microscope. *Parasitology*, 129: 473–478.
- Karvonen, A., Hakalahti, T., Seppälä, O., & Valtonen, E. T. (2005). *Sustainable production of healthy fish: tackling parasitic – threats with knowledge on their ecology*. In: Jalkanen, A. & Nygren, P., (Eds.). *Sustainable use of renewable natural resources – from principles to practices*. University of Helsinki

Department of Forest Ecology, Publication 34, Helsinki, 12 p. ISBN: 952-10-2817-3.

- Karvonen, A. & Seppälä, O. (2008). Eye fluke infection and lens size reduction in fish: a quantitative analysis. *Diseases of Aquatic Organisms*, 80: 21–26.
- Katharios, P., Papandroulakis, N. & Divanach, P. (2006). Treatment of *Microcotyle* sp. (Monogenea) on the gills of cage-cultured red porgy, *Pagrus pagrus* following baths with formalin and mebendazole. *Aquaculture*, 251(2): 167–171.
- Kearn, G. C. (1998). *Parasitism and the Platyhelminthes*. Chapman & Hall, London, U.K., 544 p. ISBN: 0412804603.
- Kim, K. H., Park, S. I. & Jee, B. Y. (1998). Efficacy of oral administration of praziquantel and mebendazole against *Microcotyle sebastis* (Monogenea) infestation of cultured rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Fish Pathology*, 33(5): 467–471.
- Kim, K. H., Lee, E. H., Kwon, S. R. & Cho, J. B. (2001). Treatment of *Microcotyle sebastis* infestation in cultured rockfish *Sebastes schlegeli* by oral administration of praziquantel in combination with cimetidine. *Diseases of Aquatic Organisms*, 44(2): 133–136.
- Krum, H., Gillette, D. & Lewbert, G. A. (1992). Pathology and treatment of encysted digenean metacercaria in the catfish, *Corydoras schwartzii*, Hong Kong. In: *Proceeding of the 23rd Annual international Association for Aquatic Animal medicine conference*, 118 p.
- Kolářová, J. & Nepejchalová, L. (2015). Možnosti léčby parazitóz v chovech ryb v ČR. In: Kolářová, J. & Piačková, V. (Eds.). *Ochrana zdraví ryb 2015*, 1.–2. 4. 2015; Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, 66–69 p. ISBN: 978-80-7514-029-6.
- Lamka, J. & Ducháček, L. (2014). *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. Karolinum Press, Praha, 152 p. ISBN: 978-80-246-2822-6.
- Larsen, A. H., Bresciani, J. & Buchmann, K. (2005). Pathogenicity of *Diplostomum cercariae* in rainbow trout, and alternative measures to prevent diplostomosis in fish farms. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 25(1): 20–27.
- Larsen, A. H., Bresciani, J. & Buchmann, K. (2005). Pathogenicity of *Diplostomum cercariae* in rainbow trout, and alternative measures to prevent diplostomosis in fish farms. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 25(1): 20–27.
- Locke, S. A., McLaughlin, J. D., Dayanandan, S. & Marcogliese, D. J. (2010). Diversity and specificity in *Diplostomum* spp. metacercariae in freshwater fishes revealed

- by cytochrome c oxidase I and internal transcribed spacer sequences. *International Journal for Parasitology*, 40: 333–343.
- Lorio, W. J. (1989). Experimental control of metacercariae of the yellow grub *Clinostomum marginatum* in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1(4): 269–271.
- Lyholt, H. C. K. & Buchmann, K. (1996) *Diplostomum spathaceum*: effects of temperature and light on cercarial shedding and infection of rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, 25: 169–173.
- Mann, H. B. & Whitney, D. R. (1947). On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *The annals of mathematical statistics*, 18(1): 50–60.
- Marcogliese, D. J., Compagna, S., Bergeron, E. & McLaughlin, J. D. (2001). Population biology of eyeflukes in fish from a large fluvial ecosystem: the importance of gulls and habitat characteristics. *Canadian Journal of Zoology*, 79: 1102–1113.
- Martins, M. L., Onaka, E. M., Moraes, F. R. & Fujimoto, R. Y. (2001). Mebendazole treatment against *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea, Dactylogyridae) gill parasite of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes, Characidae) in Brazil. Efficacy and hematology. *Acta Parasitologica*, 46(4): 332–336.
- McKeown, C. A. & Irwin, S. W. B. (1995). The life cycle stages of three *Diplostomum* species maintained in the laboratory. *International Journal for Parasitology*, 25: 897–906.
- McKnight, P. E. & Najab, J. (2010). Kruskal-Wallis Test. *Corsini Encyclopedia of Psychology*. John Wiley & Sons, Inc. DOI: 10.1002/9780470479216.corpsy0491
- Mitchell, A. J. (2004). Effectiveness of praziquantel bath treatments against *Bothriocephalus acheilognathi* in grass carp. *Journal of Aquatic Animal Health*, 16(3): 130–136.
- Mitchell, A. J. & Hobbs, M. S. (2007). The acute toxicity of praziquantel to grass carp and golden shiners. *North American Journal of Aquaculture*, 69(3): 203–206.
- Mitchell, A. & Darwish, A. (2009). Efficacy of 6-, 12-, and 24-h praziquantel bath treatments against Asian tapeworms *Bothriocephalus acheilognathi* in grass carp. *North American Journal of Aquaculture*, 71: 30–34.
- Moser, M. & Sakanari, J. (1986). The effects of praziquantel in various larval and adult parasites from freshwater and marine snails and fish. *Journal of Parasitology*, 72(1): 175–176.

- Nagano, T. & Isshiki, T., Sakamoto, H., Ueda, Y. (2003). Therapeutical trial for blood fluke infection in Japanese Spanish mackerel. *Bulletin of the Kagawa Prefectural Fisheries Experimental Station 2001*, 97–98 p.
- Niewiadomska, K. (1986). Verification of the life-cycles of *Diplostomum spathaceum* (Rudolphi, 1819) and *Diplostomum pseudospathaceum* (Niewiadomska, 1984) (Trematoda, Diplostomatidae). *Systematic Parasitology*, 8: 23–31.
- Niewiadomska, K. (1987). *Diplostomum paracaudum* (Iles, 1959) Shigin, 1977 (Digenea, Diplostomidae) and its larval stages – a new record from Poland. *Acta Parasitologica Polonica*, 31: 199–210.
- Niewiadomska, K. & Laskowski, Z. (2002). Systematic relationships among six species of *Diplostomum* Nordmann, 1832 (Digenea) based on morphological and molecular data. *Acta Parasitologica*, 47(1): 20–28.
- Noga, E. J. (1995). *Fish Disease – Diagnosis and Treatment*. Mosby-Year Book, St. Louis, 1. vydání, Missouri, 367 p. ISBN: 978–1–5566–4374–3.
- Noga, E. J. (2010). *Fish Disease – Diagnosis and Treatment*. Iowa State University Press, Wiley-Blackwell, 2. vydání, Ames, 519 p. ISBN: 978–0–8138–0697–6.
- Nordstokke, D. W. & Zumbo, B. D. (2010). A new nonparametric Levene test for equal variances. *Psicologica: International Journal of Methodology and Experimental Psychology*, 31(2): 401–430.
- Nordstokke, D. W., Zumbo, B. D., Cairns, S. L. & Saklofske, D. H. (2011). The operating characteristics of the nonparametric Levene test for equal variances with assessment and evaluation data. *Practical Assessment, Research & Evaluation*, 16(5): 1–8.
- Owen, S. F., Barber, I. & Hart P. J. B. (1993). Low level infection by eye fluke, *Diplostomum* spp., affects the vision of three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. *Journal of Fish Biology*, 42(5): 803–806.
- Plumb, J. A. & Rogers, W. A. (1990). Effect of Droncit (praziquantel) on yellow grubs *Clinostomum marginatum* and eye flukes *Diplostomum spathaceum* in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2(3): 204–206.
- Pool, D., Ryder, K. & Andrews, C. (1984). The control of *Bothriocephalus acheilognathi* in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*, using praziquantel. *Aquaculture Research*, 15(1): 31–33.
- Pylkkö, P., Suomalainen, L. R., Tirola, M. & Valtonen, E. T. (2006). Evidence of enhanced bacterial invasion during *Diplostomum spathaceum* infection

- in European grayling, *Thymallus thymallus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 29(2): 79–86.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M. & Moore, P. K. (2007). *Farmacologia*. Rio de Janeiro. 810 p. ISBN: 978–8481747454.
- Ratanarat-Brocklemanm, CH. (1974). Migration of *Diplostomum spathaceum* (Trematoda) in the fish intermediate host. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 43: 123–134.
- Razali, N. M. & Wah, Y. B. (2011). Power comparisons of shapiro–wilk, kolmogorov–smirnov, lilliefors and anderson–darling tests. *Journal of statistical modeling and analytics*, 2(1): 21–33.
- Rehbein, S., Visser, M., Yoon, S. & Marley, S. E. (2007). Efficacy of a combination ivermectin/praziquantel paste against nematodes, cestodes and bots in naturally infected ponies. *Veterinary Record*, 161: 722–724.
- Rellstab, C., Louhi, K. R., Karvonen, A. & Jokela, J. (2011). Analysis of trematode parasite communities in fish eye lenses by pyrosequencing of naturally pooled DNA. *Infection, Genetics Evolution*, 11: 1276–1286.
- Rintamäki-Kinnunen, P., Karvonen, A., Anttila, P. & Valtonen, E. T. (2004): *Diplostomum spathaceum* metacercarial infection and colour change in salmonid fish. *Parasitology Research*, 93: 51–55.
- Riviere, J. E., & Papich, M. G. (2009). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*; Iowa State University Press a Blackwell Publishing company Wiley-Blackwell, 1500 p. ISBN: 978–0–8138–2061–3.
- Roberts, L. S. & Janovy, J. (2005). *Foundations of parasitology*. McGraw-Hill, Boston, U.S.A., 702 p. ISBN: 978–0071252515.
- Semenas, L. (1998). Primer registro de diplostomiasis ocular en trucha arco iris cultivada en Patagonia (Argentina). *Archivos de medicina veterinaria*, 30(2): 165–170.
- Seppälä, O., Karvonen, A. & Valtonen, E. T. (2004). Parasite-induced change in host behaviour and susceptibility to predation in an eye fluke-fish interaction. *Animal Behaviour*, 68: 257–263.
- Seppälä, O., Karvonen, A. & Valtonen, E. T. (2005a). Manipulation of fish host by eye flukes in relation to cataract formation and parasite infectivity. *Animal Behaviour*, 70: 889–894.
- Seppälä, O., Karvonen, A. & Valtonen, E. T. (2005b). Impaired crypsis of fish infected with a trophically transmitted parasite. *Animal Behaviour*, 70: 895–900.

- Seppälä, O., Karvonen, A. & Valtonen, E. T. (2008). Shoaling behaviour of fish under parasitism and predation risk. *Animal Behaviour*, 75: 145–150.
- Shapiro, S. S. & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3–4): 591–611.
- Shariff, M., Richards, R. H. & Sommerville, C. (1980). The histopathology of acute and chronic infections of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson with eye flukes, *Diplostomum* spp. *Journal of Fish Diseases*, 3: 455–465.
- Shirakashi, S., Andrews, M., Kishimoto, Y., Ishimaru, K., Okada, T., Sawada, Y., & Ogawa, K. (2012). Oral treatment of praziquantel as an effective control measure against blood fluke infection in Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Aquaculture*, 326: 15–19.
- Staudt U., Schmahl G., Blaschke G. & Mehlhorn, H. (1992). Light and scanning electron microscopy studies on the effects of the enantiomers of praziquantel and its main metabolite on *Schistosoma mansoni* in-vitro. *Parasitology Research*, 78: 392–397
- Sudová, E., Piačková, V., Kroupová, H., Pijáček, M. & Svobodová, Z. (2009). The effect of praziquantel applied per os on selected haematological and biochemical indices in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish physiology and biochemistry*, 35(4): 599.
- Sudová, E., Piačková, V., Velíšek, J., Pijáček, M. & Svobodová, Z. (2010). Efficacy testing of orally administered praziquantel to common carp naturally infected by Caryophyllidean tapeworms (Platyhelminthes: Eucestoda). *Acta Veterinaria*. Brno, 79(9): 73–78.
- Svobodová, Z., Vykusová, B., Kauer, V., Svoboda, M., Šedivý, D. & Votípka, P. (1990). Efficacy of therapeutic baths in the control of *Eudiplozoon nipponicum* in carp. *Buletin – Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický Vodňany*, 26(2): 3–13.
- Svobodová, Z. & Faina, R. (1992). *Prevence Diplostomózy ryb*. Edice metodik VÚRH č. 41, Vodňany. 12 p. ISBN: 80–901087–4–1.
- Svobodová, Z., Kolářová, J., Navrátil, S., Veselý, T., Chloupek, P., Tesarčík, J. & Čítek, J. (2007). *Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb*, 4. přepracované vydání. Informatorium, Praha, 264 p. ISBN: 978–80–7333–051–4.
- Székely, C. & Molnár, K. (1991). Praziquantel (Droncit) is effective against diplostomosis of grasscarp *Ctenopharyngodon idella* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 11(2): 147–150.

- Thomas, H. & Gönner, R. (1977). The efficacy of praziquantel against cestodes in animals. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 52: 117–127.
- Treves-Brown, K. M. (2000). *Applied Fish Pharmacology*. Kluwer Academic Publishers, London, 309 p. ISBN: 978-0-412-62180-2.
- Tubbs, L. A. & Tingle, M. D. (2006). Effect of dose escalation on multiple dose pharmacokinetics of orally administered praziquantel in kingfish *Seriola lalandi*. *Aquaculture*, 261(4): 1168–1174.
- Tubbs, L., Mathieson, T. & Tingle, M. (2008). Metabolism of praziquantel in kingfish *Seriola lalandi*. *Diseases of aquatic organisms*, 78(3): 225–233.
- Valtonen, E. T. & Gibson, D. I. (1997). Aspects of the biology of diplostomid metacercarial (Digenea) populations occurring in fishes in different localities of northern Finland. *Annales Zoologici Fennici*, 34: 47–59.
- Varriale, A. M. C., Cecchini, S. & Saroglia, M. (1992). Therapeutic trials against the *Diplectanum aequans* (Monogenea), parasite of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in intensive farming. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 12: 204–206.
- Volf, P. & Horák, P. (2007). *Paraziti a jejich biologie*. Triton, Praha, 318 p. ISBN: 978-80-7387-008-9.
- Voutilainen, A., Figueiredo, K. & Huuskonen, H. (2008). Effects of the eye fluke *Diplostomum spathaceum* on the energetics and feeding of Arctic charr *Salvelinus alpinus*. *Journal of Fish Biology*, 73(9): 2228–2237.
- Voutilainen, A., Saarinen, M., Suonpää, A. & Taskinen, J. (2009). In vitro efficacy of praziquantel against the cercariae of *Diplostomum* sp., *Rhipidocotyle fennica* and *R. campanula*. *Journal of fish diseases*, 32(10): 907–909.
- Ward, D. L. (2007). Removal and quantification of Asian tapeworm from bonytail chub using praziquantel. *North American Journal of Aquaculture*, 69(3): 207–210.
- Whyte, S. K., Secombes, C. J. & Chappell, L. H. (1991). Studies on the infectivity of *Diplostomum spathaceum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Helminthology*, 65: 169–178.
- Williams, R. E., Ernst, I., Chambers, C. B. & Whittington, I. D. (2007). Efficacy of orally administered praziquantel against *Zeuxapta seriolae* and *Benedenia seriolae* (Monogenea) in yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 77: 199–205.
- Wu, M. H., Wei, C. C., Xu, Z. Y., Yuan, H. C., Lian, W. N., Yang, Q. J., Chen, M., Jiang, Q. W., Wang, C. Z. & Zhang, S. J. (1991). Comparison of the therapeutic

- efficacy and side effects of a single dose of levo-praziquantel with mixed isomer praziquantel in 278 cases of *Schistosomiasis japonica*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 45: 345–349.
- Xiao, S. H. & Catto, B. A. (1989). Comparative in vitro and in vivo activity of racemic praziquantel and its levorotated isomer on *Schistosoma mansoni*. *Journal of Infectious Diseases*, 159: 589–592
- Yamamoto, S., Shirakashi, S., Morimoto, S., Ishimaru, K. & Murata, O. (2011). Efficacy of oral praziquantel treatment against the skin fluke infection of cultured chub mackerel, *Scomber japonicus*. *Aquaculture*, 319: 53–57.
- Zusková, E. (2015). Strategie léčby parazitárních onemocnění kaprovitých ryb [Technická zpráva pilotního projektu – registrační číslo: CZ.1.25/3.4.00/13.00450], Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, 22 p.
- Zusková, E., Velíšek, J., Chupani, L. & Máchová, J. (2015). Testování účinnosti praziquantelu při léčbě vybraných helmintóz ryb. In: Kolářová, J. & Piačková, V. (Eds.). *Ochrana zdraví ryb 2015*, Vodňany, 1.–2. 4. 2015; Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 66–69 p. ISBN 978–80–7514–029–6.

8. Seznam zkratk

ATP – Adenosintrifosfát

FROV – Fakulta rybářství a ochrany vod

GIT – gastrointestinální trakt

KP1 – granulované krmivo kondiční určené pro rozkrm kapřího plůdku

LC-MS/HRMS – chromatografie s hybridní tandemovou hmotnostní spektrometrií

MB – mebendazol

PQ – praziquantel

SOP – standardní operační postup

SVS – Státní veterinární správa ČR

ÚSKVBL – Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv

VÚRH – Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

48h EC50 – efektivní koncentrace testovaného vzorku, která způsobí úhyn nebo imobilizaci 50 % testovaných organismů za 48 hodin

24h LC50 – letální koncentrace testovaného vzorku, která způsobí úhyn 50 % testovaných organismů za 24 hodin

96h LC50 – letální koncentrace testovaného vzorku, která způsobí úhyn 50 % testovaných organismů za 96 hodin

9. Abstrakt

V této práci byla testována účinnost perorálně podávaného praziquantelu (PQ) ve dvou koncentracích (Pramik 1 a Pramik 2) a mebendazolu (MB) na metacerkárie motolice oční (*Diplostomum spathaceum*, Rudolphi, 1819) u amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*, Valenciennes, 1844). Přirozeně infikované ryby (průměrná hmotnost na rybu \pm směrodatná odchylka činila $1,6 \pm 0,1$ g) byly rozděleny do čtyř skupin, pro každou testovanou skupinu (Pramik 1, Pramik 2 a MB) připadaly dvě stolitrová akvária po 25 rybách a pro kontrolní skupinu tři stolitrová akvária po 25 rybách. Rybám v jednotlivých skupinách bylo předkládáno medikované krmivo s obsahem praziquantelu (Pramik 1 – $2,5 \text{ g PQ.kg}^{-1}$ krmiva, Pramik 2 – $1,25 \text{ g PQ.kg}^{-1}$ krmiva) a medikovaná krmná směs KP1 obohacená o mebendazol ($2,5 \text{ g MB.kg}^{-1}$ krmiva). Kontrolní skupina byla krmena směsí KP1 bez přídavku léčiva. V průběhu testu byla prováděna parazitologická vyšetření oční čočky, byla zaznamenávána prevalence a intenzita infekce. U skupiny ryb krmené medikovanou směsí s obsahem MB nebyly v průběhu testu zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly intenzity infekce poukazující na potenciál MB v boji proti této infekci ryb. U testovaných skupin ryb krmených medikovanou krmnou směsí s obsahem PQ (Pramik 1, Pramik 2) byl prokázán statisticky významný rozdíl v intenzitě infekce ve srovnání s kontrolní skupinou již po prvním vyšetření (předpokládaná dávka zkonsumovaného PQ.kg^{-1} hmotnosti obsádky = 500 a 250 mg). K téměř úplné eliminaci motolice oční došlo u skupiny krmené směsí Pramik 1 po předpokládaném zkonsumování $900 \text{ mg PQ.kg}^{-1}$ hmotnosti obsádky. Statisticky významné rozdíly intenzity infekce u PQ léčených skupin ryb v porovnání s kontrolními skupinami poukazují na využitelnost medikovaného krmiva s obsahem PQ v boji proti diplostomóze ryb.

Klíčová slova: antiparazitika, praziquantel, mebendazol, *Diplostomum spathaceum*, diplostomóza, metacerkárie, *Ctenopharyngodon idella*

10. Abstract

In this thesis, the efficiency of orally applied praziquantel (PQ) in two concentrations (Pramik 1 and Pramik 2) and mebendazole (MB) were tested on metacercaria of eye flukes (*Diplostomum spathaceum*, Rudolphi, 1819) in the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*, Valenciennes, 1844). Naturally infected fish (average fish weight \pm standard deviation was 1.6 ± 0.1 g) were divided into four groups, for each tested group (Pramik 1, Pramik 2 and MB) belonged two aquariums of 100 liters each with 25 fish and for a control group belonged three aquariums of 100 liters each with 25 fish. The fish in the individual groups were fed with medicated feed containing praziquantel (Pramik 1 - 2.5 g PQ. kg⁻¹ of feed, Pramik 2 - 1.25 g PQ. kg⁻¹ of feed) and medicated feed mixture KP1 enriched with mebendazole (2.5 g MB. kg⁻¹ of feed). The control group was fed with KP1 without drug addition. During the test the parasitological examinations of the ophthalmic lens were performed. The prevalence and intensity of infection were recorded. In the group of fish fed with medicated mixture containing MB, no statistically significant differences of the intensity of the infection indicating the MB potential in the fight against this fish infection were reported during the test. In the case of tested groups of fish fed with medicated feed mixture containing PQ (Pramik 1, Pramik 2), a statistically significant difference in the intensity of the infection was proved compared with the control group already after the first examination (estimated dose of consumed PQ. kg⁻¹ of weight of fish = 500 and 250 mg). Near complete elimination of the eye flukes occurred in the group fed with feed mixture Pramik 1 after the expected consumption of 900 mg PQ. kg⁻¹ of weight of fish. Statistically significant differences in the intensity of the infection in PQ treated fish groups compared to control groups indicate the usability of medicated feed containing PQ in the fight against fish diplostomosis.

Key words: antiparasitics, praziquantel, mebendazole, *Diplostomum spathaceum*, diplostomosis, metacercaria, *Ctenopharyngodon idella*