

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Ústav akvakultury

Diplomová práce

Možnosti využití kyseliny peroctové v terapii
amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*)

Autor: Bc. Pavel Šauer

Vedoucí diplomové práce: MVDr. Eliška Zusková, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Mgr. Aleš Pospíchal

Studijní program a obor: Zootechnika, Rybářství

Forma studia: prezenční

Ročník: 2. navazující

České Budějovice, 2014

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval 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. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 5.května 2014

.....

Pavel Šauer

Poděkování

Rád bych poděkoval své vedoucí MVDr. Elišce Zuskové, Ph.D. i svému konzultantovi Mgr. Alešovi Pospíchalovi, za ochotu při metodickém vedení, odborné pomoci, poskytnutých radách a cenných připomínkách tak podstatných pro vypracování této diplomové práce. Rád bych také poděkoval dr hab. Ing. Josefovi Velíškovi, Ph.D. za rady poskytnuté při práci s analyzátozem VETTEST 8008, dále také paní Iloně Prokopové a MSc. Latifeh Chupani za asistenci při odběrech krve ryb. A nejvíce bych chtěl poděkovat mé rodině, zejména svým rodičům a své snoubence za veškerou podporu a vstřícnost, které mi projevili, ve chvílích mé zaneprázdněnosti diplomovou prací. Díky patří také všem ostatním, na které jsem v tuto chvíli zapoměl, ale kteří mě podporovali a umožnili mi věnovat se této diplomové práci. Poděkování všem zmíněným za jejich pozitivní přístup patří v neposlední řadě za to, že ve mě dokázali svou podporou vyvolat nadšení pro ichthyohematologii.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta rybářství a ochrany vod
Akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Pavel ŠAUER**
Osobní číslo: **V12N008P**
Studijní program: **N4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Možnosti využití kyseliny peroctové v terapii amura bílého
(*Ctenopharyngodon idella*)**
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

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

Cílem práce je posoudit vliv kyseliny peroctové na zvolené biochemické a hematologické ukazatele a na histologický profil odebraných tkání amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*). Na podkladě zjištěných výsledků pak upřesnit, popřípadě doplnit aplikační schéma kys. peroctové pro ryby a tyto úpravy náležitě zdůvodnit.

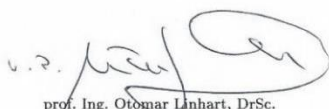
Metodický postup: Ryby budou v laboratorních podmínkách vystaveny dvěma odlišným koncentracím kyseliny peroctové. Po několikadenní opakovaně prováděné koupeli bude zhodnocen zdravotní stav ryb. Rybám bude odebrána krev pro stanovení vybraných hematologických ukazatelů. Část odebrané krve bude odstředěna a získaná plazma poslouží ke stanovení biochemických ukazatelů na přístroji VETTEST 8008. Dále budou odebrány vzorky kůže a žaber pro histologické zpracování a vyhodnocení případných strukturálních změn odebraných tkání. Získané výsledky hematologických a biochemických analýz budou porovnány s kontrolní neaplikovanou skupinou a budou statisticky vyhodnoceny. Na podkladě výsledků histologického a hematologicko - biochemického vyšetření bude posouzen vliv koupele v kys. peroctové na organismus ošetřených ryb.

Rozsah grafických prací: 5 - 10
Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná
Seznam odborné literatury:


Zusková, E., Máchová, J., Velíšek, J., Gela, D., 2011. Možnosti využití kyseliny peroctové v rybářské praxi. FROV JU Vodňany, Edice Metodik, č. 109, 26 s.
Svobodová, Z., 2007: Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb. 4. vyd., Informatorium, Praha, 264 s.
Svobodová, Z., Pravda, D., Paláčková, J., 1986: Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb. Edice metodik, VÚRH Vodňany 22, 36 s.
Kouřil, J., Svobodová, Z., Vykusová, B., Hamáčková, J., 1984: Antiparazitární a protiplísňové koupele raného plůdku kapra, býložravých ryb a sumce. Edice metodik, VÚRH Vodňany 15, 8 s.
Noga, E. J., 1996: Fish Disease. Diagnostic and Treatment. Mosby-Year Book, St. Louis, 367 pp.
Řehulka, J., 2005: Hematologická a biochemická charakteristika krve ryb při zdravotních poruchách a změnách výživy. Habilitační práce, (http://oldwww.upol.cz/fileadmin/user_upload/PrF-dokumenty/Vedicka_rada/Habilitace_a_profesury/Rehulka_Jiri/hab.prace-Rehulka.pdf), Slezské zemské muzeum v Opavě.

Vedoucí diplomové práce: MVDr. Eliška Zusková, Ph.D.
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Konzultant diplomové práce: Mgr. Aleš Pospíchal
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání diplomové práce: 7. prosince 2012
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2014


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

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


doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 14. února 2013

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Literární přehled.....	10
2.1. Testování léčiv	10
2.1.1. Formy aplikace léčiv	10
2.1.2. Testy snášenlivosti	11
2.1.3. Malachitová zeleň a další alternativní léčiva	11
2.2. Kyselina peroctová.....	12
2.2.1. Využití kyseliny peroctové v terapii ryb.....	15
2.3. Parazitární infekce potenciálně reagující na aplikaci KPO.....	17
2.3.1. Protozoózy	17
2.3.1.1. Chilodonelóza (Čepelenkovitost).....	17
2.3.1.2. Ichtyobodóza (Bičivkovitost).....	20
2.3.1.3. Ichtyoftirióza (Kožovcovitost).....	22
2.3.1.4. Kryptobióza.....	24
2.3.1.5. Myxosporeózy.....	26
2.3.1.6. Piscinoodinióza (Obrněnkovitost).....	27
2.3.1.7. Trichodinózy (Brousilkovitost).....	29
2.3.1.8. Epistylóza.....	30
2.3.2. Helmintózy	32
2.3.2.1. Daktylogyróza	32
2.3.2.2. Gyrodaktylóza	34
2.3.3. Artropodózy	36
2.3.3.1. Argulóza.....	36
2.3.3.2. Ergasilóza.....	38
2.3.4. Mykózy	41
2.3.4.1. Saprolegnióza.....	41
2.3.4.2. Branchiomykóza	42
2.4. Laboratorní vyšetření hematologického profilu periferní krve.....	43
2.4.1. Odběr a stabilizace krve ryb.....	44
2.4.2. Charakteristika a stanovení hodnot červeného krevního obrazu.....	45
2.4.2.1. Erytrocyty (RBC).....	45

2.4.2.2. Počet erytrocytů	46
2.4.2.3. Hemoglobin (Hb)	46
2.4.2.4. Množství hemoglobinu	46
2.4.2.5. Hematokrit (PCV)	47
2.4.2.6. Střední objem erytrocytu (MCV)	48
2.4.2.7. Střední obsah hemoglobinu v erytrocytu (MCH)	48
2.4.2.8. Střední barevná koncentrace (MCHC)	49
2.4.3. Charakteristika a stanovení hodnot bílého krevního obrazu	49
2.4.3.1. Leukocyty (WBC)	49
2.4.3.2. Počet leukocytů	50
2.4.4. Trombocyty	50
2.5. Laboratorní vyšetření biochemického profilu periferní krve	51
2.5.1. Měření biochemických parametrů krve ryb	51
2.5.2. Glukóza (GLU)	51
2.5.3. Celkové bílkoviny (TP)	51
2.5.4. Aspartátaminotransferáza (AST)	52
2.5.5. Alaninaminotransferáza (ALT)	52
2.5.6. Kreatinkináza (CK)	53
2.5.7. Laktátdehydrogenáza (LDH)	53
3. Materiál a metodika	54
3.1 Podmínky testu	54
3.2 Hematologické vyšetření	55
3.3 Biochemické vyšetření	55
3.4 Histologické vyšetření	56
3.5 Statistické vyhodnocení	56
4. Výsledky	57
4.1. Mortalita	57
4.2. Hematologické vyšetření	57
4.3. Biochemické vyšetření	58
4.4. Histologické vyšetření	61
5. Diskuze	62
6. Závěr	67
7. Přehled použité literatury	68
8. Seznam zkratk	75

9. Seznam tabulek, obrázků a příloh	76
10. Přílohy	77
11. Abstrakt	78
12. Abstract	79

1. Úvod

Mnou zvolené téma diplomové práce jsem si vybral, protože mě zajímá tato tematika a považuji za důležité zabývat se léčbou rybích chorob. Nemoci ryb způsobují v akvakulturních chovech ekonomické ztráty. Velký problém v chovech ryb nastal na přelomu tisíciletí, kdy byla v Evropě a Severní Americe zakázána malachitová zeleň k použití v terapii ryb určených k lidskému konzumu. Tato látka je nejefektivnější *antiektoparazitikum* a *antimykotikum*. Z důvodu absence srovnatelně účinného léčiva rybích ektoparazitóz a mykóz se celosvětově přistoupilo k hledání adekvátní náhrady za tuto zakázanou látku. Jedním z alternativních léčiv je kyselina peroctová. Nedávné studie řady autorů ukazují, že kyselina peroctová má velký potenciál v terapii ryb. Kyselina peroctová je účinná na řadu parazitárních a některá plísňová onemocnění. V této práci je posuzován vliv a bezpečnost terapie kyseliny peroctové, která má silný oxidační potenciál a ve své koncentrované formě je silnou žíravinou. Předpokládá se, že kyselina peroctová může mít negativní vliv na zdravotní stav exponovaných ryb. Změny v hematologických a biochemických ukazatelích indikují odpověď organismu na terapeutický zásah. Dále bude provedeno histologické vyšetření odebraných vzorků kůže a žaber. Případné histologické změny budou vyhodnoceny a potenciálně zpřesní závěry vyvozené z vyhodnocení výsledků hematologického a biochemického vyšetření. Na základě výsledných změn bude zpřesněno aplikační schéma kyseliny peroctové pro daný druh ryb. Doposud jsou v literatuře jen velmi kusé informace o vlivu kyseliny peroctové na hematologické a biochemické ukazatele u jednotlivých druhů ryb, a proto by tato práce měla, alespoň v určité míře, tuto mezeru zaplnit.

2. Literární přehled

2.1. Testování léčiv

K léčbě a prevenci protozoálních, plísňových a bakteriálních infekcí u ryb se v minulosti jako nejúčinnější prostředek používala malachitová zeleň. Avšak ta byla k využívání u ryb určených ke konzumním účelům včetně jejich jiker na přelomu tisíciletí v Evropě a Severní Americe zakázána pro obavy z dopadů na životní prostředí a z důvodů perzistence a kancerogenního potenciálu (Matthews, 2005). Zákazem používání malachitové zeleně vyvstal pro chovatele ryb problém s léčbou povrchových mykóz a parazitóz ryb. Od té doby až doposud jsou stále testována další alternativní léčiva jako formaldehyd, peroxid vodíku, manganistan draselný, chlorid sodný, chloramin T, železan draselný a přípravky na bázi kyseliny peroctové, které se ve vhodných a ekonomicky nejpříjemnějších formách používají k léčbě ryb. (Forwood a kol., 2013; Ling a kol., 2011; Meinelt a kol., 2009; Picón-Camacho a kol., 2012a; Rinatmäki-Kinnunen a kol., 2005; Straus a Meinelt, 2009; Sudová a kol., 2010).

2.1.1. Formy aplikace léčiv

Léčebné koupele se dle doby trvání dělí na:

- ponořovací (maximálně 5 minut)
- krátkodobé (5 minut až 2 hodiny)
- dlouhodobé (2 hodiny až několik dní)

Mezi ponořovací koupele patří takové, které umožňují rychlé ošetření velkého počtu ryb při relativně vysokých dávkách účinných látek daného léčiva. Při krátkodobé koupeli se používají nižší účinné koncentrace léčebných prostředků po delší dobu působení. Koupele při krátkém transportu ryb a koupele na lovišti se řadí mezi krátkodobé koupele. Zvýšená pozornost by se měla věnovat tomu, aby doba transportu byla kratší než určená doba koupele. K dlouhodobým koupelím se řadí ošetření celých chovných nádrží a rybníků léčebnými prostředky. Před manipulací s rybami a přistoupením k aplikaci léčebných koupelí je nutné provést vyšetření zdravotního stavu

ryb a mít k dispozici výsledky vyšetření a doporučení konkrétní léčebné koupele (Svobodová a kol., 2007).

2.1.2. Testy snášenlivosti

Aplikaci terapeutické koupele by měla vždy předcházet tzv. zkouška snášenlivosti, která představuje biologický pokus na rybách s cílem zjistit neškodnost či škodlivost léčebné koupele pro danou rybí obsádku v dané koncentraci. V případě negativního účinku koupele, nebo pokud dojde k úhynu testovaných ryb, je potřeba kontaktovat osobu, jež předepsala terapii a po konzultaci snížit koncentraci daného léčiva či změnit léčbu (Kolářová a Svobodová, 2009).

2.1.3. Malachitová zeleň a další alternativní léčiva

Byly provedeny testy na průkaz perzistence a karcinogenity malachitové zeleně a jejích derivátů (leukomalachitové zeleně a chloridu malachitové zeleně) na myších a krysách. Karcinogenní účinky na játrech myši krmených leukomalachitovou zelení byly prokázány při dávce $31 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Culp a kol., 2006).

U juvenilních pstruhů duhových (*Oncorhynchus mykiss*) může být, při dlouhodobé koupeli trvající 24 hodin, použita koncentrace malachitové zeleně v rozmezí $1,25\text{--}2,25 \cdot 10^4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, aniž by malachitová zeleň způsobila úhyn (Van Heerden a kol., 2000).

Navzdory zákazu malachitové zeleně jsou v rybí svalovině v evropských chovech stále nalézána její rezidua (Bilandžić a kol., 2012). V roce 2002 byl stanoven rozhodnutím Komise Evropského společenství 2002/657/ES tzv. minimální požadovaný pracovní limit (MPPL) analytických metod, což je hodnota, která má být použita pro detekci látek, jejichž použití ve státech EU není povoleno nebo je výslovně zakázáno. Pro sumu malachitové zeleně činí tato hodnota $2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. V naší republice se vyskytly první problémy v souvislosti s pozitivními nálezy malachitové zeleně u ryb exportovaných do Švýcarska v roce 2000 (Máchová a kol., 2001). Tato skutečnost se stala impulzem pro Státní veterinární správu České republiky k dalším kontrolám cíleně zaměřeným na rezidua malachitové zeleně. Výsledky provedených kontrol jsou každoročně uváděny v Informačních bulletinech „Kontaminace potravních řetězců cizorodými látkami“ (Sudová a kol., 2007).

Předmětem výzkumu jsou také způsoby odstranění reziduí malachitové zeleně. Jako vhodný sorbent se jeví aktivní uhlí, které dokáže malachitovou zeleň z vody efektivně odstranit (Aitcheson a kol., 2000). Probíhá i testování dalších léčiv používaných nebo použitelných v rybářské praxi. Byly provedeny biologické zkoušky toxicity na kaprovi obecném (*Cyprinus carpio*), parmičce jávské (*Puntius gonionotus*) a hadohlavci páskovaném (*Channa striata*) ke zjištění letálního a subletálního efektu různých koncentrací formalínu. Plůdek *C. carpio* vystavený koncentraci $75 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ formalínu po dobu 8 týdnů vykazoval pomalejší růst vůči kontrole, ale po expozici u něj nebyly zjištěny žádné histopatologické změny na žábřácích, játrech, ledvinách, slezině a ve svalovině. U parmiček exponovaných formalínu v koncentraci $83 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ se objevila hyperplazie žaberníhoepitelu a degenerativní změny jater (Chinabut a kol., 1988). Používání formalínu vzbuzuje obavy kvůli nebezpečnosti pro pracovníky, kteří s ním přicházejí do styku a jeho potenciálnímu negativnímu vlivu na vodní recipient (Masters, 2004; Pedersen a kol., 2007).

Byla testována nová alternativní léčiva po zákazu malachitové zeleně (manganistan draselný, chloramin-T, peroxid vodíku, Per Aqua a Desirox) samostatně či v kombinaci s formalínem. Přípravky Per Aqua a Desirox obsahují kyselinu peroctovou. Bylo prokázáno, že aplikace těchto přípravků nebo jejich kombinace mohou úspěšně redukovat testované parazitální infekce, a to bez výrazných ztrát léčených ryb. Nejúčinnějším z testovaných léčiv se ukázala kombinace Desiroxu a formalínu (Rintamäki-Kinnunen a kol., 2005).

2.2. Kyselina peroctová

Kyselina peroctová se pro své antimikrobiální a germicidní účinky používá již řadu let k dezinfekčním účelům. V nízkých koncentracích lze však KPO použít i do vodního prostředí s přítomností ryb, kde účinkuje profylakticky a terapeuticky. Kyselina peroctová (kyselina peroxooctová, kyselina peroxyoctová, systematický název kyselina peroxyethanová) je chemická sloučenina ze skupiny organických peroxidů, jejíž sumární vzorec je $\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$. Je to čirá bezbarvá kapalina s charakteristickým ostrým octovým zápachem a $\text{pH} < 2$. KPO je dobře mísitelná s vodou, snadno se odbourává a nezanechává rezidua v rybách. Má silný oxidační potenciál a je silnou žiravinou. Jako dezinfekční prostředek je již řadu let využívána ve zdravotnictví, potravinářství, veterinárním lékařství, úpravě vody a v poslední době našla uplatnění i jako účinné

terapeutikum pro léčbu onemocnění ryb. Ve vodním prostředí se KPO rozkládá třemi způsoby: spontánním rozkladem, hydrolýzou a rozkladem katalyzovaným kovy. V optimálním rozmezí pH 5,5-8,2 se jedná zejména o spontánní rozklad. Hydrolýzou vzniklé rozkladné produkty jsou biologicky odbouratelné a nepředstavují nebezpečí pro vodní prostředí (Zusková a kol., 2011). Při zvýšeném obsahu organických látek a zvýšené teplotě vody se kyselina perotová rozkládá snáze (Pedersen a kol., 2013).

KPO se vyrábí neustálým přidáváním kyseliny octové a peroxidu vodíku do vodné fáze katalyzované kyselinou sírovou (Zhao a kol., 2007). KPO je součástí řady komerčních přípravků, ve kterých se obvykle vyskytuje ve směsi s kyselinou octovou, peroxidem vodíku a vodou, které vytváří rovnováhu prostředí, jenž je optimální, protože stabilita a rozklad kyseliny peroctové závisí na hodnotě pH. Tyto komerční přípravky bývají stabilizovány acidifikací (Yuan a kol., 1997). Komerční přípravky se liší koncentrací kyseliny peroctové, která se pohybuje v rozmezí 3–40% KPO a výrobky s různou koncentrací kyseliny peroctové jsou i různě toxické pro ryby (Marchand a kol., 2013). Jedním z běžně používaných produktů v rybářské praxi je Persteril[®] vyráběný ve třech koncentracích - 4%, 15% a 36% roztok v baleních od 1 do 200 kg (Zusková a kol., 2011). KPO je považována za jedno z nejlevnějších alternativních léčiv po zákazu malachitové zeleně (Picón-Camacho a kol., 2012b).

Kyselina peroctová byla experimentálně zavedena jako dezinfekční prostředek (Gustavino a kol., 2005). A množství studií se zabývalo dezinfekčními účinky kyseliny peroctové, zejména jejím využitím v čištění odpadních vod (Gehr a kol., 2003; Hébert a kol., 2008; Koivunen a Heinonen-Tanski, 2005; Monarca a kol., 2000; Verner-Jeffreys a kol., 2009). Testované dezinfekční koncentrace kyseliny peroctové se pohybují řádově v jednotkách až desítkách $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. KPO má větší dezinfekční potenciál, než například chlór či peroxid vodíku (Baldry a French, 1989). A pro své baktericidní, virucidní, fungicidní a sporicidní účinky již při nízkých koncentracích nachází kyselina peroctová stále častější využití v čištění odpadních vod (Kitis, 2004). Přítomnost organických látek nesnižuje dezinfekční účinnost kyseliny peroctové a vysoký obsah organických látek ve vodě ji pravděpodobně snižuje jen mírně (Kolářová a Svobodová, 2009; Pedersen a kol., 2009).

Účinnost kyseliny peroctové ovlivňuje také tvrdost vody. V embryonálních testech toxicity na dáníu pruhovaném (*Brachydanio rerio*) bylo zjištěno, že hodnota nejnižší 24hLC₅₀ činila 2,24 $\text{mg KPO}\cdot\text{l}^{-1}$ při nízké tvrdosti vody (25 $\text{mg CaCO}_3\cdot\text{l}^{-1}$) a nejvyšší hodnota 24hLC₅₀ 7,14 $\text{mg KPO}\cdot\text{l}^{-1}$ byla pozorována ve vodě s vysokou tvrdostí (2 500

mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{l}^{-1}$), z čehož vyplývá, že s rostoucí tvrdostí vody klesá toxicita kyseliny peroctové (Marchand a kol., 2013).

Nevýhodou KPO je její nízký terapeutický index, který udává kolikrát je hodnota letální koncentrace (LC) dané látky pro organismus (ryby) vyšší ve srovnání s účinnou terapeutickou koncentrací. Je vhodné, aby léčebný přípravek měl co nejvyšší terapeutický index. Terapeutický index by měl být ≥ 4 . Za optimálnější považována hodnota 10 (Svobodová a kol., 2007). Podle standardních vět označujících specifickou rizikovost lze Persteril 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 R51: toxický pro vodní organismy $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} < \text{LC}_{50} (\text{EC}_{50}, \text{ErC}_{50}) \leq 10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Protože hrotnatka velká (*Daphnia magna*) je vysoce citlivá (48hEC_{50}) k Persterilu, tak není doporučováno používat terapeutickou dávku $> 2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, z důvodu možných negativních dopadů na zmiňované zástupce zooplanktonu (Sudová, 2010).

Kyselina peroctová ničí mikroorganismy dvěma způsoby: oxidací a následným rozrušením buněčných membrán nebo denaturací a inaktivací mikrobiálních enzymů. Mechanismus oxidace spočívá v přenosu hydroxylových radikálů (OH^\cdot) přes membránu a následné inaktivaci nebo smrti mikroorganismu. Protože je difúze pomalejší než poločas života radikálu, reaguje s jakoukoli oxidovatelnou sloučeninou ve své blízkosti. Může poškodit všechny typy makromolekul spojené s mikroorganismy, a to sacharidy, nukleové kyseliny (mutace), lipidy (lipidová peroxidace) a aminokyseliny. To nakonec vede k lýze buňky a smrti mikroorganismu. Díky denaturaci a inaktivaci mikrobiálních enzymů má kyselina peroctová sporicidní a ovidní vlastnosti. Velkou výhodou KPO je schopnost inaktivace katalázy, což je enzym, který neutralizuje volné hydroxylové radikály (Zusková a kol., 2011). Stálost vůči kataláze a schopnost katalázu inaktivovat hovoří ve prospěch kyseliny peroctové v porovnání s obdobným dezinfekčním prostředkem - peroxidem vodíku, který tyto vlastnosti postrádá (Kolářová a Svobodová, 2009).

Kyselina peroctová se snadno degraduje na kyslík a vodu a nezanechává ve vodě rezidua, a tudíž se jeví jako vhodné doplňkové léčivo k již používaným terapeutickým a profylaktickým prostředkům typu formaldehydu určeným k prevenci a léčbě rybích patogenů (například ektoparazita *I. multifiliis*) (Pedersen a kol., 2009).

2.2.1. Využití kyseliny peroctové v terapii ryb

Za optimální dávku při aplikaci kyseliny peroctové v terapeutických koupelích je považována koncentrace $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ KPO aplikovaná dvakrát denně. S přihlédnutím k teplotě vody, citlivosti daného druhu ryb a hodnotě pH lze podle specifické situace v chovu koncentraci KPO mírně zvýšit (Zusková a kol., 2011).

Množství vědeckých prací zaměřených na téma terapie rybích onemocnění prostřednictvím kyseliny peroctové se zabývá léčbou kožovcovitosti způsobované ektoparazitem *I. multifiliis*, který parazituje na kůži a žábrách ryb (Meinelt a kol., 2009; Picón-Camacho a kol., 2012a; Straus a Meinelt, 2009). V těchto studiích byla zjišťována účinná dávka proti *I. multifiliis* v různých komerčních produktech obsahujících KPO (Picón-Camacho a kol., 2012b).

Na rybách cizopasí vegetativní stádium kožovce, tzv. trofont. K trofontům kožovce přisedlým k hostiteli bývají chemoterapeutika neúčinná. Když trofont dosáhne určité velikosti, tak se uvolní z hostitele, odpadne na dno nádrže a je obalen hlenovitou schránkou. V tomto stádiu rozmnožovací cysty se parazit nazývá tomont. Tomont se postupně dělí až na 2000 malých tomitů. Tomité se postupně uvolňují z cysty ve volně plovoucí stádium theront, který vyhledává hostitele a vývojový cyklus se opakuje (Svobodová a kol., 2012). Kyselina peroctová účinkuje také na tomonty, a to již v koncentraci $0,6\text{-}0,9 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ KPO, při které byla prokázána mortalita dosahující 39-82% tomontů uvolněných z ryb v průběhu 48 hodin, pokud bylo bezprostředně po uvolnění parazitů přistoupeno k léčbě. Předběžné experimenty ukázaly, že aplikace $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ KPO způsobila 90% úmrtnost tomontů a koncentrace $\geq 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ vedla dokonce k 100% mortalitě testovaných stádií parazita během 48 hodin. Účinek KPO na vývojová stadia theontů byl prokázán při koncentraci $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, kdy po 48 hodinách došlo k úhynu 99% therontů *I. multifiliis* (Meinelt a kol., 2009).

Při použití přípravku obsahujícího 40% kyselinu peroctovou a 25% peroxid vodíku aplikovaného v dávce $0,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 3 hodin bylo dosaženo 95% mortality therontů *I. multifiliis* (Straus a Meinelt, 2009).

Kyselina peroctová je účinná na theronty *I. multifiliis* již při koncentraci $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. V pokusu s *C. carpio*, kde byly experimentálně nasazeni theronti *I. multifiliis* a po dobu 4 dnů byla do nádrží kontinuálně aplikována kyselina peroctová v koncentraci $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, bylo pozorováno významné snížení počtu trofontů (Sudová a kol., 2010). Je doporučeno aplikovat kyselinu peroctovou v terapeutické dávce $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 2× denně. S přihlédnutím

k teplotě, pH vody a citlivosti chovaného druhu ryb lze podle specifické situace v chovu koncentraci KPO mírně zvýšit. Vzhledem k tomu, že se kyselina peroctová ve vodě rychle rozkládá (ztrácí účinnost), tak není nutné v chovných nádržích před další aplikací vodu vyměňovat (Zusková a kol., 2011).

Jedním z testovaných přípravků na účinnost proti ichthyoftirióze byl přípravek založený na formulaci HPPAPA obsahující peroxid vodíku, kyselinu peroctovou a kyselinu peroxyoktanovou k eliminaci volně žijících stádií kožovce. Bylo zjištěno, že podání HPPAPA v nízkých dávkách (8, 12 nebo 15 mg·l⁻¹) během krátké expozice (60 minut) způsobilo 100% mortalitu volně žijících stádií *I. multifiliis* (therontů atomontů). Dokonce i nejnižší koncentrace HPPAPA (8 mg·l⁻¹) dokázala narušit normální vývoj cyst, a tudíž i zabránit uvolnění therontů. Byla prokázána účinnost produktu obsahujícího kyselinu peroctovou v *in vitro* podmínkách a lze shrnout, že má velký potenciál pro snížení infekce způsobené *I. multifiliis* v produkčních akvakulturních systémech (Picón-Camacho a kol., 2012a).

Vědecké práce se také zabývají využitím kyseliny peroctové v léčbě ichthyobodózy. Po desetiletí byl v terapii ichthyobodózy používán formaldehyd, ale jedná se o problematickou sloučeninu vzhledem k jeho kancerogennímu a alergennímu charakteru. S ústupem používání formaldehydu v poslední době se začalo přistupovat k testování alternativních léčiv, která by jej nahradila. Jedním z testovaných léčiv je kyselina peroctová.

Při léčbě kyselinou peroctovou v koncentraci 3 mg·l⁻¹ bylo zaznamenáno statisticky významné (p<0,05) snížení infekce *I. necator* u sumečka skvrnitého (*Ictalurus punctatus*). Tato léčba ovšem způsobila statisticky významné (p<0,05) nižší přežití ryb vůči neléčené kontrole. Nižší koncentrace kyseliny peroctové 1,5 mg·l⁻¹ nezpůsobí výraznou mortalitu ryb a přežití ryb je srovnatelné oproti kontrolní skupině. Tato terapeutická dávka také signifikantně (p<0,05) snižuje infekci *I. necator* (Farmer a kol., 2013). Bylo zjištěno, že již výrazně nižší koncentrace kyseliny peroctové 0,3 mg·l⁻¹ byla signifikantně (p<0,001) zredukována populace parazitů *I. necator* v takové míře, že došlo k téměř totální eliminaci infekce u *O. mykiss* (Jaafar a kol., 2013).

Kyselina peroctová dokáže efektivně zredukovat zaplísnění jiker. Experimentálně bylo prokázáno, že při použití KPO lze docílit 60% přežití, již zaplísněných jiker *I. punctatus*, do chvíle vykulení. Jednalo se o statisticky významně (p<0,05) vyšší přežití oproti neléčené kontrole s přežitím 11% (Straus a kol., 2012).

Při testování vlivu odlišných koncentrací kyseliny peroctové na redukci růstu *S. parasitica* v *in vitro* podmínkách byla zjištěna, negativní korelace koncentrace kyseliny peroctové a redukce růstu této plísně. Čím vyšší je koncentrace kyseliny peroctové a poměr kyseliny peroctové vůči peroxidu vodíku, tím nižší je schopnost komerčního přípravku, obsahujícího kyselinu peroctovou redukovat růst *S. parasitica*, což pravděpodobně znamená, že v redukci růstu *S. parasitica* hraje významnou roli peroxid vodíku obsažený v komerčních přípravcích s kyselinou peroctovou (Marchand a kol., 2012).

Mezi nemoci ryb, u nichž byly prokázány léčebné účinky KPO patří: chilodonelóza, ichtyobodóza, ichtyoftirióza (jen některá vývojová stádia), piscinoodinióza (jen některá vývojová stádia), trichodinóza, gyrodaktylóza, epistylóza a saprolegnióza (Zusková a kol., 2011). Těmito chorobami a dalšími, u nichž se předpokládá účinnost kyseliny peroctové jako terapeutického prostředku, se zabývá následující kapitola.

2.3. Parazitární infekce potenciálně reagující na aplikaci KPO

2.3.1. Protozoózy

Jsou onemocnění způsobená prvoky.

2.3.1.1. Chilodonelóza (Čepelenkovitost)

Původce nemoci: Chilodonelózu způsobují nálevníci *Chilodonella piscicola* a *Chilodonella hexasticha*. Jedná se o ektoparazity, jejichž životní strategií je obligátní parazitismus, což znamená, že by bez nalezení vhodného hostitele nemohli přežít a uskutečnit svůj vývojový cyklus. *Ch. piscicola* a *Ch. hexasticha* nemají volně žijící stádia a výjimečně mohou parazitovat i na jiných hostitelích než na rybách. Rod *Chilodonella* čítá mnoho volně žijících druhů, ale pouze dva druhy napadají ryby a oba se mohou simultánně vyskytovat na jednom hostiteli. V minulosti se předpokládalo, že na rybách cizopasí jen jeden druh z rodu *Chilodonella* (Rintamäki-Kinnunen, 1997).

Chilodonely dokážou přežívat i při nízkých teplotách, dokonce ve vodě pod 5°C (Hoole a kol., 2001). Napadají i ryby v brakických vodách (Noga, 2000). Za nepříznivých podmínek vytváří cysty (Ergens a Lom, 1970). Parazité po opuštění hostitele ve vodě o teplotě 5°C hynou do 24 hodin nebo ve vodě o teplotě 20°C hynou do 1 hodiny (Woo, 1995). Výskyt *Ch. hexasticha* je méně častý oproti *Ch. piscicola*, ale způsobuje podobné léze, zejména u starších ryb (Noga, 2000).

Vstupní brána: Nálevníci rodu *Chilodonella* napadají kůži a žábry ryb (Hoole a kol., 2001).

Zdroj infekce: K zamoření prostředí dochází přenosem nemocnými rybami nebo s přitékající vodou obsahující živé parazity (Krupauer a Kubů, 1985; Svobodová a kol., 2007).

Vnímavost ryb: Mnoho druhů sladkovodních ryb je citlivých vůči této nemoci, zvláště senzitivní je tolstolobik bílý (*Hypophthalmichthys molitrix*) (Ergens a Lom, 1970; Krupauer, 1989; Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007; Woo, 1995).

Predispoziční faktory: Vzplanutí nemoci je pravděpodobnější při velkém nahloučení ryb. Symptomy choroby se objevují zejména koncem zimy. Rozmnožování čepelenek probíhá nejintenzivněji při teplotě vody 5–10 °C, ale může probíhat i ve velkém teplotním rozmezí od 5–24 °C (Krupauer a Kubů, 1985; Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007). Cizopasnici se rozmnožují asexuálním dělením, kdy jeho intenzita závisí na teplotě a světelných podmínkách. Při vhodných podmínkách je *Chilodonella* sp. schopna rychlého namnožení (Amlacher, 1970; Ergens a Lom, 1970; Lucký, 1986). V pokusu s lososovitými rybami ve Finsku byly pozorovány nejtěžší infekce chilodonelózou v nejteplejších letních měsících o teplotě vody 13–18°C, zatímco při teplotě pod 8 °C se *Chilodonella hexasticha* vůbec nevyskytovala (Rintamäki-Kinnunen, 1997). Čepelenky nejdříve napadají oslabené ryby, a až poté ryby zdravé. Toto oslabení ryb bývá nejčastěji způsobeno nedostatkem rozpuštěného kyslíku, špatnou výživou a především dlouhým zimováním (Amlacher, 1970; Ergens a Lom, 1970; Krupauer a Kubů, 1985; Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007). Dalšími faktory podmiňujícími vzplanutí chilodonelózy jsou nedostatek světla či stres. Stres může být zapříčiněn znečištěním vodního prostředí nebo změnami teploty vody (Hoole a kol., 2001; Woo, 1995). Starší informace v literatuře však udávají, že chilodonely nejsou citlivé vůči kolísání teploty (Amlacher, 1970). Nálevníkům *Chilodonella piscicola* vyhovuje mírně kyselé pH vody (Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007).

Patogeneze: Nálevníci nabodávají buňky kožní epidermis a žaberního epitelu ryb svým ústním aparátem a živí se buněčnou drtí z rozrušeného žaberního epitelu a pokožky kůže hostitele (Amlacher, 1970; Hoole a kol., 2001; Reichenbach-Klinke a Elkan, 1965; Svobodová a kol., 2007). Způsobují hyperplazii žaberního epitelu (Rintamäki-Kinnunen, 1997; Woo, 1995). S postupnou proliferací buněk žaberního epitelu se nově vytvořenou buněčnou masou vyplňuje prostor mezi sekundárními žaberními lamelami. Tyto zbytnělé lístky se vzájemně spojují a vytváří tak nediferencovaný tkáňový komplex, který znatelně snižuje možnost výměny plynů na žábrách. Důsledkem chilodonelózy může být také zmnožení a zbytnění chloridových buněk a nadměrná sekrece hlenu (Woo, 1995). Parazité buňky poškozují a způsobují až nekrózu (Svobodová a kol., 2007). Při masivních kožních infekcích dochází až k odlupování kůže ryb (Amlacher, 1970; Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967). V žaberním epitelu jsou pozorovatelné také dystrofické změny jako dilatace kapilár, edém, petechie a hemoragie (Woo, 1995).

Průběh onemocnění závisí na intenzitě infekce. Chilodonelóza se považuje za nebezpečnou nemoc pouze při silné invazi parazitů (Hoole a kol., 2001). Desintegrací žaber a jejich nekrózou se stávají žábry nefunkčními (Woo, 1995). Při těžkých parazitárních infekcích napadené ryby hynou. Jedním z hlavních důvodů je zmenšení respirační plochy žaber i kůže, jejichž dýchací funkce je životně důležitá a onemocnění pak bývá fatální (Amlacher, 1970; Ergens a Lom, 1970; Hoole a kol., 2001; Reichenbach-Klinke a Elkan, 1965; Svobodová a kol., 2007; Woo, 1995). Parazité jsou také schopni přejít z ryb na pulce (Ergens a Lom, 1970).

Klinické příznaky: U *C. carpio* se obvykle začínají příznaky projevovat koncem zimy, kdy se nemocné ryby zdržují v kyslíkatějších místech u přítoku nebo u hladiny a nouzově dýchají, což je příznakem dušení (Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007). Ryby se odírají o dno a stěny nádrže, jsou apatické a nakonec hynou za příznaků dušení (Amlacher, 1970; Ergens a Lom, 1970; Hoole a kol., 2001; Lucký, 1986; Rintamäki-Kinnunen, 1997; Svobodová a kol., 2007; Woo, 1995).

Patologickoanatomické změny: Nakažené ryby mají bělavě až šedomodře zakalenou kůži (Hoole a kol., 2001; Krupauer a Kubů, 1985; Lucký, 1986; Scheurmannová, 2005). Žábry ryb jsou našedlé nebo překrvené (Noga, 2000; Rintamäki-Kinnunen, 1997).

Diagnóza: Tato nemoc se diagnostikuje mikroskopickým vyšetřením seškrabu kůže a žaber ryb nebo na základě histopatologického rozboru. K vyšetření jsou vhodné pouze živé ryby, protože *Chilodonella* rapidně opouští uhynulé ryby (Noga, 2000).

Terapie: Parazity lze odstranit krátkodobou koupelí ryb v 1% chloridu sodném po dobu 10 minut (Svobodová a kol., 2007). Malachitová zeleň v dávce 15 mg na 1 litr bezpečně zahubí všechny parazity (Amlacher, 1970) – lze však využít jen pro nepotravinové druhy ryb. K léčbě se také používají koupele v manganistanu draselném, tryptaflavinu a ve formalínu (Krupauer a Kubů, 1985; Lucký, 1986; Noga, 2000; Reichenbach-Klinke a Elkan, 1965; Svobodová a kol., 2007).

Prevence: Základním preventivním opatřením je znemožnění přenosu původce onemocnění do rybochovného zařízení, zejména nevysazovat infikované ryby mezi zdravé a důsledně dodržovat karanténu nově dovezených ryb (Svobodová a kol., 2007). Je vhodné v nádržích udržovat optimální podmínky pro chov ryb a ryby udržovat v dobré kondici (Krupauer a Kubů, 1985; Svobodová a kol., 2007). V rámci prevence se napřítoku do rybochovných zařízení používají štěrkopískové filtry (Svobodová a kol., 2007).

2.3.1.2. Ichtyobodóza (Bičivkovitost)

Původce nemoci: Jedná se o celosvětově velmi rozšířeného bičíkovce *Ichthyobodonecator*, dříve známého jako *Costia necatrix*. Původce je nebezpečný obligátní ektoparazit. Významné riziko představuje pro juvenilní ryby, plůdek a jikry (Ergens a Lom, 1970; Hoole a kol., 2001).

I. necator se svými rozměry, obdobnými velikostem erytrocytů, řadí k nejmenším původcům rybích ektoparazitóz vůbec (Noga, 2000). Někdy cizopasí i na larvách obojživelníků (Ergens a Lom, 1970). Pokud je parazit fixován na kůži, tak má jeho tělo hruškovitý tvar a může se asexuálně rozmnožovat (Amlacher, 1970). Při rozmnožování mají bičíky krátkodobě zdvojené, a proto lze u *I. necator* pozorovat 2 krátké a 2 dlouhé bičíky (Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007). Parazité separovaní mimo hostitele se zakulacují a hynou v průběhu jedné hodiny (Amlacher, 1970; Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967). Původce choroby je typem protozoálního ektoparazita, který nevytváří cysty (Noga, 2000).

Vstupní brána: Cizopasník napadá kůži a žábry hostitele (Reichenbach-Klinke a Elkan, 1965).

Vnímavost ryb: *I. necator* napadá zřejmě všechny druhy sladkovodních ryb (Svobodová a kol., 2007). Amlacher (1970) uvádí, že jedince lze nalézt na jakémkoliv sladkovodní i mořské rybě.

Predispoziční faktory: Mezi faktory významně ovlivňující vzplanutí nemoci patří teplota vody 10–25°C, velké nahloučení obsádky, oslabení ryb a kyselější pH vody o hodnotách 5–6 (Wedemeyer a kol., 1976). Nejintenzivněji se parazit množí při teplotě vody přibližně 25°C (Svobodová a kol., 2007). Propuknutí choroby podporuje také špatná kvalita vodního prostředí (Hoole a kol., 2001).

Patogeneze: Při silných invazích způsobuje *I. necator* rozsáhlé léze na žábrech, v důsledku čehož dochází ke ztrátě jejich respirační funkce (Bruno a Poppe, 1996). Cizopasník z hostitele vysává buněčný obsah pomocí zobáčkovitého výběžku, který tvoří ústí cytostomu, což je úzký kanál v přední části těla sloužící k příjmu potravy, který parazit po napadení hostitele vysune (Ergens a Lom, 1970). Pouze parazit přisedlý k hostiteli přijímá potravu a způsobuje tak několikanásobnou hypertrofii epidermis s vymizením hlenových buněk. V důsledku poškození kožních a žaberních buněk dochází k plošným erozím, odlupování postižených buněk a následnému úhynu ryb z důvodu selhání osmoregulace (Svobodová a kol., 2007).

Klinické příznaky: Při těžkých infekcích ryby přestávají přijímat krmivo, vyhledávají kyslíkatou vodu u přítoku, plavou pod hladinou a jejich plavání je prudké a nemotorné, snaží se odírat o kameny a pevné předměty ve vodě, ploutve drží při těle. Nakonec hynou za příznaků dušení (Amlacher, 1970; Hoole a kol., 2001; Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007).

Patologickoanatomické změny: Na kůži se objevují šedomodré až šedobílé okrsky (Noga, 2000; Scheurmannová, 2005). Tento šedomodrý film se může objevovat i na žábřácích a je způsoben nadměrnou produkcí hlenu (Hoole a kol., 2001; Krupauer a Kubů, 1985; Lucký, 1986). Okrajové části ploutví jsou šedavě lemované a ploutve jsou neprůhledné (Svobodová a kol., 2007). Pokud určitou část povrchu těla hostitele postihne infekce zvláště intenzivně, pak jsou tyto partie začervenalé a na kůži se objevují krváceniny (Amlacher, 1970).

Diagnóza: Choroba se určuje mikroskopickým vyšetřením kožního a žaberního seškrabu při 400× zvětšení okuláru, ale již při 100× zvětšení lze původce ichtyobodózy rozeznat podle typického esovitého pohybu, který vykonává (Amlacher, 1970; Hoole a kol., 2001; Lucký, 1986; Noga, 2000). Dalším diagnostickým krokem může být

histopatologické vyšetření kůže a žaber (Noga, 2000). V těžkých případech způsobuje *I. necator* až nekrózu epidermálních buněk (Amlacher, 1970).

Terapie: Léčba ichthyobodózy se u kaprovitých ryb provádí pomocí lázní v NaCl a formalínu (Amlacher, 1970; Hoole a kol., 2001; Lucký, 1986; Noga, 2000; Reichenbach-Klinke a Elkan, 1965). Lze použít krátkodobé koupele v množství 25 g NaCl na 1 litr vody pod dobu 15–20 minut (Amlacher, 1970; Krupauer a Kubů, 1985; Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007). Ovšem léčebné koupele v NaCl jsou vhodné pouze pro sladkovodní ryby. Původce onemocnění lze také vyhubit prostým zvýšením teploty vody nad 30°C (Noga, 2000).

Prevence: K nejdůležitějším preventivním opatřením patří znemožnění přenosu původce onemocnění do rybochovných objektů a zajištění kvalitního prostředí udržujícího ryby v dobré kondici a zdravotním stavu. Nutné je provádět pravidelné kontroly (Krupauer a Kubů, 1985; Svobodová a kol., 2007).

2.3.1.3. Ichtyoftirióza (Kožovcovitost)

Původce nemoci: Ichtyoftiriózu způsobuje nálevník *Ichthyophthirius multifiliis*. Toto onemocnění patří mezi nejzávažnější parazitózy sladkovodních ryb a způsobuje velké ekonomické ztráty v chovu ryb (Amlacher, 1970; Hoole a kol., 2001; Lom a Dyková, 1992; Matthews, 2005; Noga, 2000; Scheurmannová, 2005; Svobodová a kol., 2007; Woo, 1995). Silné invaze jsou pro hostitele obvykle letální (Ergens a Lom, 1970; Hoole a kol., 2001; Lucký, 1986; Reichenbach-Klinke a Elkan, 1965; Svobodová a kol., 2007). Kožovec *I. multifiliis* je holotrichní nálevník a řadí se k parazitům, kteří způsobují nejrozsáhlejší úhyny ryb. Je jedním z nejčastějších patogenů ryb. Jeho biologie, výskyt, prevence a léčba onemocnění, jež vyvolává, jsou předmětem intenzivního studia vědecké veřejnosti. Původce nemoci měří 0,02 mm v excystovaném stádiu theront, ale na rybách parazituje pouze vegetativní stádium parazita zvané trofont, dorůstající délky až 1 mm. Jeho makronukleus má typický tvar připomínající podkovu (Amlacher, 1970; Ergens a Lom, 1970; Hoole a kol., 2001; Reichenbach-Klinke a Elkan, 1965; Svobodová a kol., 2007). Tělo je kulovitého tvaru a obsahuje jednu stažitelnou vakuolu (Ergens a Lom, 1970). Mezi akvaristy se této nemoci říká krupička. Malé šupinaté ryby mají větší rezistenci vůči infekci než velké šupinaté ryby, a rovněž ryby žijící v pelagiálu jsou více vystaveny možné invazi než bentické ryby (Reichenbach-Klinke a Elkan, 1965).

Vstupní brána: *I. multifiliis* napadá kůži a žábry ryb (Lom a Dyková, 1992; Noga, 2000; Woo, 1995).

Zdroj infekce: Do prostředí se theronti dostávají v přitékající vodě, s živou potravou z přírody nebo s infikovanými rybami (Scheurmannová, 2005; Svobodová a kol., 2007).

Vnímavost ryb: Cizopasník napadá všechny druhy našich ryb. Obzvláště citliví k ichtyoftirióze jsou sumci (Ergens a Lom, 1970; Hoole a kol., 2001; Matthews, 2005; Noga, 2000; Reichenbach-Klinke a Elkan, 1965; Svobodová a kol., 2007; Woo, 1995). Kožovcovitost se typicky vyskytuje při vyšší teplotě vody, ale objevuje se i v chladnější vodě a postihuje také lososovité druhy ryb (Noga, 2000). Bylo zjištěno, že existují dvě fyziologické rasy *I. multifiliis*, jedna teplomilná a druhá studenomilná (Woo, 1995).

Predispoziční faktory: Choroba propuká zejména při oslabení ryb, vyšší teplotě vody, velkém nahloučení ryb, zvláště v uzavřených chovech ryb s velkou hustotou obsádky (Amlacher, 1970; Ergens a Lom, 1970; Reichenbach-Klinke a Elkan, 1965; Svobodová a kol., 2007). Příčinou oslabení ryb může být nekvalitní potrava či hladovění. Při vysoké teplotě vody se průběh onemocnění rapidně zrychluje (Amlacher, 1970; Hoole a kol., 2001; Svobodová a kol., 2007).

Patogeneze: Trofonti kožovce *I. multifiliis* na rybě rostou a vykonávají pomalý točivý pohyb, jímž mechanicky poškozují tkáň hostitele (Svobodová a kol., 2007). Jejich pohyb a růst může způsobit až nekrotické změny v tkáni, odumřelé buňky pak mají jinou barvu a konzistenci než živá tkáň (Reichenbach-Klinke a Elkan, 1965; Svobodová a kol., 2007).

Klinické příznaky: Při těžkých infekcích se postižené ryby otírají o dno a předměty ve vodě a dochází ke ztrátě reflexů. Jsou neklidné, postupem času přestávají přijímat krmivo a dochází k úhynu mnoha jedinců za příznaků dušení (Krupauer a Kubů, 1985; Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007).

Patologickoanatomické změny: Postižené ryby pokrývají na kůži, žábrech a ploutvích malé bílé ostře ohraničené tečky dosahující průměru až 1 mm a lehce vystupující na povrch. Tyto útvary obsahují dospívající kožovce (Amlacher, 1970; Scheurmannová, 2005; Svobodová a kol., 2007).

Diagnóza: Určení nemoci se provádí prozkoumáním ryb pod lupou, následně pak vyšetřením kožního a žaberního seškrabu pod mikroskopem (Amlacher, 1970; Lucký, 1986; Noga, 2000). Další možnou diagnostickou metodou je histopatologické vyšetření kůže nebo žaber (Noga, 2000).

Terapie: Léčba ichtyoftiriózy je problematická, protože se antiparazitární koupele nedostanou k těm částem těl parazitů, které jsou schovány pod hlenovou vrstvou hostitele. K odstranění kožovců je možno po dobu 3 dnů zvýšit teplotu vody na 31–32°C. Tato metoda se uplatňuje zejména v chovu ryb na oteplené vodě a v akvariijních chovech (Svobodová a kol., 2007). Experimentálně bylo ověřeno, že železan draselný (K_2FeO_4) v koncentraci $4,8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ po expozicici trvající 4 hodiny způsobí úhyn 100% therontů *I. multifiliis* (Ling a kol., 2010). Ale zmíněná koncentrace $4,8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ železanu draselného nezpůsobí totální úhyn tomontů *I. multifiliis*, ke které je zapotřebí aplikovat vyšší koncentraci $19,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Ling a kol., 2011).

Prevence: V první řadě jsou nutnou profylaxí ichtyoftiriózy stabilní a optimální environmentální podmínky v chovu ryb a prevence zamoření rybochovných zařízení (Amlacher, 1970; Hoole a kol., 2001; Krupauer a Kubů, 1985; Reichenbach-Klinke a Elkan, 1965). Konkrétně se provádí vysazování zdravých ryb, zabraňuje se přítoku takové vody, která je infikovaná parazity, a to například tím, že se voda filtruje šterkopískovými filtry. Jestliže přesto parazité proniknou do rybochovných zařízení, tak je nutné nádrž vypustit a zcela vysušit dno, které se následně dezinfikuje páleným vápnem v dávce $2,5 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ či chlorovým vápnem v dávce $0,5\text{--}0,6 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ (Krupauer a Kubů, 1985; Svobodová a kol., 2007).

2.3.1.4. Kryptobióza

Původce nemoci: Rod *Cryptobia* je kosmopolitně rozšířen a sestává z 10 druhů, které osidlují mnoho sladkovodních i mořských druhů ryb, pro které jsou jen slabými patogeny (Noga, 2000). Naše ryby napadá pouze jeden druh, a to *Cryptobia branchialis*. Vyskytuje se v celé Eurasii (Ergens a Lom, 1970). Je řazen mezi ektokomezály, protože přímo nepoškozuje hostitele. Vyskytuje se pouze v organicky znečištěné vodě, kde se živí bakteriemi a drobnou organickou hmotou (Svobodová a kol., 2007).

Délka živých jedinců se pohybuje v rozmezí $0,014\text{--}0,025 \text{ mm}$ a na šířku měří $0,004 \text{ mm}$ (Ergens a Lom, 1970; Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007). Tělo kryptobií je kapkovitého tvaru, opatřené dvěma bičkami, z nichž jeden je tzv. vlečný (Ergens a Lom, 1970; Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007). Přední zaoblený konec těla je vybaven fibrilárním útvarům, který se nazývá *aciculum*. Zadní konec těla kryptobií se ostře zužuje. Jestliže prvok pohybuje vlečným bičkem, tak se může povrch jeho těla poněkud

lamelovitě zvednout, ale ne natolik jako u příslušníků rodu *Trypanoplasma*, protože nemá vyvinutou undulující membránu (Ergens a Lom, 1970).

Vstupní brána: Kryptobie osidlují žábry ryb (Lom a Dyková, 1992; Lucký, 1986).

Vnímavost ryb: Cizopasnici rodu *Cryptobia* napadají různé druhy kaprovitých a akvarijních ryb (Ergens a Lom, 1970; Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007). Vyskytují se zejména u býložravých ryb (Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007).

Predispoziční faktory: Faktory podmiňujícími vzplanutí kryptobiózy jsou organické znečištění vody, významné oslabení kondice ryb, velké nahloučení obsádky a vyšší teplota vody (Ergens a Lom, 1970; Lom a Dyková, 1992; Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007).

Patogeneze: Rozmnožování cizopasníků je asexuální a probíhá dělením (Lucký, 1986). Původce se na kůži a zábrách přichytává pouze prostou adhezí vlečného bičíku, a tudíž nepoškozuje hostitele (Svobodová a kol., 2007).

Klinické příznaky: U nemocných ryb pozorujeme odlišné chování, než u ryb zdravých. Postižené ryby vyhledávají kyslíkatější vodu u přítoku a u hladiny a projevují se u nich příznaky dušení a nechutenství (Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007).

Patologickoanatomické změny: Ryby mohou mít překrvené žábry se šedými okrsky (Lucký, 1986), ale obecně jsou patologické změny při kryptobióze relativně nenápadné (Svobodová a kol., 2007).

Diagnóza: Determinace kryptobií se provádí na podkladě histopatologického vyšetření žaber s kryptobii (Noga, 2000).

Terapie: Ve většině případů postačuje snížit organické zatížení vodního prostředí a zredukovat organický detrit v nádržích (Svobodová a kol., 2007). Po odbourání stresových faktorů obvykle choroba spontánně vymizí (Noga, 2000). Pokud se zmíněné snížení organické hmoty ukáže jako neefektivní, tak je nutné přejít k léčebným koupelím (Svobodová a kol., 2007). Léčbu provádíme pomocí dlouhodobých koupelí v roztoku síranu měďnatého a síranu železnatého v poměru 5:2 v množství $0,23 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ minimálně po dobu 2 dnů (Lucký, 1986). Kryptobiózu je možné snadno vyléčit také koupelí ve formalínu (Noga, 2000).

Prevence: Významným opatřením proti vzplanutí kryptobiózy je zamezení nárůstu koncentrace organických látek a organického detritu ve vodním prostředí (Svobodová a kol., 2007). V rámci prevence je vhodné pravidelně provádět parazitologické vyšetření (Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007). Pokud se jedná o odchov raných stádií plůdku, provádíme veterinární kontrolu alespoň dvakrát týdně. Stěžejní profylaxi je časté

odkalování rybochovných nádrží, zajištění optimální kvality vody a přítomnosti postačujícího množství přirozené potravy z důvodu udržení dobré kondice ryb (Svobodová a kol., 2007).

2.3.1.5. Myxosporeózy

Původce nemoci: Chorobu vyvolávají mnohobuněčné organismy kmene *Myxozoa*. Pro infekční stádia je charakteristická struktura cyst obsahujících tzv. pólové váčky, ve kterých je stočené fixační vlákno, jímž se parazité při kontaktu s hostitelem přichycují ketkáni (Lom a Dyková, 1992; Svobodová a kol. 2007).

Vstupní brána: Na ploutvích parazituje *Thelohanellus nikolskii* a žábry napadá *Sphaerospora molnari* (Eiras a kol., 2008; Hoole a kol., 2001; Lom a Dyková, 1992; Svobodová a kol., 2007).

Vnímavost ryb: *Sphaerospora sp.* cizopasí na kaprovitých rybách (Hoole a kol., 2001; Lom a Dyková, 1992; Svobodová a kol., 2007). Vnímavější jsou mladší věkové kategorie ryb (Eiras a kol., 2008; Lom a Dyková, 1992).

Predispoziční faktory: Původci myxosporeóz mohou přežívat v chladné vodě v morfologicky normálním stavu po více než jeden rok (Lom a Dyková, 1992).

Patogeneze: Původce *S. molnari* způsobuje značné patologické změny ve tkáni žaber. Typická je hyperplazie žaberního epitelu a následná nekróza (Hoole a kol., 2001).

Klinické příznaky: Liší se v závislosti na napadené tkáni. Různé druhy napadají trávicí soustavu, oběhovou soustavu a vylučovací soustavu (Lom a Dyková, 1992).

Patologickoanatomické změny: *Myxosporea* poškozují buňky a tkáně ryb. V důsledku určité rovnováhy mezi hostitelem a patogenem je možné dosáhnout jejich dlouhodobé mutualistické koexistence a ve většině případů je obtížné sledovat odpověď hostitelských tkání, která by byla zacílena na destrukci parazita. Ovšem pokud se parazit vyvine na netypickém místě, tak velmi snadno vyprovokuje prudkou imunitní odpověď a bývá zničen. Parazité způsobují hypertrofie buněk, edémy, hemoragie, dokážou způsobit dysfunkci celých orgánů a destruuji tkáně (Lom a Dyková, 1992).

Diagnóza: Nemoc se diagnostikuje na základě posouzení klinických příznaků, mikroskopického vyšetření a histopatologického vyšetření (Bruno a Poppe, 1996; Volf a Havelka, 1958).

Terapie: Terapie není vypracována (Svobodová a kol., 2007).

Prevence: Spočívá v pravidelných veterinárních prohlídkách ryb, vyřazení ryb s pozitivním nálezem z dalšího chovu a v dezinfekci vypuštěných nádrží a předmětů, které se dostávají do styku s rybami a rybochovnými nádržemi (Svobodová a kol., 2007). Dezinfekce rybničního dna se provádí pomocí páleného vápna (Volf a Havelka, 1958).

2.3.1.6. Piscinoodinióza (Obrněnkovitost)

Původce nemoci: Chorobu vyvolává obrněnka *Piscinoodinium pillulare* (Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007). Cizopasnici jsou nejpatogeničtější pro mladá vývojová stádia ryb, u nichž může dojít k úhynu během 1–2 týdnů (Noga, 2000).

Tělo obrněnek způsobujících piscinoodiniózu má oválný až hruškovitý tvar. Dorůstají do délky 0,05–0,1 mm. Jádru je oválného tvaru. Přichytný disk na užším konci těla parazitických obrněnek je opatřen rhizoidy, což jsou tenká vlákna, jimiž trofont proniká do kožních a žaberních buněk hostitele, které poškozují (Ergens a Lom, 1970; Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007). Tato obrněnka je velmi nebezpečný a dlouhověký prvek žijící na mnoha rybách přímo importovaných z Afriky (Scheurmannová, 2005).

Vstupní brána: Cizopasník parazituje na kůži, žábřácích a ploutvích (Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007).

Vnímavost ryb: Vůči této nemoci jsou citlivé kaprovité ryby (Lucký, 1986; Noga, 2000), avšak jeden z prvních potvrzených výskytů této parazitózy na našem území byl na karasovi obecném (*Carassius carassius*). Nemoc se vyskytuje zejména v chovu akvarijních ryb, ve kterém zapříčiňuje rozsáhlé úhyny ryb, především plůdku (Lom a Dyková, 1992; Noga, 2000; Svobodová a kol., 2007). Častá je také u úhořů, keříčkovců červenolemých a ostatních ryb v rybochovných zařízeních využívajících k ohřevu oteplenou vodu. Zřídka se s piscinoodiniózou setkáváme i v rybnících a ve volných vodách (Svobodová a kol., 2007).

Predispoziční faktory: Pozitivní vliv na vzplanutí nemoci má zvýšená teplota vody na 22–24°C, vysoká hustota obsádky, nízká hladina vody, neproudivé prostředí a zvláště citlivý vůči piscinoodinióze je ranný plůdek ryb (Lucký, 1986).

Patogeneze: Přichycené obrněnky zapustí do hostitele rhizoidy, jejichž poškozováním tkáně působí dystrofické změny a hyperplazii buněk kožního a žaberního epitelu. To může následně vést k rozvoji nekrobiotických změn (Lom a Dyková, 1992; Svobodová a kol., 2007).

Klinické příznaky: Nemocné ryby jsou ze začátku neklidné (Svobodová a kol., 2007) a otírají se o předměty ve vodě (Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007). Poté se u ryb projevuje nechutenství. Při napadení žaber se navíc objevují příznaky dušení a ryby mají tendenci plavat u hladiny. Ve vážných případech s postupem času infikované ryby hynou (Svobodová a kol., 2007).

Patologickoanatomické změny: Tělo a ploutve jsou potažené dobře viditelným světle šedým filmem. Při velkém množství obrněnek jsou na rybách velké počty bílých teček makroskopicky dobře pozorovatelných zvláště při osvětlení z boku a shora (Svobodová a kol., 2007). Napadené ryby mají zaprášený vzhled (Noga, 2000).

Diagnóza: Choroba se determinuje na základě analýzy mikroskopie kožního a žaberního seškrabu (Lucký, 1986; Noga, 2000). Optimální zvětšení mikroskopu je 100× či 450× (Lucký, 1986). Dalším diagnostickým krokem je histopatologické vyšetření kůže a žaber s přítomností parazitů.

Terapie: K tlumení této parazitózy lze použít dlouhodobé koupele v roztoku CuSO_4 v množství 0,15 g na 1 m³ vody (Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007) po dobu minimálně 12 hodin, ale pro určité druhy akvarijních ryb je zmíněná koupel jedovatá. Méně výrazný efekt je pozorován při použití dlouhodobé koupele v akriřavinu a také lze aplikovat dlouhodobé koupele v Entizolu a malachitové zeleni. Poslední dvě však není možné využívat u ryb určených ke konzumním účelům (Svobodová a kol., 2007). Nejméně invazivními a nejefektivnějšími postupy v léčbě piscinoodiniózy jsou metoda přelovování a metoda dočasného zvýšení teploty vody s obsahem NaCl (Noga, 2000; Svobodová a kol., 2007).

Prevence: Nové ryby v rybochovném zařízení je vhodné na 2 až 3 týdny umístit do karantény, během níž se ryby prohlížejí pod lupou (Svobodová a kol., 2007). Prevence dále spočívá v pravidelných měsíčních parazitologických vyšetřeních, zvláště u ryb chovaných intenzivním způsobem (Lucký, 1986). Pokud se krmí planktonem, tak se nedoporučuje používat plankton z rybníčních lokalit, popřípadě ho zkrmit až po 24 hodinách, tedy v době, kdy již došlo k úhynu infekčních stádií parazitů (Svobodová a kol., 2007).

2.3.1.7. Trichodinózy (Brousilkovitost)

Původce nemoci: Jedná se o chorobu způsobovanou zástupci rodů *Trichodina*, *Trichodinella* a *Tripartiella*. Tyto druhy patří k nejčastěji se vyskytujícím organizmům, které osidlují ryby a pro ryby jsou pouze slabými patogeny. Zástupci rodu *Trichodina* se vyznačují kloboučkovitým tvarem těla s adhezivním diskem vybaveným zoubky s trnem. Mezi významné příslušníky rodu *Trichodina* patří druhy *T. anguillae*, *T. domerguei* a *T. nigra*. Zoubky u jedinců rodu *Trichodinella* jsou vybaveny háčkem. Významnými zástupci rodu *Trichodinella* jsou *T. epizootica* a *T. subtilis*. Rozmnožování těchto nálevníků probíhá pučením nebo dělením (Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007).

Vstupní brána: Původci trichodinóz napadají kůži, ploutve a žábry ryb (Scheurmannová, 2005).

Zdroj infekce: Brousilky se do prostředí dostávají s napadenými rybami nebo s přitékající vodou (Lucký, 1986).

Vnímavost ryb: Je specifická dle druhu cizopasníka, avšak často bývají cílem brousilek kaprovité ryby (Lom a kol., 1989).

Predispoziční faktory: Původci onemocnění napadají prvotně ryby oslabené. Časteji se vyskytuje v nižších partiích toku, než v čistších vodách psrtohových (Volf a Havelka, 1958).

Klinické příznaky: Příznaky se projeví až při silných infekcích tím, že se ryby snaží otírat o předměty ve vodě a zdržují se v kyslíkatějších částech nádrže (Lucký, 1986).

Patologickoanatomické změny: Jsou nejlépe pozorovatelné u ryb ponořených ve vodě a projevují se našedlým zákalem kůže, ploutví a žaber a zvýšeným zahleněním žaber (Hoole a kol., 2001; Krupauer a Kubů, 1985; Lom a kol., 1989). Přichycené trichodiny dráždí a poškozují povrch hostitele a při masové infekci se živí jeho rozrušenými buňkami, což může vyústit až k úhynu ryb (Svobodová a kol., 2007).

Diagnóza: Choroba je diagnostikována na základě mikroskopického vyšetření kůže a žaber při 100× až 450× zvětšení. Identifikace nálevníků na úrovni druhu je možná v parazitologických laboratořích za pomoci preparačních a barvicích metod (Lucký, 1986).

Terapie: Léčba je stejná jako u chilodonelózy (Krupauer a Kubů, 1985). Původce této nemoci je snadné zlikvidovat již první aplikací terapeutik. Všechny trichodinózy se

léčí podobně, tudíž není k terapii nutná taxonomická identifikace až na úroveň druhu (Noga, 2000).

Prevence: V rámci dobré prevence by se měla používat čistá voda, která je prostá parazitů. Při objevení nemocných ryb by se měl zvýšit průtok vody, aby byli paraziti odplaveni. Také je vhodné provádět pravidelné kontroly zdravotního stavu ryb, zejména před uložením ryb do komor a před jarním vysazováním (Volf a Havelka, 1958).

2.3.1.8. Epistylóza

Původce nemoci: Chorobu způsobují koloniální ektokomenzální nálevníci rodu *Epistylis* (Noga, 2000). Původci onemocnění jsou relativně velcí sesilní prvoci, kteří mají tvar cylindru či kalichu a žijí ve sladké vodě (Bruno a Poppe, 1996; Hoole a kol., 2001). Jedná se o epibiontní organizmy, tedy o organizmy žijící na povrchu jiných organismů. Tato choroba postihuje velké množství bezobratlých živočichů. Mezi druhy vyvolávající epistylózu patří: *E. lwoffii*, *E. colisarum*, *E. apiosomae*, *E. transvaalensis*. *Epistylis sp.* jsou koloniální nálevníci. Kolonie neboli zoon jsou tvořeny několika málo až mnoha zooidy přichycenými na nestažitelných stopkách (Lom a Dyková, 1992). Na našem území se *E. lwoffii* běžně vyskytuje (Lom a kol., 1989).

Vstupní brána: Jedná se o volně žijící organizmy, ale příležitostně napadají ryby a jikry. V takových případech ve velkém počtu kolonizují žábry a kůže ryb nebo jejich jikry (Bruno a Poppe, 1996; Hoole a kol., 2001).

Vnímavost ryb: Napadají kapry, závojnátky čínské (*Carassius auratus auratus*) a další kaprovité ryby (Hoole a kol., 2001).

Predispoziční faktory: Vzplanutí epistylózy není časté. Tato nemoc propuká zejména u ryb oslabených a vystavených stresu (Bruno a Poppe, 1996; Esch a kol., 1976). Výskyt *Epistylis sp.* je také spojen se zatížením prostředí organickými látkami (Hoole a kol., 2001; Noga, 2000). Onemocnění se vyskytuje převážně v rybníčních akvakulturách v letních měsících (Noga, 2000).

Patogeneze: Jako hostitele si vybírají ryby či jiný substrát aby posloužil jako vazebné místo, na němž jsou prvoci uchycení a špičkou svého předního konce si poté obstarávají potravu, což znamená, že *Epistylis sp.* se neživí hostitelem, ale pouze jej využívají jako substrát k uchycení. Pokud jsou přítomny ve velkých koloniích, tak způsobují hostiteli léze, které se zanítí, poškozená místa mohou až zněkrotizovat a výjimečně se objevují i vředy (Hoole a kol., 2001). Zmíněné léze bývají bílé barvy nebo

jsou hemoragické (Noga, 2000). Poraněná místa se stávají vstupní branou pro sekundární bakteriální infekce, zvláště pro aeromonády a ostatní gramnegativní tyčinkovité bakterie (Esch a kol., 1976).

Přestože existují případy, kdy po silných invazích nálevníky *Epistylis sp.* došlo k úhynům *O. mykiss*, tak je mortalita v důsledku epistylózy většinou kombinací více chorob. Například epistylózy a gyrodaktylózy (Bruno a Poppe, 1996).

Klinické příznaky: Ryby projevují příznaky dušení, vyhledávají kyslíkatější vodu a snaží se odírat o dno a předměty ve vodě (Woo, 1995).

Patologickoanatomické změny: Přítomnost velkého počtu *Epistylis sp.* na žábrech může vyústit v hyperplazii žaberního epitelu a slepování žaberních lístků (Bruno a Poppe, 1996).

Diagnóza: *E. lwoffii* je jediný kruhobrvý nálevník vytvářející stonky, který žije na našich rybách v koloniích (Lom a kol., 1989). Diagnóza se stanovuje ze stěru z žaber či kůže s původcem choroby nebo na základě histopatologického vyšetření žaber či kůže (Noga, 2000).

Terapie: Léčba se provádí krátkodobými nebo dlouhodobými koupelemi ve formalínu, dlouhodobými koupelemi v manganistanu draselném a dlouhodobými koupelemi v chloridu sodném (Noga, 2000).

Prevence: V rámci prevence je v rybochovném prostředí vhodné předcházet znečištění vody organickými látkami a minimalizovat stresové situace, do kterých ryby přicházejí, například při manipulaci s rybami. A v neposlední řadě je důležité dbát na dobrou zoohygienu v chovu a výživu ryb, což lze považovat za základní profylaktické kroky v boji s nemocemi, respektive kroky v prevenci oslabení ryb. Tito nálevníci se nemohou namnožit na rybách v dobrém zdravotním stavu (Lom a kol., 1989).

2.3.2. Helmintózy

Jako helmintózy se označují choroby vyvolané červy.

2.3.2.1. Daktylogyróza

Původce nemoci: Čeleď *Dactylogyridae* sestává z mnoha rodů - k nejdůležitějším patří *Dactylogyrus*, *Falciunguis*, *Dogielus*, *Acolpenteron*, *Pseudacolpenteron* a *Bradactylogyrus* (Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967). Monogenea rodu *Dactylogyrus* infikují žábry (Hoole a kol., 2001) a jsou vejcorodými hermafrodity s přímým vývinem bez mezihostitelského stupně (Svobodová a kol., 2007). Většina druhů jsou ektoparazitické ryb a pouze několik druhů žije endoparaziticky (Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967). K frekventovaným příslušníkům původců daktylogyróz patří *Dactylogyrus vastator*, *D. extensus*, *D. macracanthus*, *D. lamellatus*, *D. hypophthalmichthys* a *D. nobilis* (Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007). Parazitické způsobující chorobu u býložravých ryb jsou u nás nepůvodními druhy stejně jako jejich hostitelé (Svobodová a kol., 2007). Daktylogyrózy jsou nebezpečné zejména pro plůdek o velikosti 2–5 cm (Krupauer a Kubů, 1985; Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967; Svobodová a kol., 2007). Starší věkové kategorie jsou vůči nemoci rezistentnější a k jejich úhynu dochází jen v případě nízké koncentrace kyslíku ve vodním prostředí (Krupauer a Kubů, 1985; Svobodová a kol., 2007). Zástupce rodu *Dactylogyrus* lze identifikovat dle čtyř pigmentových očních skvrn v hlavové části těla a dle jejich haptoru (Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967; Svobodová a kol., 2007). Haptor je opatřen 14 okrajovými háčky (Svobodová a kol., 2007) a dvěma středovými háčky (Lucký, 1986; Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967; Svobodová a kol., 2007). Reprodukční aparáty těchto monogeneí lze odlišit tím, že vaječníky jsou černě zbarvené, zatímco varlata jsou tečkovaná (Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967).

Vývojový cyklus: Vejcorodá monogenea nakladou vajíčka do vnějšího prostředí, z nichž se v rozmezí 2–8 dnů líhnou obrvené volně plovoucí larvy zvané onkomiracidia. Jestliže onkomiracidia nenajdou v průběhu 5 hodin žádného hostitele, tak hynou. Po nalezení hostitele odvrhují své řasinky a fixují se na těle, ve kterém během 1 týdne dospívají v adultní stádia (Svobodová a kol., 2007).

Vstupní brána: *Dactylogyridae* jsou jedni z nejčastějších žaberních parazitů sladkovodních ryb (Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967). Napadají především okraje

konců žaberních lístků. Výjimkou je *D. extensus*, který infikuje střední část žaberních lístků (Svobodová a kol., 2007).

Zdroj infekce: K zamoření prostředí dochází přenosem parazitů na nemocných rybách nebo v přítékající vodě (Volf a Havelka, 1958).

Vnímavost ryb: Parazité rodu *Dactylogyrus* cizopasí na různých druzích ryb (Hoole a kol., 2001; Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007). A mnoho z nich může potenciálně napadat i kaprovité ryby (Hoole a kol., 2001; Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007).

Predispoziční faktory: Vzplanutí nemoci podmiňují následující faktory: velikost ryb, teplota vody, zdravotní stav ryb, světelné podmínky, velké nahloučení ryb a nízká koncentrace rozpuštěného kyslíku (Lucký, 1986; Volf a Havelka, 1958). Teplota vhodná k vývoji *D. vastator* se pohybuje v rozmezí 22-24°C (Krupauer a Kubů, 1985; Svobodová a kol., 2007), což koreluje s teplejším ročním obdobím, v němž cizopasník dosahuje nejvyšší prevalence. K vývoji *D. extensus* je naopak vhodnější nižší teplota vody 16-17°C, a proto se majoritně vyskytuje v chladnějším období (Svobodová a kol., 2007). Teplota <5°C a >30°C je pro reprodukci daktylogyrů již nevhodná (Krupauer a Kubů, 1985).

Patogeneze: Monogenea invadují žábry ryb, kde způsobují významné změny. Zde se zafixují svým přichytným diskem, haptorem, který leží na opačné straně těla než oční pigmentové skvrny. Tím jak přichytný disk postupně narušuje žaberní tkáň, tak zde způsobuje krváceniny až nekrózu. Postižené je také okolí mechanicky poškozované tkáně daktylogyry, v těchto místech se slepují žaberní lístky, pojivová tkáň bují a respirační epitel zbytnuje (Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967; Svobodová a kol., 2007). Celková situace na žábrách je pro hostitele velmi nepříznivá, jelikož dochází ke zmenšení respirační plochy žaber a poškozená tkáň se stává potenciální vstupní branou pro sekundární bakteriální a plísňové infekce. Při silných invazích parazité zapříčiňují totální zničení žaber a odpadávání žaberních lístků. Pro plůdek dlouhý 4–5 cm je infekce 20–30 ti dospělci parazitů smrtelná (Svobodová a kol., 2007).

Klinické příznaky: Ryby se shromažďují v kyslíkatější vodě u přítoku a hladiny (Krupauer a Kubů, 1985; Lucký, 1986), kaprovité druhy nouzově dýchají, a za příznaků dušení hynou ve velkém počtu (Lucký, 1986).

Patologickoanatomické změny: Při silné intenzitě infekce a manifestaci příznaků dušení se jeví hřbetní strana ryb světlejší, žábry jsou hypertrofické a mají šedý nádech. Okraje žaberních lístků jsou nerovné. Na kůži je znatelná nadprodukce hlenu.

V pozdějších fázích nemoci se objevují hemoragie a nekrotická ložiska (Krupauer a Kubů, 1985; Lucký, 1986).

Diagnóza: Choroba se diagnostikuje mikroskopickým vyšetřením žaberního seškrabu a stupeň infekce se posuzuje dle počtu nalezených jedinců. Diagnóza na úrovni druhu se provádí dle tvaru a velikosti rozmnožovacího aparátu a analýzou jednotlivých částí přichytného disku (Lucký, 1986).

Terapie: Nejúčinnějším léčivem v terapii daktylogyrózy se ukázal být formaldehyd ve formě krátkodobých koupelí. Používá se také krátkodobá koupel v chloridu sodném, ponořovací trypaflavinová a čpavková koupel. V poslední době se začaly používat léčebné koupele v praziquantelu, levamisolu, případně toltrazurilu (Svobodová a kol., 2007).

Prevence: Základním preventivním opatřením je zabránění zamoření prostředí. U plůdku *C. carpio* je vhodné provádět rychlenou metodu odchovu plůdku (Krupauer a Kubů, 1985).

2.3.2.2. Gyrodaktylóza

Původce nemoci: Zástupci čeledi *Gyrodactylidae* parazitují na žábrách a kůži ryb vyskytujících se na našem území. Jedná se o živorodé hermafrodity, kteří mají přímý vývin. Jejich kaudální fixační aparát (haptor), umístěný v zadním konci těla, je opatřen 16 chitinoidními okrajovými háčky, jedním párem středních háčků a dvěma spojovacími destičkami. Centrální háčky jsou menší než u parazitů způsobujících daktylogyrózu. Hlava má tvar písmene „V“. *Gyrodactylus* má v přední části těla dva body, ale nemá oči a živí se buněčnou drtí a krví (Amlacher, 1970; Ergens a Lom, 1970; Krupauer a Kubů, 1985; Lucký, 1986; Noga, 2000; Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967; Svobodová a kol., 2007).

Pro zástupce čeledi *Gyrodactylidae* je typická malá somatická velikost 1–1,5 mm, ale existují i velmi drobné druhy o délce 0,18–0,32 mm jako *G. gracilis* (Amlacher, 1970; Ergens a Lom, 1970).

V dnešní době se gyrodaktylové vyskytují v malém počtu oproti minulosti, kdy toto onemocnění způsobovalo úhyny celých populací. Nyní jsou těžké infekce víceméně nahodilé, zapříčiněné špatnými podmínkami životního prostředí ryb (Noga, 2000).

Vstupní brána: Parazité napadají přímo kůži, žábry, ploutve, nosní jamky nebo dutinu ústní (Ergens a Lom, 1970; Krupauer a Kubů, 1985; Noga, 2000; Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967; Svobodová a kol., 2007).

Zdroj infekce: *Gyrodactylus* se do prostředí dostává s nemocnými rybami nebo v přítokové vodě (Svobodová a kol., 2007).

Vnímavost ryb: Původci cizopasí na různých druzích ryb (Ergens a Lom, 1970), především však na kaprovitých a lososovitých rybách (Hoole a kol., 2001; Lucký, 1986). Toto onemocnění postihuje zejména plůdek a násadu (Svobodová a kol., 2007).

Predispoziční faktory: Infekce gyrodaktylózou je téměř vždy výsledkem špatných podmínek v chovu ryb, kde dochází například k velké kumulaci odpadních produktů metabolismu současně s nízkou koncentrací kyslíku (Amlacher, 1970; Noga, 2000). V těchto podmínkách se parazité dokáží velmi rychle rozmnožovat. K reprodukci dceřinné generace jim stačí necelých 24 hodin. Intenzita množení je závislá na teplotě. K nadměrnému rozvoji monogeneí obvykle dochází na jaře (Noga, 2000).

Patogeneze: Žábrolísti mechanicky poškozují tkáň hostitele (Ergens a Lom, 1970; Krupauer a Kubů, 1985; Svobodová a kol., 2007). Kožní parazité svými přichytnými disky rozrušují tkáň a vytvářejí místa vhodná pro sekundární infekce (Hoole a kol., 2001; Svobodová a kol., 2007).

Klinické příznaky: Při silnějších infekcích ryby zpočátku projevují neklid, otírají se o dno a později jsou malátné a vyhledávají případně prohlubně ve dnu nádrže (Volf a Havelka, 1958). Postižené ryby jsou vyhublé a eventuálně i hynou (Hoole a kol., 2001).

Patologickoanatomické změny: Všeobecně tyto cizopasníci způsobují léze ve svrchních vrstvách pokožky. Těžce infikované ryby mají zduřenou začervenalou neprůhlednou kůži nebo tmavě modrý nádech (Amlacher, 1970; Hoole a kol., 2001).

Diagnóza: Cizopasníky je možné snadno identifikovat mikroskopováním tenkého kožního nebo žaberního seškrabu v kapce vody při zvětšení mikroskopu 45–120× (Amlacher, 1970; Noga, 2000). Mají charakteristické trhavé nebo housenkovité pohyby, během kterých se jakoby protahují a cukají sebou zpět (Noga, 2000). Mrtvé ryby jsou téměř nepoužitelné k určení nemoci, protože po úhynu hostitele *Gyrodactylus* rapidně rybu opouští. Avšak byly pozorovány případy, kdy se i po 12 hodinách od úhynu na kůži ryb vyskytovali živí parazité (Amlacher, 1970).

Terapie: Některé terapie lze úspěšně použít pro veškeré monogeneózy, ale jiné účinkují pouze na určité parazitální druhy. Proto je nanejvýš žádoucí nejdříve identifikovat, o který druh se jedná, a následně aplikovat příslušná léčiva, k nimž jsou dané druhy dostatečně senzitivní (Noga, 2000). Chorobu léčíme krátkodobými koupelemi v 35% formalínu na 100 litrů vody po dobu 16 minut (Amlacher, 1970; Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967), ačkoli Noga (2000) uvádí, že k takto vysokým

dávkám nemusejí být všechny druhy ryb tolerantní. Experimenty byla také prokázána účinnost koupele v 0,2% manganistanu draselném po dobu 5 minut (Hoole a kol., 2001; Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967). Efektivním řešením léčby gyrodaktylózy, po zákazu používání malachitové zeleně v léčbě ryb určených ke konzumním účelům, se jeví kyselina peroctová (Zusková a kol., 2011).

Prevence: Nejdůležitějším profylaktickým přístupem je zabránění zamoření rybochovného prostředí cizopasníky a v neposlední řadě také provádění pravidelných kontrol zdravotního stavu ryb (Svobodová a kol., 2007).

2.3.3. Artropodózy

Artropodózy jsou onemocnění zapříčiněná kmenem členovců (*Arthropoda*). Mezi nejčastější nemoc způsobovanou členovci patří argulóza (Svobodová a kol., 2007).

2.3.3.1. Argulóza

Původce nemoci: Řád kapřivci (*Branchiura*) je zastoupen pouze čeledí *Argulidae*. Jedná se o kapřivce s přímým vývojem. U našich ryb se vyskytují tři druhy z rodu *Argulus*. Nejfrekventovanějším druhem je kapřivec plochý *Argulus foliaceus*. Často lze na rybách najít také druhy: kapřivec velký *A. coregoni* a kapřivec rybníční *A. japonicus*. Původci cizopasí dočasně, jelikož mají možnost rybu opustit a nějaký čas žít bez hostitele. Řadí se tedy mezi fakultativní ektoparazity.

Tělo kapřivců je oválné, velmi dorzoventrálně zploštělé a zelenohnědě zbarvené. Dorzální strana hlavohrudi je vybavena charakteristickým robustním štítem, který sahá až k ocasní ploutvičce. Běžně měří přibližně 7 mm. Největší druh *A. coregoni*, pak dorůstá až do délky 12 - 14 mm. Na hlavě jsou charakteristická dvě černá fasetová očka a hlava volně přechází v první hrudní článek (Ergens a Lom, 1970; Hoole a kol., 2001; Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007).

Vstupní brána: Rod *Argulus* napadá kůži a ploutve ryb (Hoole a kol., 2001; Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007).

Vnímavost ryb: Tato choroba postihuje různé druhy ryb, jak ryby ve volné vodě, tak i v rybníčních chovech. Existují druhy kapřivců s nízkou specifitou vůči druhu ryby, jako například *A. foliaceus* či kapřivci specializující se na konkrétní druh ryby jako hostitele (Hoole a kol., 2001; Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007). Mezi původce

argulózy s afinitou k určitým druhům patří kapřivec velký *A. coregoni* napadající zejména lososovité a lipanovité, ale také síhovité ryby nebo kapřivec rybníční *A. japonicus*, který cizopasí na *C. carpio* (Ergens a Lom, 1970; Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007).

Predispoziční faktory: Kapřivci se na rybách vyskytují v největší prevalenci v letních měsících. Při teplotě vody $8-12^{\circ}\text{C}$ se vývoj kapřivců zastaví (Hoole a kol., 2001; Svobodová a kol., 2007), a tudíž lze za faktor podmiňující vzplanutí tohoto onemocnění označit vyšší teplotu vody, konkrétně okolo 20°C . Dále se na rozvoji infekce podílí velké nahloučení ryb, malá pohyblivost a oslabení ryb. V nepříznivých podmínkách se parazité obalí slizem, aby na hostitelích přečkali zimu. Se zvyšováním teploty vody na jaře se opět stávají aktivními a vyvíjí se (Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007). Velké ryby dokážou přežít i relativně silné infekce, zatímco menší ryby jsou vůči chorobě citlivější (Hoole a kol., 2001). Kapřivci jsou nebezpeční zejména pro plůdek, pro který může být i přítomnost jen několika jedinců letální. Za rizikové se považují invaze v počtu >10 jedinců u plůdku a >100 jedinců u násady (Ergens a Lom, 1970; Svobodová a kol., 2007).

Patogeneze a vývojový cyklus: Po kopulaci samice opouštějí hostitele a kladou vajíčka na vhodný substrát v nádrži (Hoole a kol., 2001). Volně plovoucí larvy se vylihnou z vajíček nakladených na předměty ve vodě a pokud tyto larvy nenajdou do 2–3 dnů hostitele, tak hynou. Jestliže cizopasnici hostitele naleznou, přichytí se na ryby pomocí dvou kruhovitých přísavek a jedním párem antenul. Následně svým chobotkem penetrují kůži a vysávají z hostitele krev a tělní tekutinu. Probodnutá místa krvácí a ryba zde produkuje více hlenu. V těžkých případech může u ryb dojít k poruše osmoregulace, anémii, sekundární plísňové a bakteriální infekci a následnému úhynu (Hoole a kol., 2001; Svobodová a kol., 2007).

Klinické příznaky: Nemocné ryby vyhledávají kyslíkatější vodu (Lucký, 1986). Slabé infekce ryb se projevují změnami v chování jako jsou letargie, nechutenství a podráždění (Hoole a kol., 2001). Zjevnější příznaky se manifestují až při silnějších infekcích, při kterých ryby přestávají přijímat krmivo a snaží se otírat o předměty ve vodě (Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007). Někdy tato parazitóza zlikviduje pouze jedince a jindy zdecimuje celé populace.

Patologickoanatomické změny: Jedná se o eroze ploutví, nadměrnou produkci hlenu a krváceniny v místě poškození cizopasníky (Hoole a kol., 2001). Na nemocných rybách pozorujeme hemoragie na spodní části hlavy a těla. Při chronickém průběhu

onemocnění jsou kapřivci zahaleni do šedavého a lehce prominujícího hlenového valu (Amlacher, 1970; Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007).

Diagnóza: Kapřivci jsou snadno makroskopicky pozorovatelní. Protože původci splývají tvarem těla s povrchem kůže ryb, je vhodné se při jejich hledání zaměřit na zřetelná černá fasetovaná očka. Determinace na úroveň druhu je prováděna dle ocasní ploutvičky (Amlacher, 1970; Lucký, 1986), která vznikla splynutím posledních dvou hrudních článků se zadečkem. Tato ploutvička je porušena silným zářezem, jenž ji rozděluje na ocasní laloky. Například pro kapřivce *A. coregoni* je určujícím kritériem zahrocení ocasních laloků (Ergens a Lom, 1970).

Terapie: Chorobu lze zmírnit ponořovací koupelí v roztoku lyzolu v množství 2 ml·l⁻¹vody po dobu 5–15 vteřin, koupelí v manganistanu draselném či krátkodobou koupelí v NaCl, kterou je možno použít při přelovování ryb. Pokud není intenzita infekce kapřivci velmi silná, tak je vhodné koupele neprovádět. K tlumení argulózy se v případech s ojedinělou až střední intenzitou napadení kapřivci doporučuje pouze zlepšit zdravotní stav ryb a kvalitu prostředí. (Amlacher, 1970; Kabata, 1970; Svobodová a kol., 2007). K léčbě argulózy byla také testována močka z čajovníkových semen, ale ta se ukázala jako letální pro ryby, pokud musel být použita při silných invazích ve větším množství (Kabata, 1970).

Prevence: Nejlepším řešením prevence argulózy se jeví takové hospodaření na rybářství, které dbá na dobrou kondici ryb a optimální biologicko-chemické parametry vody v rybochovných nádržích (Hoole a kol., 2001).

2.3.3.2. Ergasilóza

Původce nemoci: Většina parazitů z čeledi *Ergasilidae*, která čítá více než 100 druhů, cizopasí zejména na kaprovitých druzích ryb. Onemocnění způsobují především *Ergasilus sieboldi*, česky zvaný chlopek obecný, *E. briani*, *E. minor* a další druhy z rodů *Ergasilus*, *Neoergasilus*, *Paraergasilus* a *Sinergasilus* (Amlacher, 1970; Ergens a Lom, 1970; Hoole a kol., 2001; Lucký, 1986; Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967; Svobodová a kol., 2007). Původci choroby jsou korýši z řádu klanonožci (*Copepoda*) a jejich hruštičkovité článkované tělo se člení na hlavu, hrud' a zadeček. Koncový článek zadečku je prodloužen ve furku. Adultní samice mají uložena vajíčka ve dvou vaječných vacích (Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007). Počet vajíček přesahuje abundanci 100 vajíček na 1 samici chlopka (Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967).

Délka těla, do které samice dospělých parazitů dorůstají je specifická pro každý druh a pohybuje se v rozmezí 1–2,7 mm. Samci jsou menšího tělesného rámce než samice (Ergens a Lom, 1970; Hoole a kol., 2001; Lucký, 1986; Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967). Na rybách parazitují dospělé samičky, a proto se determinační znaky zakládají na morfologii samic (Amlacher, 1970; Ergens a Lom, 1970; Lucký, 1986; Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967). Určují se podle odlišností samičích přichytných orgánů, které vykazují značnou variabilitu a jsou tedy dobrým identifikačním cílem. Juvenily a samce chlopků je značně obtížné až téměř nemožné determinovat na úrovni druhu. Na původcích této choroby jsou nejméně znatelné morfologické adaptace na parazitický způsob života ze všech paraziticky žijících koryšů (Hoole a kol., 2001).

E. sieboldi žije ve všech našich povodích a typech vod (Ergens a Lom, 1970) a má zajímavý sezónní cyklus. Na jaře (přibližně duben) naupliová stádia opouštějí vajíčka, získávají modrý pigment a vyvíjejí se přímo v dospělé kopepodity (Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967). Délka trvání vývoje závisí na teplotě vody. Teplejší vodní prostředí podněcuje růst. Samečci žijí pouze dva týdny a umírají bezprostředně po oplození, k čemuž obvykle dochází v červnu, kdy již lze pozorovat samičky přichycené na hostitelích (Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967). Dospělé samičky, které cizopasí na rybách, ztrácí schopnost plavat ve vodě, ale mohou se pohybovat po povrchu žaber (Hoole a kol., 2001). V létě se parazité vyskytují ve dvou populacích. První se objevuje v červnu a druhá, pětinasobně početnější, v září. Cizopasnici napadají intenzivněji ryby pelagiálu, než ryby žijící u dna, skryté ve vegetaci (Amlacher, 1970).

Při makroskopickém prohlédnutí jsou parazité podobní volně žijícím buchankám, ale naopak zjevně se liší tím, že koncový článek druhého modifikovaného páru končetin (antén) je u patogenních samiček vybaven mohutným trnem. Na žábrách lze původce pozorovat jako malé bílé cizopasníky (Ergens a Lom, 1970; Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967).

Vstupní brána: Původci cizopasí na žábrách ryb (Amlacher, 1970; Ergens a Lom, 1970; Lucký, 1986; Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967).

Vnímavost ryb: Vůči parazitickým klanonožcům rodu *Ergasilus* jsou vnímavé různé druhy ryb (Ergens a Lom, 1970; Hoole a kol., 2001; Lucký, 1986; Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967). Výskyt chlopků byl potvrzen u čeledí *Cyprinidae*, *Salmonidae*, *Esocidae*, *Percidae*, *Siluridae*, *Cichlidae* a *Clupeidae* (Hoole a kol., 2001). Nebezpečné jsou zejména juvenilním rybám. Existuje minimálně 79 druhů sladkovodních ryb, na kterých tyto koryši parazitují. *E. sieboldi* nejčastěji napadá lína obecného (*Tinca tinca*).

Sinergasilus major napadá amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*) a *Sinergasilus lienii* cizopasí na *H. molitrix* (Ergens a Lom, 1970; Lucký, 1986; Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967).

Predispoziční faktory: Vzplanutí choroby podmiňuje teplota vody vyšší než 20°C, velké nahloučení ryb a prostředí s malým průtokem vody (Lucký, 1986).

Patogeneze: Parazité mechanicky poškozují tkáň žaber a při silné intenzitě infekce dochází k nadprodukcí slizu a objevují se krváceniny (Ergens a Lom, 1970). Porušená místa jsou potenciální vstupní bránou pro sekundární invaze plísní (Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967).

Klinické příznaky: Infikované ryby plavou pod hladinou, vyhledávají kyslíkatější vodu u přítoku, kde se shromažďují a obecně vykazují příznaky dušení. Může docházet k poruchám plavání a postupnému hynutí ryb (Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007).

Patologickoanatomické změny: Obvykle jsou změny viditelné pouze v okolí postiženého místa, kde bývá zduřelá tkáň, hemoragie a nekrotická ložiska. (Amlacher, 1970; Lucký, 1986).

Diagnóza: Diagnóza se stanovuje na základě makroskopického prohlédnutí žaber (Lucký, 1986).

Terapie: Léčba ergasilózy je komplikovaná a v praxi se k ní zpravidla nepřistupuje (Svobodová a kol., 2007). Pokud se terapie provádí, tak se musí brát v potaz variabilní citlivost ryb vůči jednotlivým léčivům. Je možno aplikovat krátkodobé koupele manganistanu draselného v dávce 1g na 10l vody po dobu 5–10 minut nebo 1g formalínu na 4l vody po dobu 1 hodiny (Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967). Rozvoj chlopků lze tlumit již v naupliovém stádiu. Pozitivní fototaxe chlopků umožňuje provádět noční lov navnazením parazitů na světelný zdroj a následnou likvidaci pomocí chemikálií, například chlorového vápna (Lucký, 1986).

Prevence: V rámci prevence jsou prováděny periodické veterinární prohlídky ryb v průběhu teplého ročního období a při převozu ryb (Amlacher, 1970; Lucký, 1986; Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967). Před vysazením ryb do nádrží by se měly ryby prohlédnout, zda nejsou napadené chlopkami (Kabata, 1970).

2.3.4. Mykózy

Jedná se o nemoci způsobované plísněmi.

2.3.4.1. Saprolegnióza

Původci nemoci: Jedná se o povrchové zaplísnění způsobované oomycetami rodů *Saprolegnia* a *Achlya*. U nás se běžně vyskytuje druh *Saprolegnia parasitica*. Tyto plísně se skládají z hyf, které tvoří rozvětvené mycelium (Lucký, 1986; Svobodová a kol., 2007). U zástupců rodu *Saprolegnia* jsou hyfy propleteny do všech směrů, ale vlákna plísní *Achlya* jsou seskupena celkem rovnoběžně (Frank, 1984). *Saprolegnia ssp.* napadá hlavně poškozený povrch kůže a žaber, na kterém se uplatňuje jako sekundární patogen a může zapříčinit až smrt postižených organismů (Hoole a kol., 2001).

Vstupní brána: Spory přítomné ve vodním prostředí se přichytávají na poškozenou kůži, žábry, ústa, ploutve a oči (Amlacher, 1970; Volf a Havleka, 1958). Rozrůstají se v tlustou vrstvu vláken zvaných hyfy. Shluk vláken se nazývá mycelium (Svobodová a kol., 2007).

Vnímavost ryb: K této chorobě jsou vnímavé všechny druhy ryb všech věkových kategorií, včetně jiker. Onemocnění se vyskytuje celoročně, ale nejvíce po skončení zimy (Lucký, 1986).

Predispoziční faktory: Plísně rodů *Saprolegnia* a *Achlya* se usazují na poškozených místech kůže nemocných, poraněných nebo silně zesláblých ryb (Amlacher, 1970; Scheurmannová, 2005). Ke zmnožení patogenů většinou dochází v málo prokysličených vodách, kde se nakumulovaly hnilobné organické látky, nahromaděné v důsledku překrmování či nepostačujícímu odkalování rybochovných nádrží (Frank, 1984). Rozhodujícím faktorem podmiňujícím vzplanutí saprolegniózy je fyziologický stav ryb. Velmi často zaplísňují odumřelé jikry, k čemuž většinou dochází během inkubace jiker při velkém nahloučení (Bruno a Poppe, 1996).

Patogeneze: Kůže a sliz ryb obvykle působí jako dostatečná ochrana proti sporám plísní. Jakmile však dojde k poškození kůže a porušení slizové vrstvy, tak se tento obranný mechanismus ryb stává pro spory prostupným, a tudíž zde rostou a množí se (Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967). Plísně poraňují okolní buňky, šíří se kůží a vylučují fermenty, a tímto rozrušují tkáň. V pokročilém stádiu nemoci jsou zaplísněny

rozsáhlé plochy kůže (Lucký, 1986; Volf a Havelka, 1958). Postižená místa jsou také potenciální vstupní bránou pro bakteriální infekce (Amlacher, 1970).

Klinické příznaky: Ryby jsou malátné a vyplouvají do břehových partií nádrže, kde později může dojít až k úhynu (Volf a Havelka, 1958).

Patologickoanatomické změny: *Saprolegnia* a *Achlya* jsou na rybách makroskopicky pozorovatelné jako šedobílé až hnědé vatovité nárosty, které lze snadno odstranit (Reichenbach-Klinke a Landolt, 1967).

Diagnóza: Diagnóza se stanovuje na základě mikroskopie postižených míst a vyhodnocení situace. Plíseň může být zaměněna s hlenem a jinými usazeninami na rybě (Volf a Havelka, 1958). Využívá se zvětšení mikroskopu 100× (Lucký, 1986).

Terapie: Doporučuje se krátkodobá koupel v 3% chloridu sodném po dobu 10-15 minut (Volf a Havelka, 1958). Počáteční stádia zaplísnění lze léčit koupelí v manganistanu draselném v dávce 1 g na 100 litrů vody po dobu 60-90 minut (Amlacher, 1970).

Prevence: Ochrana spočívá zejména v odstranění predispozičních faktorů, k čemuž je přispíváno šetrným zacházením s rybami a péčí o rybochovné prostředí (Volf a Havelka, 1958).

2.3.4.2. Branchiomykóza

Původce nemoci: Rod *Branchiomyces* jsou oomycety, jejichž zástupci *Branchiomyces sanguinis* a *Branchiomyces demigrans* způsobují nemoc zvanou branchiomykóza (Hoole a kol., 2001).

Vstupní brána: Choroba postihuje žábry (Lucký, 1986; Volf a Havelka, 1958).

Zdroj infekce: K zamoření prostředí dochází přísunem patogenů z přitékající vody nebo z nemocných, případně uhynulých ryb (Lucký, 1986).

Vnímavost ryb: Vnímavé druhy jsou *C. carpio*, *T. tinca*, *E. lucius*, *S. glanis*, *O. mykiss* a *C. lavaretus* a jiné (Lucký, 1986).

Predispoziční faktory: Mezi faktory podmiňující vzplanutí choroby patří teplota vody nad 20 °C, silné organické znečištění, velké nahloučení ryb, nízká koncentrace rozpuštěného kyslíku a vysoká abundance řas (Amlacher, 1970).

Patogeneze: Průběh nemoci může být akutní až chronický. Při akutním průběhu choroby jsou postiženy jen periferní části žaberních lístků. Vlákna těchto patogenů prorůstají žaberní cévy a u druhu *B. demigrans* se vlákna rozrůstají i do tkání v okolí

žaber. Rozvětvená vlákna jsou bez přepážek a následně jsou vyplněna velkým množstvím kulovitých spor (Svobodová a kol., 2007). V krajním případě dochází k nekróze žaber (Hoole a kol., 2001).

Klinické příznaky: Postižené ryby vyhledávají kyslíkatější vodu, nouzově dýchají a hynou ve velkém počtu (Volf a Havelka, 1958).

Patologickoanatomické změny: Na žábách jsou výrazné šedé nekrotické a překrvené okrsky. Střídáním těchto míst je pozorovatelné tzv. mramorování žaber (Svobodová a kol., 2007). Žábry jsou zduřelé a okraje žaberních lístků nerovné (Lucký, 1986).

Diagnóza: V žabením epitelu jsou nalézána četná vlákna plísně. Je prováděno mikroskopické vyšetření roztlačené, chorobně změněné části žaber při zvětšení mikroskopu 150× (Lucký, 1986). Zjištění této nákazy žaber je snadné podle zmíněného mramorování, ale při mírnějším průběhu není výrazné (Volf a Havelka, 1958).

Terapie: Jako účinná terapie je doporučováno snížení organického znečištění a snížení teploty vody pod 20 °C (Noga, 2000). Při akutním průběhu nemoci se má přestat krmit, zvýšit přítok vody do rybníka a na hladinu periodicky aplikovat chlorové vápno v dávce 10-15 kg·ha⁻¹, s tím, že maximální počet aplikací nesmí přesáhnout 3 za týden (Svobodová a kol., 2007).

Prevence: V rámci prevence je optimální dbát na čistou vodu, dostatečnou prokysličenost a odstraňovat posečené vodní porosty (Lucký, 1986).

2.4. Laboratorní vyšetření hematologického profilu periferní krve

Hematologické parametry jsou měřitelné uznávané indikátory fyziologických stavů anebo odpovědí organismu na terapeutický zásah, probíhající patologické změny a další intervence okolního prostředí.

Vyšetření krve patří k základním laboratorním vyšetřením. Předmětem vyšetření je odebraná krev, ve které se stanovují jednotlivé hematologické ukazatele. Stanovení fyziologického rozmezí hodnot jednotlivých hematologických ukazatelů u zdravých ryb je nesnadné, protože hodnoty jsou silně ovlivňovány endogenními a exogenními faktory, a proto se fyziologické hodnoty těchto ukazatelů považují pouze za orientační (Svobodová a kol., 2012). Většina hematologických parametrů kaprovité ryby katla

obecná (*Catla catla*) vykazuje vyšší hodnoty v létě, než v jiných ročních obdobích, což je pravděpodobně způsobeno zvýšenou metabolickou činností v důsledku vyšší teploty vody a reprodukční aktivity (Pradhan a kol., 2012). Hematologické vyšetření hraje významnou roli v diagnostice chorob (Clauss a kol., 2008). Krevní parametry jsou považovány za biomarkery imunotoxicity, tedy indikátory toxicity pro imunitní systém (Wester a kol., 1994).

Základním předpokladem spolehlivých výsledků vyšetření hematologického profilu krve je správný odběr krve (Klener a kol., 2000).

2.4.1. Odběr a stabilizace krve ryb

Krev je odebírána punkcí ocasních cév nebo kardiální punkcí. Odběr je nutné provádět bezprostředně po vylovení ryb. Vylovené ryby jsou rychle fixovány za hřbetní část vlhkou utěrkou z netkané textilie přiměřených rozměrů. Takto zafixovaná ryba je po celou dobu odběrového zákroku svírána prsty jedné ruky. Druhou rukou je otřena krajina místa budoucího vpichu jehly buničitou vatou, aby došlo k vysušení místa. Uchopí se čistá a suchá heparinovaná injekční jehla o průsvitu do 0,9 mm, kterou zavedeme do ryby. Nabereme krev, kterou pak necháme odkapat do mikrozkušavek s víčkem. Metodu odběru volíme podle velikosti ryb, potřeby množství krve pro vyšetření a pozdějších potřeb nakládání s rybou. U plůdku odebíráme krev zejména vnější punkcí srdce, ale u ryb o váze >200g, včetně generačních, odebíráme krev zejména z ocasních cév (Svobodová a kol., 2012).

V řadě vyšetření potřebujeme pracovat s nesrážlivou krví, a proto používáme protisrážlivé prostředky (*antikoagulancia*), mezi které patří například citrát sodný nebo heparin (Klener a kol., 2000). Při vyšetření krve ryb je zpravidla používána heparinovaná krev (Svobodová a kol., 2012).

2.4.2. Charakteristika a stanovení hodnot červeného krevního obrazu

Mnoho krevních změn je v první řadě spojeno se změnami v krevním obraze, konkrétně se změnami v množství hemoglobinu (Hb), hematokritové hodnotě (PCV), erythrocytech (RBC), leukocytech (WBC) a v dalších parametrech (Pecka, 2006). K parametrům erythrocytů vypočteným z hodnot vyjmenovaných výše patří: střední objem erythrocytu (MCV), střední obsah hemoglobinu v erythrocytu (MCH) a střední barevná koncentrace (MCHC) (Howard a Hamilton, 1997).

2.4.2.1. Erythrocyty (RBC)

Červené krvinky ryb (erythrocyty) mají jádro (Pecka, 2006; Volf a Havelka, 1958). Význam přítomnosti jádra v rybích erythrocytech je spojován s životností erythrocytů, které u ryb zanikají za přibližně 1,5 roku, zatímco životnost lidských bezjaderných erythrocytů je cca 110 dní (Wedemeyer a kol., 1976). Erythrocyty kostnatých ryb mají oválný až eliptický tvar, který se podobá erythrocytům všech ostatních obratlovců, vyjma savců. Erythrocyty chrupavčitých ryb jsou podobného tvaru jako erythrocyty kostnatých ryb, ale mnohem větší velikosti (Clauss a kol., 2008). Hlavní funkcí erythrocytů v organismu je transport kyslíku z dýchacích orgánů do tkání a oxidu uhličitého opačným směrem. Erythrocyty obsahují červené krevní barvivo hemoglobin, což je specializovaný protein, na který se váží právě kyslík a oxid uhličitý. K zachování své struktury si erythrocyty vytvářejí prostřednictvím glykolýzy adenosintrifosfát (ATP) (Dylevský, 2000; Howard a Hamilton, 1997; Pecka, 2006). Oválné jádro rybích erythrocytů je situováno ve středu erythrocytu. Rybí erythrocyty jsou izochromní, což znamená, že mají stejnou barevnost a stavy anizochromie, tedy nestejně barevnosti erythrocytů, u ryb značí zvýšenou erythropoézu (tvorbu červených krvinek) (Svobodová a kol., 2012). Ke vzniku červených krvinek dochází v hematopoetické tkáni přední části ledvin (Wedemeyer a kol., 1976).

2.4.2.2. Počet erytrocytů

Počet červených krvinek (RBC) se vyjadřuje v 1 l krve (Pecka, 2006). RBC je u ryb stanovován v heparinizované krvi naředěné Natt-Herrickovým nebo Hayemovým roztokem v poměru 1:200. Takto naředěná krev se kapátkem nebo Pasteurovou pipetou přenesse do Bürkerovy počítací komůrky, ve které jsou počítány erytrocyty klasickou počítací metodou ve stanovených obdélnících při 200× zvětšení. Počítají se všechny erytrocyty ležící uvnitř obdélníků v mřížce Bürkerovy komůrky, aniž se dotýkají některé z jejich stran a erytrocyty dotýkající se jedné delší a jedné kratší strany, a to zevnitř i vně.

Hodnoty počtu erytrocytů se u zdravého kapra obecného (*Cyprinus carpio*) pohybují v rozmezí 1,1-1,8 $T \cdot l^{-1}$ a u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) v rozmezí 0,80-1,5 $T \cdot l^{-1}$ krve (Svobodová a kol., 2012). Mlčáci mají pravděpodobně větší počet erytrocytů než jikernačky a obě pohlaví mají více erytrocytů v letním období, než v zimním období (Pradhan a kol., 2012). Erytropenie, neboli pokles počtu červených krvinek, je spojována se sníženým obsahem hemoglobinu (Srivastava a kol., 2009). V pokusu na sivenech amerických (*Salvelinus fontinalis*) nakažených aeromonádami (*Aeromonas hydrophila* a *A. caviae*) bylo pozorováno vysoce signifikantní ($p < 0,01$) snížení RBC z hodnoty 0,92 $T \cdot l^{-1}$ u zdravých ryb na 0,62 $T \cdot l^{-1}$ u nemocných ryb (Řehulka, 2005).

2.4.2.3. Hemoglobin (Hb)

Je tvořen bílkovinou globinem a hemem obsahujícím železo. Hemoglobin se nachází v červených krvinkách a je přenašečem krevních plynů kyslíku a oxidu uhličitého (Dylevský, 2000). Rybí hemoglobin má oproti savčímu vyšší afinitu ke kyslíku (Svobodová a kol., 2012). Snížení hemoglobinu je mnohdy doprovázeno i poklesem počtu erytrocytů a snížením hematokritové hodnoty (Pecka, 2006).

2.4.2.4. Množství hemoglobinu

Množství hemoglobinu v krvi ryb se stanoví fotometrickou kyanohemoglobinovou metodou, při níž se pomocí transformačního roztoku uvolní hemoglobin z červených krvinek a změní se na stálý kyanohemoglobin.

Následně je fotometricky stanovována extinkce vzorku kyanohemoglobinu v 1cm kyvetě při nastavení spektrofotometru na vlnovou délku 540-546 nm. Kalibrační křivka je vytvořena pomocí komerčně připravených kyanohemoglobinových standardů a transformačního roztoku. Z kalibrační křivky je poté určeno množství hemoglobinu. Hemoglobin v krvi zdravých *C. carpio* a *O. mykiss* se pohybuje v rozmezí 60-100 g·l⁻¹ (Svobodová a kol., 2012). Podobné fyziologické hodnoty Hb 87,4 g·l⁻¹ byly nalezeny u *S. fontinalis* (Řehulka, 2005). Mezi pohlavími u *C. catla* byly zjištěny signifikantní (p<0,05) rozdíly v množství hemoglobinu (Pradhan a kol., 2012).

2.4.2.5. Hematokrit (PCV)

Krevní buňky tvoří jednu třetinu až jednu polovinu z celkového objemu krve (Wedemeyer a kol., 1976). Většina z těchto buněk jsou erytrocyty (Anderson, 1974). Hematokrit je podíl erytrocytů z celkového objemu krve (Dylevský, 2000). Hodnoty PCV se mohou lišit v závislosti na stáří a pohlaví ryb, fotoperiodě, kvalitě vody, stravě, ročním období a pohybové aktivitě ryb. Chrupavčité ryby mají nižší koncentrace velikostně větších buněk červených krvinek než kostnaté ryby a obvykle mají i nižší hematokrit. Hodnota hematokritu se u ryb liší v rámci druhu a pravděpodobně koreluje s pohybovou aktivitou ryb. U aktivně se pohybujících ryb jako je tuňák a další pelagické ryby bývají zjišťovány mnohem vyšší hodnoty hematokritu, než u méně aktivních ryb jako je například platýz (Clauss a kol., 2008). Bylo zjištěno, že hustota obsádky, při sádkování juvenilů vyzy velké (*Huso huso*), má z mnoha sledovaných hematologických parametrů (RBC, WBC, Hb, MCV, MCH a MCHC) vliv na hematokritovou hodnotu (Rafatnezhad a kol., 2008).

Pro stanovení hematokritu je nutné separovat erytrocyty od plazmy. Oddělení erytrocytů probíhá v heparinizovaných kapilárách s odebranou krví, když se tyto kapiláry centrifugují v hematokritové odstředivce při rychlosti 14 000 otáček za minutu po dobu 3 minut. Ze separované krve v kapilárách jsou následně na hematokritovém měřidle přímo odečítána procenta hematokritu z celkového objemu krve. Procentuální hodnota se vynásobí koeficientem 0,01 a výsledkem je hematokritová hodnota, která se udává v l·l⁻¹. Fyziologické hodnoty se u *C. carpio* pohybují v rozmezí 0,28-0,40 l·l⁻¹ a u *O. mykiss* v rozmezí 0,30-0,45 l·l⁻¹ (Svobodová a kol., 2012). Při absenci referenčních hodnot hematokritu pro daný druh ryby je akceptováno všeobecné rozmezí 0,20-0,40

$l \cdot l^{-1}$ (Clauss a kol., 2008). Hodnota hematokritu může být zkreslena při anémiích (Pecka, 2006).

2.4.2.6. Střední objem erytrocytu (MCV)

Střední objem erytrocytu vyjadřuje průměrný objem buňky v hodnocených erytrocytech (Pecka, 2006). Střední objem erytrocytu je podíl hematokritu v $l \cdot l^{-1}$ a počtu erytrocytů v $T \cdot l^{-1}$ podle následujícího vzorce:

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

Fyziologická hodnota středního objemu erytrocytu udávaná ve fentolitrech (fl) se u *C. carpio* pohybuje v rozmezí 200-300 fl, u *O. mykiss* v rozmezí 350-400 fl a u *S. fontinalis* přibližně 423 fl (Řehulka, 2005; Svobodová a kol., 2012).

2.4.2.7. Střední obsah hemoglobinu v erytrocytu (MCH)

Hodnota MCH vyjadřuje průměrnou koncentraci hemoglobinu v erytrocytu, je udávána v pikogramech – pg (10^{-12} g). MCH je tedy podíl hemoglobinu (Hb) v $g \cdot l^{-1}$ a počtu erytrocytů (RBC) v $T \cdot l^{-1}$ a vypočte se podle vzorce:

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

Fyziologická hodnota středního obsahu hemoglobinu v erytrocytu se u *C. carpio* pohybuje v rozmezí 50-60 pg a u *O. mykiss* v rozmezí 65-75 pg (Svobodová a kol., 2012).

2.4.2.8. Střední barevná koncentrace (MCHC)

Hodnota MCHC je koncentrace hemoglobinu v objemové jednotce erytrocytů udávanou v $l \cdot l^{-1}$ a vypočítáme ji z hemoglobinu v $g \cdot l^{-1}$ a z hematokritu v $l \cdot l^{-1}$ podle vzorce:

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

Fyziologická hodnota se u *C. carpio* pohybuje v rozmezí 0,20-0,26 $l \cdot l^{-1}$ a u *O. mykiss* v rozmezí 0,17-0,20 $l \cdot l^{-1}$ (Svobodová a kol., 2012). U zdravých *S. fontinalis* byla v práci Řehulky (2005) zjištěna střední barevná koncentrace 0,214 $l \cdot l^{-1}$. Sieroslawska a kol. (2012) posuzovali vliv extraktu z cyanobakterií na krevní parametry *C. carpio* a po 24 hodinové expozici bylo pozorováno signifikantní ($p < 0,05$) zvýšení MCHC oproti kontrolní skupině.

2.4.3. Charakteristika a stanovení hodnot bílého krevního obrazu

2.4.3.1. Leukocyty (WBC)

Leukocyty (bílé krvinky) jsou v krvi zastoupeny v mnohem menším počtu, než erytrocyty a stejně jako erytrocyty vznikají v hematopoetické tkáni přední části ledvin (Wedemeyer a kol., 1976). Bílé krvinky (leukocyty) mají funkci v obranných reakcích organismu. Leukocyty jsou bezbarvé kulovité buňky, které obsahují jádro. V bílé krevní složce rozeznáváme, narozdíl od červené krevní složky, několik druhů, morfologicky, funkčně a svým původem často i vzdálených a značně různorodých konečných stádií krvinek (Pecka, 2006). Při normálních podmínkách jsou v krvi nacházeny tyto krvinky:

- neutrofilní tyčky a segmenty
- eozinofilní segmenty
- bazofilní segmenty
- monocyty
- lymfocyty

Leukocyty tvoří skupinu buněk velmi rozdílného tvaru (Dylevský, 2000; Volf a Havelka, 1958). Z morfologického hlediska dělíme leukocyty na:

- granulocyty – polymorfonukleáry (neutrofilní, eozinofilní a bazofilní)
- agranulocyty – mononukleáry (lymfocyty, monocyty a plazmocyty)

Nejběžnějším typem granulocytů je u kostnatých ryb neutrofilní granulocyt. Tyto buňky mají zaoblená jádra, která mohou, ale nemusí být segmentovaná a barva jejich cytoplazmy se pohybuje od velmi světle bílé či šedé až po modrou v závislosti na druhu. Eozinofilní granulocyty jsou u kostnatých ryb méně časté a bazofilní granulocyty jsou vzácné (Clauss a kol., 2008).

2.4.3.2. Počet leukocytů

Stanovení je nutné provést ihned po odběru krve, jinak může dojít ke změnám v krevních buňkách. Snížení WBC v periferní krvi pod fyziologické hodnoty je nazýváno termínem leukopenie a zvýšený počet leukocytů se nazývá leukocytóza (Pecka, 2006). Pro stanovení počtu leukocytů se krev heparinizuje a naředí Natt-Herrickovým roztokem v poměru 1:200. Počet leukocytů je důležitým hematologickým parametrem zvláště při infekčních onemocněních. Hodnoty počtu leukocytů se pohybují ve velmi širokém rozmezí. U *C. carpio* nabývá počet leukocytů hodnot $10\text{-}80\text{ G}\cdot\text{l}^{-1}$ a u *O. mykiss* $10\text{-}60\text{ G}\cdot\text{l}^{-1}$ (Svobodová a kol., 2012).

2.4.4. Trombocyty

Krevní destičky neboli trombocyty jsou buněčné úlomky, ale nikoliv pravé buňky. Jedná se o malá křehká tělíška nepravidelného tvaru, která cirkulují v krvi a jsou nositeli řady látek navozujících krevní srážení (koagulaci). Pokud je poškozena cévní stěna, tak trombocyty unášené krevním proudem narážejí na okraje porušených či zhmožděných míst a z jejich cytoplazmy se začíná uvolňovat řada látek podporujících srážení, zejména tromboplastin. Postupně dochází k vytváření krevní zátky a stahování cév (Dylevský, 2000). Trombocyty ryb se svou morfologií podobají jádrům erytrocytů (Anderson, 1974).

2.5. Laboratorní vyšetření biochemického profilu periferní krve

2.5.1. Měření biochemických parametrů krve ryb

Měření probíhá na různých biochemických analyzátoch. Pro tzv. suché analýzy jsou zapotřebí jednotlivá stanovení biochemických parametrů je potřeba na jeden reagenční disk (slide) odpovídající vzorkový objem plazmy. Pokud máme k dispozici jen malé množství vzorku nebo pokud očekáváme vysoké hodnoty parametru, který stanovujeme, tak se přikročí k naředění vzorku fyziologickým roztokem. K analýze biochemických ukazatelů lze využít plazmu i krevní sérum (Kolářová a Velíšek, 2012).

2.5.2. Glukóza (GLU)

Glukóza je nejdůležitějším zdrojem energie. Fyziologické hodnoty se u *C. carpio* pohybují v rozmezí 1,3-6,9 mmol·l⁻¹ a u *O. mykiss* v rozmezí 2,6-6,0 mmol·l⁻¹. Výrazný pokles koncentrace glukózy ukazuje na akutní selhání jater způsobený náhlým vyčerpáním glykogenu. Zvýšená koncentrace 10-30 mmol·l⁻¹ glukózy v krvi ryb indikuje stres (Kolářová a Velíšek, 2012).

2.5.3. Celkové bílkoviny (TP)

Koncentrace celkové bílkoviny v plazmě sdružuje veškeré bílkoviny ve vodné fázi krve. Hlavní jednoduchá složka celkové bílkoviny u zdravého organismu sestává z albuminu (ALB) a alfa, beta a gama globulinů. Koncentrace globulinů (GLOB) lze stanovit separací albuminu od celkových bílkovin (Kolářová a Velíšek, 2012). Zvýšené hodnoty TP jsou indikátorem poškození buněk jater a ledvin (Walmsley a kol., 1992). Snížené hodnoty celkových bílkovin indikují dlouhodobě probíhající infekci nebo otravu např. pesticidy na bázi triazinů (Velíšek a kol., 2008). Snížení TP bylo taktéž zaznamenáno při experimentálním nasazení infekce houbových chorob exofialózy a fialofilózy u *C. carpio* a *O. mykiss* (Řehulka, 2005).

2.5.4. Aspartátaminotransferáza (AST)

Aspartátaminotransferáza se nachází v mitochondriích a cytoplazmatické tekutině. Vyskytuje se v játrech, kosterním svalstvu, ledvinách a erytrocytech. V játrech a svalových buňkách je neaktivnější a zvýšená aktivita enzymu AST indikuje onemocnění jater a kosterní svaloviny, ale pro poruchy jater není sám o sobě specifický, ukazuje zejména na poškození svalové tkáně (Kolářová a Velíšek, 2012). Výrazné zvýšení aspartátaminotransferázy indikuje nekrózu jaterního parenchymu, onemocnění myokardu a onemocnění svalů způsobené dlouhotrvající fyzickou námahou (Racek a kol., 2006; Řehulka, 2005). Jeho aktivita v plazmě dosahuje maxima 24 hodin od poškození tkáně a navrácí se do normálních hodnot za cca 7-10 dní. Fyziologický rozsah aktivity enzymu AST se u *C. carpio* pohybuje v rozmezí 0,55-6,64 $\mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$ a u *O. mykiss* v rozmezí 0,80-6,26 $\mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$ (Kolářová a Velíšek, 2012). Biologický poločas ($T_{1/2}$) určuje dobu, po kterou bude mít enzym zvýšenou aktivitu v krevním séru. Biologický poločas aspartátaminotransferázy činí 17 hodin (Racek a kol., 2006).

2.5.5. Alaninaminotransferáza (ALT)

Jedná se o cytoplazmatický enzym přítomný zejména v cytoplazmě jaterních buněk. Při zvýšení propustnosti hepatocytární membrány, již při malém poškození, je vyplavován do krevního oběhu. Fyziologické hodnoty aktivity ALT se u *C. carpio* pohybují v rozmezí 0,10-1,60 $\mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$ a u *O. mykiss* v rozmezí 0,08-1,42 $\mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$ (Kolářová a Velíšek, 2012). Biologický poločas enzymu ALT je 48 hodin, tedy delší než biologický poločas enzymu AST (Racek a kol., 2006). Významné zvýšení katalytické koncentrace alaninaminotransferázy je indikátorem poškození hepatocytů (Řehulka, 2005; Sierosławska a kol., 2012). Zvýšení aktivity ALT ukazuje také na metabolické vady s participací jater (Neff, 1985).

2.5.6. Kreatinkináza (CK)

Kreatinkináza je enzym složený ze dvou podjednotek, které jsou dvojího typu: M (v kosterní svalovině) a B (v mozku). Kombinací těchto podjednotek vznikají tři izoenzymy kreatinkinázy: MM, MB a BB. CK katalyzuje reverzibilní fosforylaci kreatininu a adenosintrifosfátu (ATP) na kreatinfosfát a adenosindifosfát (ADP). Isoenzym BB se vyskytuje v mozku a v krvi je nalézán ojedinele. Isoenzym MM je nacházen v kosterním a srdečním svalstvu. Hybridní izoenzym MB nacházíme v obou typech příčně pruhovaného svalstva. S rostoucím podílem hybridního izoenzymu CK-MB v séru, roste pravděpodobnost, že má kardiální původ (Racek a kol., 2006). Změna aktivity kreatinkinázy je indikátorem poškození svaloviny (zhmoždění svalů, progresivní svalová dystrofie, hemofilie), velké tělesné námahy či intoxikace. Fyziologický rozsah aktivity CK u *C. carpio* nabývá hodnot v rozmezí 11,98-18,70 $\mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$ a u *O. mykiss* v rozmezí 13,49-25,0 $\mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$ (Kolářová a Velíšek, 2012). Zvýšení aktivity kreatinkinázy v plazmě může být spojováno s poškozením jater, ale je považováno spíše za marker poškození svalů nebo mozku (Sieroslawska a kol., 2012).

2.5.7. Laktátdehydrogenáza (LDH)

Laktátdehydrogenáza katalyzuje poslední reakci anaerobní glykolýzy, což vysvětluje nález LDH prakticky ve všech tkáních (Racek a kol., 2006). LDH je všudypřítomný enzym, nespecifický pro jaterní parenchym, avšak důležitý při diferenciální diagnóze poškození jater. Laktátdehydrogenáza je tvořena čtyřmi podjednotkami dvou možných typů, a to M (sval) a H (srdce). Stanovení aktivity laktátdehydrogenázy je indikátorem poškození jater, kosterní a srdeční svaloviny a některých nádorových chorob (Kolářová a Velíšek, 2012). Zvýšení katalytické koncentrace LDH ukazuje na poškození jaterních buněk (Řehulka, 2005). Fyziologický rozsah aktivity LDH je u *C. carpio* v rozmezí 9,9-22,0 $\mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$ a u *O. mykiss* v rozmezí 6,1-22,0 $\mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$ (Kolářová a Velíšek, 2012).

3. Materiál a metodika

3.1 Podmínky testu

Test probíhal v akvariijní místnosti VÚRH Vodňany. Celkem 48 amurů bílých (*Ctenopharyngodon idella*) původem z Rybářství Hluboká cz. s.r.o., o průměrné hmotnosti $21,9 \pm 4,4$ g, bylo rozděleno do šesti skupin po 8 rybách a umístěno do 100 l akvárií. Po převozu do akvariijní místnosti VÚRH byly ryby po dobu 14ti dní aklimatizovány v čisté vodě a příkrmovány komerční směsí pro *C. idella* v dávce 3,5 % hmotnosti ryb. Polovina objemu vody byla denně měněna, přičemž teplota vody se pohybovala v rozmezí 13,3-15,4°C. Aearace byla zabezpečována kontinuálním přísunem vzduchu prostřednictvím vzduchovacích kamínků. Koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě během testu neklesla pod 78%. Po uplynutí aklimatizační doby se ryby přestaly krmit a bezprostředně po výměně vody byla do pokusných akvárií (skupiny P1 a P2) aplikována kyselina peroctová (ve formě 36% Persterilu) dle následujícího schématu:

- kontrolní skupina (kontrola): $0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ KPO
- pokusná skupina (P1): $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ KPO
- pokusná skupina (P2): $3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ KPO

Pro testované koncentrace KPO byly připravovány naředěné zásobní roztoky, které se pak dávkovaly podle potřeby. KPO nesmí přijít do styku s kovy, proto se k manipulaci používalo výhradně plastových či skleněných nádob. Zásobní roztok Persterilu 36 se připravil tak, že se 2,85 ml Persterilu 36 doplnilo do 1000 ml vodou (Zusková a kol., 2011).

Po 5 dnech aplikace byla rybám z ocasní cévy (*vena caudalis*) odebrána krev za použití heparinizované injekční stříkačky (Obrázek 2) a následně byly ryby usmrceny. Odebraná krev byla zpracována dle Svobodové a kol. (2012).

3.2 Hematologické vyšetření

Hematologickým vyšetřením byly stanoveny následující parametry: počet erytrocytů (RBC), počet leukocytů (WBC), množství hemoglobinu (Hb), hematokrit (PCV), střední barevná koncentrace (MCHC), střední obsah hemoglobinu v erytrocytu (MCH) a střední objem erytrocytu (MCV). Analýzy byly prováděny podle Jednotných metod hematologického vyšetřování ryb (Svobodová a kol., 1991).

3.3 Biochemické vyšetření

Biochemický profil krve byl stanoven z krevní plazmy získané odstředěním krve v odstředivce Microcentrifuge MPW-55 (MPW Med. instruments) při 14 000 otáčkách po dobu 3 minut. Separovaná plazma byla do doby biochemické analýzy uložena v mrazícím boxu při teplotě -80°C . Po vyjmutí vzorků krevní plazmy před vlastní biochemickou analýzou byly vzorky uloženy na ledu (Obrázek 3), aby nedošlo k jejich znehodnocení.

Biochemické indikátory byly stanoveny na biochemickém analyzátoru VETTEST 8008 (IDEXX Laboratories Inc. U.S.A., firmy Medisoft). Přístroj pracuje na principu suché chemické a kolorimetrické analýzy. Vyhodnocení probíhá na selektivních testovacích discích neboli reagenčních discích (Multi – laier film slides, Kodak), laserovým čtením bar kódů. Stanoveny byly následující biochemické parametry: glukóza (GLU), celkové bílkoviny (TP), aspartátaminotransferáza (AST), alaninaminotransferáza (ALT), kreatinkináza (CK) a laktátdehydrogenáza (LDH). U hodnot CK a LDH bylo nutné přikročit k ředění fyziologickým roztokem, aby biochemický analyzátor dokázal určit aktivitu sledovaných parametrů. Fyziologický roztok pro ryby byl v koncentraci 0,65% vodný roztok chloridu sodného. Zředěný roztok krevní plazmy a fyziologického roztoku byl přenesen do polypropylenových zkumavek eppendorf a před napipetováním do přístroje byl vždy důkladně promíchán na vortexu MS 3 basic (IKA[®]). Výsledné hodnoty naředěných vzorků byly vynásobeny hodnotou ekvivalentní k použitému naředění. Například, pokud byl vzorek krevní plazmy naředěn fyziologickým roztokem v poměru 1:2, tak byla výsledná hodnota vynásobena číslem 2, pokud bylo naředění v poměru 1:20, tak byla výsledná hodnota vynásobena číslem 20.

3.4 Histologické vyšetření

Pro histologické vyšetření byl vždy 3 rybám z každé skupiny odebrán kus kůže se svalovinou z oblasti pod hřbetní ploutví a druhý žaberní oblouk z pravé strany ryby, který byl následně propláchnut v 0,9% solno-sacharózovém roztoku, aby bylo zajištěno dostatečné odstranění zbytků krve ze žaberní tkáně. Vzorky byly bezprostředně po odběru fixovány ve formalínu a odeslány na histologické vyšetření do VFU Brno. Vzorky byly barveny hematoxylin-eozinovým barvením.

3.5 Statistické vyhodnocení

Výsledky byly zaznamenány v programu Microsoft Excel a poté byly vyhodnoceny a porovnány statistickým programem STATISTICA (verze 8.0 pro Windows, firmy StatSoft) za použití dvoucestného ANOVA testu a byly zde vyhodnoceny statisticky významné rozdíly na hranici významnosti ($p < 0,05$ a $p < 0,01$). Data byla nejprve pomocí Kolmogorov-Smirnova testu testována na normalitu a následně byla pomocí Bartlettova testu ověřována hypotéza o homogenitě variancí. V případě, že byla prokázána normalita dat a homogenita variancí, byla dále použita dvoucestná analýza variance (ANOVA) a následně mnohonásobné porovnání skupin pomocí Tukey testu. V případě, že podmínky nebyly splněny, bylo porovnání provedeno pomocí neparametrického Kruskal-Wallisova testu (Zar, 1996).

4. Výsledky

4.1. Mortalita

V kontrolní skupině a skupině P1 nedošlo během testu k žádným úhynům amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*). Naproti tomu ve skupině P2 došlo druhý den aplikace k úhynu většiny ryb – přežily pouze 2 ryby, které aplikaci KPO v koncentraci 3 mg·l⁻¹ vydržely až do konce testu. Vzhledem k malému počtu přeživších ryb ve skupině P2, nebyly u této skupiny prováděné hematologické a biochemické analýzy dále statisticky zpracovány.

4.2. Hematologické vyšetření

Ve skupině P1 a zbytku ryb ze skupiny P2 nedošlo v porovnání s kontrolou ke statisticky významným ($p < 0,05$) změnám v hematologických ukazatelích (Tabulka 1).

Tabulka 1: Výsledková tabulka s rozsahem naměřených hodnot hematologických ukazatelů u *C. idella*. V tabulce jsou znázorněny kontrolní skupina ryb bez aplikované kyseliny peroctové (kontrola), skupina ryb s koncentrací 1 mg·l⁻¹ KPO (P1) a skupina ryb s koncentrací 3 mg·l⁻¹ KPO (P2). Ukazatel je vyjádřen hodnotou průměru v dané skupině ± směrodatná odchylka. Index ^a charakterizuje shodu hodnot mezi skupinami na hladině významnosti ($p < 0,05$).

Hematologický ukazatel	Jednotky	kontrola	P1	P2
RBC	T·l ⁻¹	2,20±0,13 ^a	2,32± 0,51 ^a	1,95 ± 0,08
WBC	G·l ⁻¹	42,56±7,45 ^a	37,94 ± 7,15 ^a	29,25 ± 4,75
PCV	l·l ⁻¹	0,31±0,03 ^a	0,32 ± 0,02 ^a	0,30 ± 0,01
Hb	g·l ⁻¹	66,99± 9,18 ^a	65,56 ± 7,22 ^a	63,02 ± 8,24
MCV	fl	142,02±13,41 ^a	142,10± 30,32 ^a	155,34 ± 5,09
MCH	pg	29,63±4,34 ^a	28,84 ± 7,55 ^a	32,20 ± 2,90
MCHC	l·l ⁻¹	0,22± 0,03 ^a	0,21 ± 0,02 ^a	0,21 ± 0,03

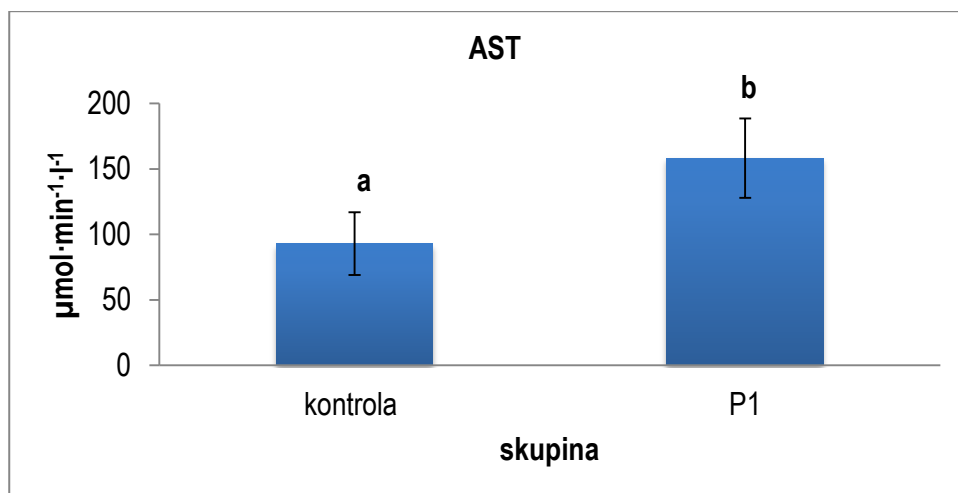
4.3. Biochemické vyšetření

Ve skupině P1 (1 mg·l⁻¹ KPO) došlo ke statisticky významným změnám ve třech biochemických ukazatelích, kterými byly aspartátaminotransferáza (AST), kreatinkináza (CK) a laktátdehydrogenáza (LDH) (Tabulka 2). Všechny tyto tři ukazatele byly statisticky významně zvýšené (p<0,01). Aktivitu enzymů kreatinkinázy a laktátdehydrogenázy se u některých vzorků nepodařilo stanovit. V pokusu bylo nutné použít naředění vzorků krevní plazmy fyziologickým roztokem v rozmezí 1:2-1:40, aby bylo možné provést analýzu. Pokud analyzátor nestanovil během prvních dvou náhodně zvolených ředění hodnotu enzymu, tak často nezbyl dostatek krevní plazmy pro další analýzu.

Tabulka 2: Výsledková tabulka s rozsahem naměřených hodnot biochemických ukazatelů u *C. idella*. V tabulce jsou znázorněny kontrolní skupina ryb (kontrola) bez aplikované kyseliny peroctové a skupina ryb s koncentrací 1 mg·l⁻¹ KPO (P1). Ukazatel je vyjádřen hodnotou průměru v dané skupině ± směrodatná odchylka. Indexy ^{a,b} charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami na hladině významnosti (p<0,01).

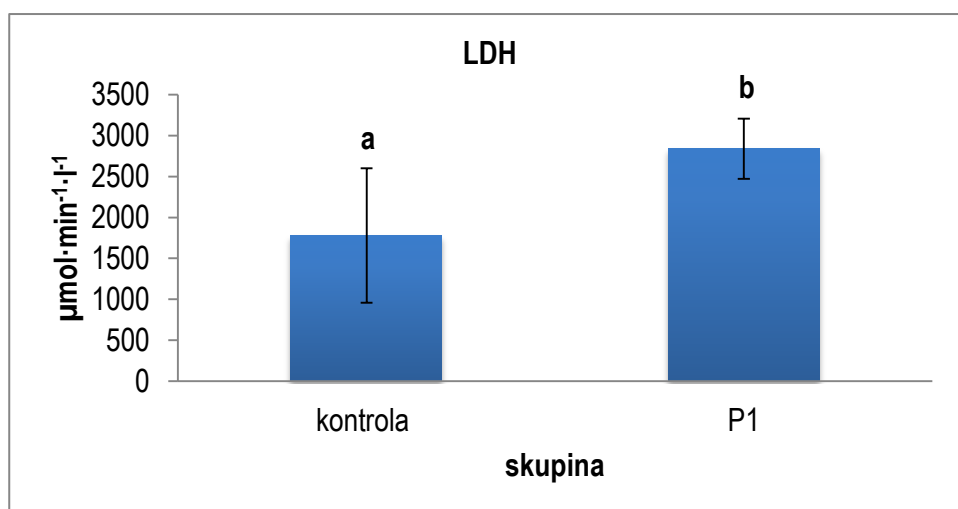
Biochemický ukazatel	Jednotky	kontrola	P1
GLU	mmol.l ⁻¹	3,21±0,83 ^a	2,87±0,42 ^a
TP	g.l ⁻¹	29,0±4,5 ^a	28,3±2,7 ^a
AST	μmol·min ⁻¹ ·l ⁻¹	93,0±24,0 ^a	158,3±30,27 ^b
ALT	μmol·min ⁻¹ ·l ⁻¹	18,8±6,8 ^a	23,5±8,0 ^a
CK	μmol·min ⁻¹ ·l ⁻¹	576,3±101,7 ^a	1160±232,7 ^b
LDH	μmol·min ⁻¹ ·l ⁻¹	1780±821 ^a	2837,5±366,8 ^b

U pokusné skupiny P1 bylo zjištěno statisticky významné zvýšení ($p < 0,01$) aktivity enzymu aspartátaminotransferázy vůči hodnotám, které byly zjištěny u kontrolní skupiny (Graf 1).



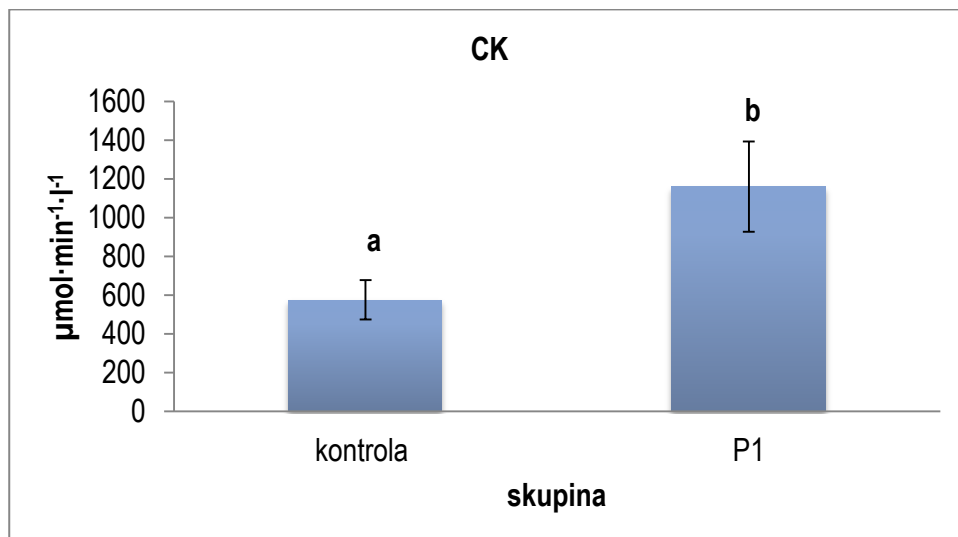
Graf 1: Zvýšení aktivity enzymu aspartátaminotransferázy (AST) v pokusné skupině ryb (P1), která byla vystavena koncentraci kyseliny peroctové $1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, ve srovnání s kontrolní neexponovanou skupinou ryb (kontrola). Ukazatel je vyjádřen hodnotou průměru v dané skupině \pm směrodatná odchylka. Indexy ^{a,b} charakterizují rozdílnost hodnot mezi skupinami na hladině významnosti ($p < 0,01$).

U pokusné skupiny P1 bylo zjištěno statisticky významné zvýšení ($p < 0,01$) aktivity enzymu laktátdehydrogenázy vůči hodnotám, které byly zjištěny u kontrolní skupiny (Graf 2).



Graf 2: Zvýšení aktivity enzymu laktátdehydrogenázy (LDH) v pokusné skupině ryb (P1), která byla vystavena koncentraci kyseliny peroctové $1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, ve srovnání s kontrolní neexponovanou skupinou ryb (kontrola). Ukazatel je vyjádřen hodnotou průměru v dané skupině \pm směrodatná odchylka. Indexy ^{a,b} charakterizují rozdílnost hodnot mezi skupinami na hladině významnosti ($p < 0,01$).

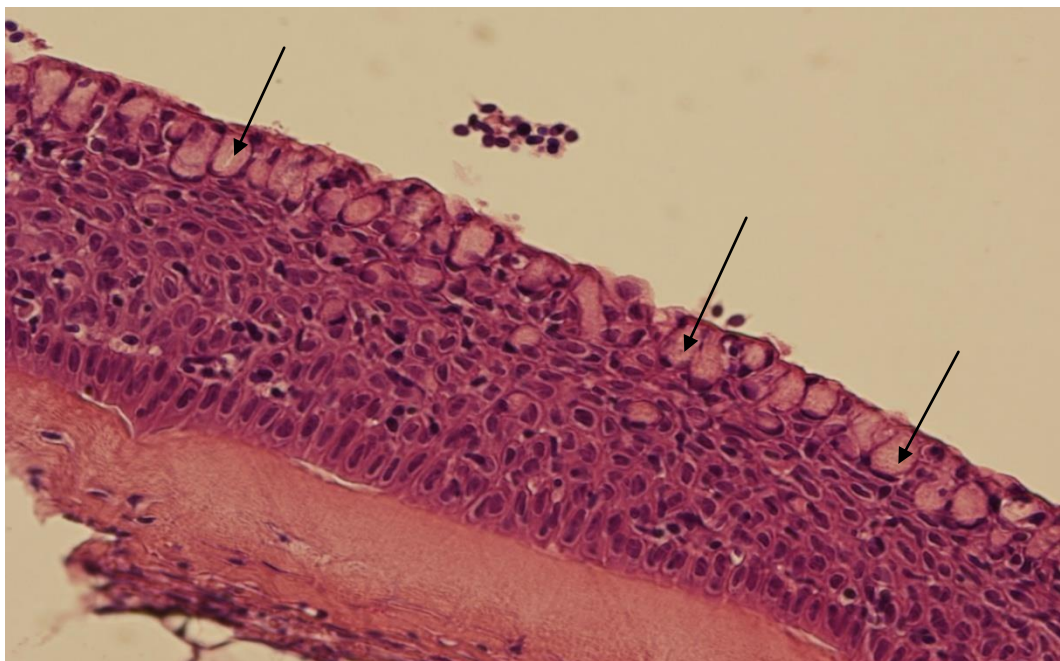
U pokusné skupiny P1 bylo zjištěno statisticky významné zvýšení ($p < 0,01$) aktivity enzymu kreatinkinázy oproti hodnotám, které byly zjištěny u kontrolní skupiny (Graf 3).



Graf 3: Zvýšení aktivity enzymu kreatinkinázy (CK) v pokusné skupině ryb (P1), která byla vystavena koncentraci kyseliny peroctové $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, ve srovnání s kontrolní neexponovanou skupinou ryb (kontrola). Ukazatel je vyjádřen hodnotou průměru v dané skupině \pm směrodatná odchylka. Indexy ^{a,b} charakterizují rozdílnost hodnot mezi skupinami na hladině významnosti ($p < 0,01$).

4.4. Histologické vyšetření

Histologické změny byly zaznamenány zejména na kůži u obou pokusných skupin. Pozorováno zde bylo výrazné zmnožení a zvětšení pohárkových buněk (Obrázek 1). Na histologických preparátech žaber nebyly pozorovány žádné změny.



Obrázek 1: Histologické změny na kůži v pokusné skupině ryb (P1), která byla vystavena koncentraci kyseliny peroctové $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Pro příklad jsou zmnožené a zvětšené pohárkové buňky označeny šipkami. Barveno H×E, zvětšení 400×.

5. Diskuze

Vysoká mortalita ryb ve skupině P2, způsobená kyselinou peroctovou v koncentraci $3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ naznačuje, že zvolená terapeutická dávka kyseliny peroctové měla velmi blízko k letální dávce pro amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*).

Při expozici kyselině peroctové ryby pravděpodobně potřebovaly zvýšit množství hlenu k ochraně svého těla. Hlen je tvořen mucinem v pohárkových buňkách. Proto se domnívám, že došlo k jejich zmnožení a zvětšení jejich objemu, v reakci na obranu před kyselinou peroctovou, která je silná žíravina.

V následujícím textu je diskutován vliv kyseliny peroctové na hematologické ukazatele ryb u pokusné skupiny P1 v kontrastu či souladu s ostatními experimenty zabývajícími se tématikou vlivu léčiv a cizorodých látek na zdravotní stav ryb, vyhodnocovaný na podkladě hematologických a biochemických ukazatelů.

Gaikowski a kol. (2009) hledali nejvyšší možnou terapeutickou koncentraci chloraminu-T pro candáta severoamerického (*Stizostedion vitreum*) a jedinou statisticky významnou změnou v periferní krvi candáta při nejvyšší použité koncentraci $80 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ chloraminu-T bylo, že ryby vystavené expozici léčiva měly podstatně méně zralých červených krvinek, a tudíž významně více nezralých červených krvinek vůči kontrolním neléčeným skupinám ryb. Jednalo se tedy o poruchu erythropoézy. V ostatních parametrech, jako například počet erytrocytů (RBC) a počet leukocytů (WBC), nebyly pozorovány žádné statisticky významné změny. Bylo usouzeno, že použité léčivo způsobuje patologické změny v tak malé míře, že výhody spojené s touto terapií převažují nad zápory, což koreluje s výsledky této práce, ve které sice nebyly posuzovány změny zralosti krevních buněk, ale shodně se zmíněným pokusem zde nedošlo po aplikaci terapeutické dávky ve skupině P1 ke statisticky významné změně ($p < 0,05$) v hematologických parametrech.

Jung a kol. (2003) studovali vliv krátkodobé (3 hodiny) koupele ve formalínu v různých koncentracích ($0,1$; $0,2$ a $0,3 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$) na hematologické parametry u platýze (*Paralichthys olivaceus*). Po expozici ryb došlo ve všech testovaných koncentracích ke statisticky významným změnám ($p < 0,05$) v těchto hematologických parametrech: RBC, Hb, PCV a MCHC. Změny v hematokritové hodnotě zaznamenali také Yildiz a kol. (2009) v experimentu na pstruhovi duhovém (*Oncorhynchus mykiss*) vystaveném krátkodobé koupeli ve formalínu v koncentraci $0,25 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$, když popisují statisticky významný nárůst ($p < 0,05$) hodnoty PCV, která se po přemístění ryb do čisté vody do 24

hodin vrátila do hodnot fyziologického rozmezí. Formalín je v současnosti největším konkurentem kyseliny peroctové na poli alternativních léčiv po zákazu malachitové zeleně. Ve prospěch kyseliny peroctové hovoří skutečnost, že v této studii (diplomová práce) nedošlo po aplikaci terapeutické dávky ke změnám v hematologických parametech, narozdíl od studií Junga a kol. (2003) a Yildize a kol. (2009), kteří ve svém pokusu po aplikaci terapeutické dávky formalínu zaznamenali zvýšení hematokritové hodnoty (PCV).

Léčebné koupele v malachitové zeleni také prokazatelně působily změny v krevním obraze léčených ryb. Svobodová a kol. (1997) uvádějí, že u ryb exponovaných malachitové zeleni v terapeutické dávce $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ byly pozorovány následující změny hematologických parametrů: pokles počtu monocytů, snížení hematokritové hodnoty a středního objemu erytrocytu a zvýšení hodnoty středního obsahu hemoglobinu v erytrocytu. Srivastava a kol. (2009) v experimentu na pakeříčkovci dvoupásém (*Heteropneustes fossilis*) potvrzují negativní účinky malachitové zeleně v koncentraci $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a formalínu v koncentraci $0,25 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 1 hodiny ovlivněním hematologických parametrů periferní krve ryb. Ve zmíněné studii je popisován statisticky významný pokles ($p < 0,05$) počtu erytrocytů (RBC), množství hemoglobinu (Hb), hematokritu (PCV), středního obsahu hemoglobinu v erytrocytu (MCH) a střední barevné koncentrace (MCHC) po expozici ryb malachitové zeleni i formalínu. Zároveň byl pozorován nárůst počtu leukocytů (WBC) a středního objemu erytrocytu (MCV). Dalšími, kteří také studovali vliv koncentrace $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ malachitové zeleně na hematologické ukazatele byli Silveira-Coffigny a kol. (2004), a to u tlamouna zlatého (*Oreochromis aureus*). Po 24 hodinách expozice malachitové zeleni bylo zjištěno statisticky významné zvýšení ($p < 0,05$) hematokritu, neutrofilních granulocytů a také byly nalezeny deformity erytrocytů (například erytrocyty trojúhelníkovitého tvaru). Vlivem mnohonásobně vyšší koncentrace malachitové zeleně na hematologické ukazatele se zabývali Saglam a kol. (2003) u *O. mykiss*. Bylo pozorováno, že při krátkodobé expozici ponořovací koupele (30 sec) vysoké koncentraci malachitové zeleně $66,67 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ došlo ke statisticky významnému poklesu ($p < 0,001$) počtu leukocytů (WBC) a zvýšení následujících hodnot ($p < 0,01$): množství hemoglobinu (Hb), hematokritové hodnoty (PCV) a středního objemu erytrocytu (MCV), ale nedošlo ke statisticky významnému poklesu ($p > 0,05$) počtu erytrocytů (RBC). Odvozené hematologické míry (MCH, MCHC) s postupem času expozice vzrůstaly.

Kumar a kol. (2013) zkoumali vliv potenciálního antiparazitika (proti *Argulus sp.*) azadirachtinu na hematologické a biochemické ukazatele karase stříbřitého (*Carassius auratus*). U ryb vystavených různým koncentracím azadirachtinu (1,5,15 a 20 mg·l⁻¹) byly nalezeny statisticky významné změny (p<0,05) v hematologických parametrech v krvi ryb. Signifikantně nižší, oproti neléčené kontrole, byly následující hodnoty: WBC, MCV a MCH. Rozbor krve u skupin ryb, které byly vystaveny koncentracím azadirachtinu 15 a 20 mg·l⁻¹, došlo ke změně hematologických parametrů po aplikaci léčiv. Změněny byly tyto parametry: erytrocyty (RBC) a množství hemoglobinu (Hb) a u ryb exponovaných 20 mg·l⁻¹ azadirachtinu byla zvýšená střední barevná koncentrace (MCHC).

Ve zmíněných studiích došlo ke změně v hematologických parametrech po aplikaci léčiv. Naproti tomu u skupiny P1 z této studie (diplomová práce) v koncentraci 1 mg·l⁻¹ KPO nebyla pozorována signifikantní změna (p<0,05) v hematologických parametrech vůči kontrolní skupině, což v tomto směru poukazuje na minimální negativní ovlivnění organismu při zachování doporučené terapeutické koncentrace KPO.

Zdá se tedy, že koncentrace 1 mg·l⁻¹ KPO není invazivní a je plně použitelná, aniž by došlo k poškození exponovaných ryb. Význam možnosti použití kyseliny peroctové v této koncentraci spočívá v její efektivitě při terapii ryb. Podle metodiky Zusková a kol. (2011) je kyselina peroctová účinná na řadu parazitóz v koncentraci 1 mg·l⁻¹, což je koncentrace, která se v tomto pokusu ukázala jako neinvazivní pro *C. idella* tím, že neměla signifikantní vliv (p<0,05) na hematologické ukazatele. Naproti tomu téměř totální mortalita u skupiny P2 ukazuje na nevhodnost používání terapeutické dávky KPO v koncentraci 3 mg·l⁻¹.

Jelikož v odborné literatuře jsou údaje o rozmezí fyziologických hodnot pro hematologické ukazatele u *C. idella* velmi kusé, tak mohou výsledky hematologických ukazatelů u kontrolních skupin v této diplomové práci posloužit k vytvoření představy o fyziologickém rozmezí hodnot pro *C. idella*. Zmíněné zjištěné hodnoty u kontrolních skupin korelují s hodnotami, respektive s fyziologickým rozmezím hodnot práce Pourgholam a kol. (2013), kteří rovněž posuzovali změny hematologických ukazatelů u tohoto druhu ryby.

Z výsledků biochemického vyšetření této práce se zdá být nejdiskutabilnějším posouzení vlivu kyseliny peroctové na pozorované zvýšení biochemických ukazatelů AST, CK a LDH u pokusné skupiny P1.

Podle Kolářové a Veliška (2012) ukazuje zvýšení aktivity enzymů AST, CK a LDH na jednu společnou patologickou změnu, a to poškození svaloviny. Dále také popisují, že mnohonásobný nárůst aktivity enzymu LDH 10-20× (s tím, že LDH>AST>ALT) značí akutní selhání jater, dystrofii jaterních buněk a toxické poškození jater. A v této diplomové práci došlo ve skupině P1 u dvou ze tří naposledy zmíněných biochemických ukazatelů (AST a LDH) ke signifikantnímu zvýšení ($p<0,01$). Zvýšení nebylo tak vysoké, že by desetinásobně až dvacetinásobně převyšovalo hodnoty naměřené u kontrolní skupiny, ale platila posloupnost LDH>AST>ALT. Domnívám se však, že toto zvýšení u skupiny P1 indikuje spíše dočasné poškození kosterního svalstva vyvolané kyselinou peroctovou, na které také ukazuje zvýšená aktivita enzymů AST, CK a LDH. Předpokládám, že po navrácení ryb do čisté vody by se ony změřené ukazatele navrátily do hodnot odpovídajících fyziologickému rozmezí.

Podobnou reverzibilitnost změn v aktivitě enzymů krevní plazmy popisují Yildiz a kol. (2009), kteří testovali změny v biochemickém profilu krevní plazmy u *O. mykiss* po expozici formalínu a chloraminu-T. Při vystavení ryb terapeutické koncentraci formalínu $0,25 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ po dobu 24 hodin a chloraminu-T v koncentraci $5 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ po dobu 3 hodin nebyly pozorovány žádné signifikantní změny ($p<0,05$) v hodnotě TP. Ovšem po zmíněné expozici ryb formalínu a chloraminu-T došlo ke statisticky významným změnám ($p<0,05$) v hodnotě GLU, která se po navrácení ryb do čisté vody ani po 24 hodinách nevrátila do hodnot, které jsou nálezány u zdravých ryb.

Sieroslawska a kol. (2012) posuzovali vliv expozice cyanobakteriemi na biochemické ukazatele kapra obecného (*Cyprinus carpio*). V experimentu bylo pozorováno signifikantní zvýšení ($p<0,05$) glukózy, ale po 24 hodinách tato hodnota přestala narůstat. Hladina CK a LDH v plazmě intoxikovaných ryb byla signifikantně vyšší po celou dobu analýzy se vzestupným trendem, čímž byla potvrzena předpokládaná hepatotoxicita cyanobakterií. Byla zjištěna také zvýšená aktivita AST a ALT. Tyto výsledky také potvrzují zmíněnou hypotézu o navrácení zvýšených hodnot enzymů AST, CK a LDH u skupiny P1 (v této diplomové práci) do rozmezí odpovídajícímu fyziologickým hodnotám po navrácení ryb do čisté vody, protože *C. carpio* v pokusu Sieroslawské a kol. (2012) měl pravděpodobně poškozená játra hepatotoxickými microcystiny, narozdíl od ryb v mé práci, kde byla použita kyselina peroctová nezanechávající rezidua a zřejmě nezpůsobující ireverzibilní změny zdravotního stavu exponovaných ryb.

Svobodová a kol. (1997) uvádějí, že u ryb léčených malachitovou zelení v koncentraci $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ byla snižena hodnota celkových bílkovin (TP) v krevní plazmě ryb. Podobné výsledky vyšly v práci Yonar a Yonar (2010), ve které po krátkodobé expozici (30 sec) *O. mykiss* malachitové zeleni v koncentraci $66,67 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ bylo pozorováno statisticky významné snížení ($p < 0,01$) hodnoty celkových bílkovin (TP) v krevní plazmě exponovaných ryb. Jung a kol. (2003) také zaznamenali při vystavení ryb formalínu statisticky významné snížení ($p < 0,05$) hodnoty celkových bílkovin (TP) a zvýšení hodnot aspartátaminotransferáza (AST) a laktátdehydrogenáza (LDH). V této práci u pokusné skupiny P1 nedošlo při aplikaci terapeutické dávky ke zvýšení TP, ale byla zvýšená aktivita enzymů AST a LDH shodně s pokusem Junga a kol. (2003).

Raghavendra a kol. (2012) nenašli při léčbě lerneózy koupelemi v chloridu amonném žádné signifikantní změny v těchto hodnotách: TP, AST, ALT, CK a LDH, což koreluje s výsledky této diplomové práce v hodnotách AST, CK a LDH.

V pokusu na *C. auratus* Kumar a kol. (2013) zjistili statisticky významné změny v biochemickém profilu krve, u ryb léčených azadirachtinem ve všech koncentracích (1, 5, 15 a $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Došlo zde ke snížení hodnot aspartátaminotransferázy (AST) a alaninaminotransferázy (ALT). U ryb exponovaných koncentraci azadirachtinu $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ bylo pozorováno zvýšení hodnoty celkové bílkoviny (TP) a u ryb v koncentraci $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ došlo ke zvýšení hodnot glukózy (GLU) a laktátdehydrogenázy (LDH).

Biochemické ukazatele u *C. idella* zjištěné v kontrolních skupinách z této diplomové práce mohou posloužit k vytvoření představy o fyziologickém rozmezí hodnot pro *C. idella*. Velmi podobné hodnoty biochemických ukazatelů u kontrolních skupin byly zjištěny v práci Pourgholam a kol. (2013), kteří rovněž posuzovali změny v biochemických parametrech u tohoto druhu ryby.

Z výsledků zmíněných pokusů se zdá býti velmi pravděpodobná velká diverzita v odpovědích organismů na různá léčiva a různá citlivost odlišných druhů ryb k terapeutickým dávkám léčiv.

6. Závěr

Cílem práce bylo posoudit vliv dvou odlišných koncentrací kyseliny peroctové na vybrané hematologické a biochemické ukazatele a na histologický profil odebraných tkání amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*). Výsledky ukázaly na téměř totální mortalitu po aplikaci kyseliny peroctové v koncentraci $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Tudiž byla tato koncentrace označena za nepřijatelnou pro použití v terapii *C. idella*. Při vyhodnocení vlivu druhé z testovaných koncentrací kyseliny peroctové ($1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) bylo zjištěno, že tato je vhodná k terapii nemocí daného druhu ryb z hlediska zdravotního stavu ošetřených ryb. Kyselina peroctová v této koncentraci, která je zároveň doporučovanou terapeutickou koncentrací, nemá takový účinek, aby způsobila statisticky významné změny ($p < 0,05$) v hematologickém profilu krve. U ryb exponovaných kyselině peroctové v koncentraci $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ došlo v kůži ke zmnožení a zvětšení pohárkových buněk, ale z histologického vyšetření žaber nebyly patrné žádné patologické změny. Zvýšení počtu a velikosti pohárkových buněk ukazuje na vyšší potřebu ryb produkovat hlen v reakci na vystavení kyselině peroctové. Vliv kyseliny peroctové v koncentraci $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ na biochemické ukazatele byl statisticky významně změněn ($p < 0,01$) pouze ve třech sledovaných ukazatelích. Předpokládá se, že zmíněné změny jsou reverzibilní. Protože koncentrace kyseliny peroctové $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ je účinnou terapeutickou dávkou, tak považují cíle této práce za naplněné v otázce vlivu kyseliny peroctové na hematologické a biochemické ukazatele *C. idella*. Přínos této práce spočívá také v posílení pozice kyseliny peroctové jakožto relativně levného léčiva, čímž předpokládám, že bude tato přispívat k omezení aplikace terapeuticky nebezpečných látek, jakými jsou například různá antiparazitika. V budoucnosti by však bylo vhodné provést výzkum, který by posoudil vliv kyseliny peroctové na hematologické a biochemické ukazatele u řady dalších druhů ryb, zejména hospodářsky významných, protože je pravděpodobné, že by tyto ryby vykazovaly rozdílnou citlivost vůči kyselině peroctové ve stejných koncentracích. Je nutné upozornit, že terapeutická bezpečnost kyseliny peroctové v koncentraci $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ platná pro *C. idella* by teoreticky mohla být jinému druhu ryb nebezpečná, především pokud by nebyla důsledně dodržena aplikační dávka.

7. Přehled použité literatury

- Aitcheson S.J., Arnett J., Murray K.R., Zhang J. 2000: Removal of aquaculture therapeutants by carbon adsorption. 1. Equilibrium adsorption behaviour of single components. *Aquaculture*, 183: 269–284.
- Amlacher E. 1970: Textbook of fish diseases. T.F.H. Publications, Neptune City, 302 s.
- Anderson D.P. 1974: Fish immunology. V: Snieszko S.F., Axelrod H.R. (Ed.): Diseases of fishes: Book 4 Immunology. T.F.H. Publications, Neptune City, 239 s.
- Baldry M.G.C., French M.S. 1989: Disinfection of sewage effluent with peracetic acid. *Water Science and Technology*, 21: 203-206.
- Bilandžić N., Varenina I., Kolanović B.S., Oraić D., Zrnčić S. 2012: Malachite green residues in farmed fish in Croatia. *Food Control*, 26: 393-396.
- Bruno D.W., Poppe T.T. 1996: A Colour Atlas of Salmonid Diseases. Academic Press, London, 194 s.
- Clauss T.M., Dove A.D.M., Arnold J.E. 2008: Hematologic Disorders of Fish. *Veterinary Clinics of North America Exotic Animal*, 11: 445-462.
- Culp S.J., Mellick P.W., Trotter R.W., Greenlees K.J., Kodell R.L., Beland F.A. 2006: Carcinogenicity of malachite green chloride and leucomalachite green in B6C3F₁ mice and F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 1204-1212.
- Dylevský I. 2000: Somatologie. Epava, 480 s.
- Eiras J.C., Segner H., Wahli T., Kapoor B.G. 2008: Fish diseases. Science Publishers, Enfield, 612 s.
- Ergens R., Lom J. 1970: Původci parazitárních nemocí ryb. Academia, Praha, 384 s.
- Esch G.W., Hazen T.C., Dimock R.V., Gibbons J.W. 1976: Thermal Effluent and the Epizootiology of the Ciliate *Epistylis* and the Bacterium *Aeromonas* in Association with Centrarchid Fish. *Transactions of the American Microscopical Society*, 95: 687-693.
- Farmer B.D., Straus D.L., Beck B.H., Mitchell A.J., Freeman D., Meinelt T. 2013: Effectiveness of copper sulphate, potassium permanganate and peracetic acid to reduce mortality and infestation of *Ichthyobodo necator* in channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque 1818). *Aquaculture Research*, 44: 1103-1109.
- Forwood J.M., Harris J.O., Deveney M.R. 2013: Efficacy of current and alternative bath treatments for *Lepidotrema bidyana* infecting silver perch, *Bidyanus bidyanus*. *Aquaculture*, 416-417: 65-71.
- Frank S. 1984: Akvaristika. Práce, Praha, 284 s.
- Gaikowski M.P., Densmore C.L., Blazer V.S. 2009: Histopathology of repeated, intermittent exposure of chloramine-T to walleye (*Sander vitreum*) and (*Ictalurus punctatus*) channel catfish. *Aquaculture*, 287: 28-34.

- Gehr R., Wagner M., Veerasubramanian P., Payment P. 2003: Disinfection efficiency of peracetic acid, UV and ozone after enhanced primary treatment of municipal wastewater. *Water Research*, 37: 4573-4586.
- Gustavino B., Buschini A., Monfrinotti M., Rizzoni M., Tancioni L., Poli P., Rossi C. 2005: Modulating effects of humic acids on genotoxicity induced by water disinfectants in *Cyprinus carpio*. *Mutation Research*, 587: 103-113.
- Hébert N., Gagné F., Cejka P., Bouchard B., Hausler R., Cyr D.G., Blaise C., Fournier M. 2008: Effects of ozone, ultraviolet and peracetic acid disinfection of a primary-treated municipal effluent on the Immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 148: 122-127.
- Hoole D., Bucke D., Burgess P., Wellby I., 2001: Diseases of carp and other cyprinid fishes. Fishing News Books, Malden, 264 s.
- Howard M.R., Hamilton P.J. 1997: Haematology: an illustrated colour text. Churchill Livingstone, New York, 110 s.
- Chinabut S., Limsuwan C., Tonguthai T., Pungkachonboon T., 1988: Toxic and sublethal effect of formalin on freshwater fishes. [online] FAO Corporate document repository. Dostupné z: www.fao.org/docrep/field/003/AC278E/AC278E00.htm. Naposledy změněno Prosinec 1988. Převzato Duben 11, 2014.
- Jaafar R.M., Kuhn J.A., Chettri J.K., Buchmann K. 2013: Comparative efficacies of sodium percarbonate, peracetic acid, and formaldehyde for control of *Ichthyobodo necator* - an ectoparasitic flagellate from rainbow trout. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 43: 139-143.
- Jung S.H., Sim D.S., Park M-S., Jo Q., Kim Y. 2003: Effects of formalin on haematological and blood chemistry in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture Research*, 34: 1269-1275.
- Kabata Z. 1970: *Crustacea as Enemies of Fishes*. V: Snieszko S.F., Axelrod H.R. (Ed.): Diseases of fishes: Book 1. T.F.H. Publications, Neptune City, 171 s.
- Kitis M. 2004: Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Environment International*, 30: 47-55.
- Klener P., Brodanová M., Danzig V., Honzák R., Chmel J., Jirásek V., Kalvach Z., Kršek M., Perlík F., Votava J., Votava V., Žabka J. 2000: Vnitřní lékařství I. Informatorium, Praha, 99 s.
- Koivunen J., Heinonen-Tanski H. 2005: Peracetic acid (PAA) disinfection of primary, secondary and tertiary treated municipal wastewater. *Water Research*, 39: 4445-4453.
- Kolářová J., Svobodová Z. 2009: Léčebné a preventivní postupy v chovech ryb. Edice Metodik, VÚRH Vodňany, 30 s.
- Kolářová J., Velíšek J. 2012: Stanovení a vyhodnocení biochemického profilu krve ryb. Edice Metodik, VÚRH Vodňany, 54 s.

- Kouřil J., Svobodová Z., Vykusová B., Hamáčková J. 1984: Antiparazitární a protiplísňové koupele raného plůdku kapra, býložravých ryb a sumce. Edice Metodik, VÚRH Vodňany, 8 s.
- Krupauer V., Kubů F. 1985: Kapr obecný. Naše vojsko, Praha, 201 s.
- Krupauer V. 1989: Býložravé ryby. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 116 s.
- Kumar S., Raman R.P., Kumar K., Pandey P.K., Kumar N., Mallesh B., Mohanty S., Kumar A. 2013: Effect of azadirachtin on haematological and biochemical parameters of *Argulus*-infested goldfish *Carassius auratus* (Linn. 1758). *Fish Physiology and Biochemistry*, 39: 733-747.
- Ling F., Wang J-G., Liu Q-F., Li M., Ye L-T., Gong X-N. 2010: Prevention of *Ichthyophthirius multifiliis* infestation in goldfish (*Carassius auratus*) by potassium ferrate(VI) treatment. *Veterinary Parasitology*, 168: 212-216.
- Ling F., Wang J-G., Wang G-X., Gong X-N. 2011: Effect of potassium ferrate(VI) on survival and reproduction of *Ichthyophthirius multifiliis* tomonts. *Parasitology Research*, 109: 1423-1428.
- Lom J., Dyková I., Svobodová Z., Zajíček J. 1989: Protozoární paraziti užitkových ryb. Diagnostika, patogenita a hlavní zásady tlumení. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 103 s.
- Lom J., Dykova I. 1992: Protozoan parasites of fishes. *Developments in aquaculture and fisheries*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 237–288.
- Lucký Z. 1986: Péče o zdraví a prevence chorob ryb. Naše vojsko, Praha, 188 s.
- Máchovej J., Svobodová Z., Svobodník J. 2001: Risk of malachite green application in fish farming – a review. *Veterinářství*, 51: 132-132.
- Marchand P-A., Phan T-M., Straus D.L., Farmer B.D., Stüber A., Meinelt T. 2012: Reduction of *in vitro* growth in *Flavobacterium columnare* and *Saprolegnia parasitica* by products containing peracetic acid. *Aquaculture Research*, 43: 1861-1866.
- Marchand P-A., Straus D.L., Wienke A., Pedersen L-F., Meinelt T. 2013: Effect of water hardness on peracetic acid toxicity to zebrafish, *Danio rerio*, embryos. *Aquaculture International*, 21: 679-686.
- Masters A.L. 2004: A review of methods of detoxification and neutralization of formalin in water. *North American Journal of Aquaculture*, 66: 325-333.
- Matthews R.A. 2005: *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and ichthyophthiriosis in freshwater teleosts. *Advances in Parasitology*, 59: 159-241.
- Meinelt T., Matzke S., Stüber A., Pietrock M., Wienke A., Mitchell A.J., Straus D.L. 2009: Toxicity of peracetic acid (PAA) to tomonts of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 86: 51-56.

- Monarca S., Feretti D., Collivignarelli C., Guzzella L., Zebrini I., Bertanza G., Pedrazzani R. 2000: The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. *Water Research*, 37: 4261-4269.
- Navrátil S., Svobodová Z., Lucký Z. 2000: Choroby ryb. Veterinární a farmaceutická univerzita, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Brno, 155 s.
- Neff J.M. 1985: Use of biochemical measurement to detect pollutant-mediated damage to fish. A.S.T.M. Special Technical Publication, 854: 155-183.
- Noga E.J. 2000: Fish Disease: Diagnosis and Treatment. Mosby-Year Book, St. Louis, 367 s.
- Pecka M., 2006: Laboratorní hematologie v přehledu: fyziologie a patofyziologie krevní buňky. Finidr, Český Těšín, 301 s.
- Pedersen L-F., Pedersen P.B., Sortkjaer O. 2007: Temperature-dependent and surface specific formaldehyde degradation in submerged biofilters. *Aquacultural Engineering*, 36: 127-136.
- Pedersen L-F., Pedersen P.B., Nielsen J.L., Nielsen P.H. 2009: Peracetic acid degradation and effects on nitrification in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture*, 296: 246-254.
- Pedersen L-F., Meinelt T., Straus D.L. 2013: Peracetic acid degradation in freshwater aquaculture systems and possible practical implications. *Aquacultural Engineering*, 53: 65-71.
- Picón-Camacho S.M., Marcos-Lopez M., Beljean A., Debeaume S., Shinn A.P. 2012a: In vitro assessment of the chemotherapeutic action of a specific hydrogen peroxide, peracetic acid and peroctanoic acid-based formulation against the free-living stages of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora). *Parasitology Research*, 110: 1029-1032.
- Picón-Camacho S.M., Marcos-Lopez M., Bron J.E., Shinn A.P. 2012b: An assessment of the use of drug and non-drug interventions in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876, a protozoan parasite of freshwater fish. *Parasitology*, 139: 149-190.
- Pourgholam R., Hassan M.D., Kakoolaki S., Khoshbavar Rostami H.A., Mokarrami Rostami A., Pourgholam M.A. 2013: Some hematological and biochemical changes in blood serum of Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) vaccinated with *Aeromonas hydrophila* following exposure to sublethal concentration of diazinon. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12: 12-23.
- Pradhan S.C., Patra A.K., Sarkar B., Pal A. 2012: Seasonal changes in hematological parameters of *Catla catla* (Hamilton 1822). *Comparative Clinical Pathology*, 21: 1473-1481.
- Racek J., Eiselt J., Friedecký B., Holeček B., Nekulová M., Pittrová H., Rušavý Z., Senft V., Šavlová M., Těšínský P., Verner M. 2006: Klinická biochemie. Galén, Praha, 329 s.

- Rafatnezhad S., Falahatkar B., Tolouei Gilani M.H. 2008: Effects of stocking density on haematological parameters, growth and fin erosion of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles. *Aquaculture Research*, 39: 1506-1513.
- Raghavendra A., Hemaprasanth K.P., Singh R., Sridhar N., Kumar V., Raghunath M.R. 2012: Ammonium chloride bath treatment as a quarantine measure to prevent spread of *Lernaea cyprinacea* infection during transfer of fish from affected ponds. *Journal of Fish Diseases*, 35: 243-247.
- Reichenbach-Klinke H.H., Landolt M. 1967: *Fish pathology: a guide to the recognition and treatment of diseases and injuries of fishes, with emphasis on environmental and pollution problems*. T.F.H. Publications, Hong Kong, 512 s.
- Reichenbach-Klinke H.H., Elkan E. 1965: *Principal diseases of lower vertebrates: book 1: diseases of fishes*. Academic Press, London, 600 s.
- Rintamäki-Kinnunen P. 1997: *Parasitic and Bacterial Diseases at Salmonid Fish Farms in Northern Finland*. Oulu University Press, Oulu, 171 s.
- Rintamäki-Kinnunen P., Rahkonen M., Mannermaa-Keränen A-L., Suomalainen L-R., Mykrä H., Valtonen E.T. 2005: Treatment of ichthyophthiriasis after malachite green: I. Concrete tanks at salmonid farms. *Diseases of Aquatic Organisms*, 64: 69-76.
- Řehulka J. 2005: Hematologická a biochemická charakteristika krve ryb při zdravotních poruchách a změnách výživy. Habilitační práce, Slezské zemské muzeum v Opavě, 28 s.
- Saglam N., Ispir U., Yonar M.E. 2003: The effect of a therapeutic bath in malachite green on some haematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792). *Fresenius Environmental Bulletin*, 12: 1207-1210.
- Scheurmannová I. 2005: *Sladkovodní akvárium*. Vašut, Praha, 144 s.
- Sieroslawska A., Rymuszka A., Velíšek J., Pawlik-Skowrońska B., Svobodová Z., Skowroński T. 2012: Effects of microcystin-containing cyanobacterial extract on hematological and biochemical parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38: 1159-1167.
- Silveira-Coffigny R., Prieto-Trujillo A., Aseencio-Valle C. 2004: Effects of different stressors in haematological variables in cultured *Oreochromis aureus* S. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 139: 245-250.
- Srivastava S.J., Gupta A.K., Chaturvedi S.K., Abhinav, Ram Singh 2009: Effects of short-term therapeutic bath of malachite green and formalin on certain hematological parameters of a freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Journal of Experimental Zoology*, 12: 79-83.
- Straus D.L., Meinelt T. 2009: Acute toxicity of peracetic acid (PAA) formulations to *Ichthyophthirius multifiliis* theronts. *Parasitology research*, 104: 1237-1241.

- Straus D.L., Meinelt T., Farmer B.D., Mitchell A.J. 2012: Peracetic acid is effective for controlling fungus on channel catfish eggs. *Journal of Fish Diseases*, 35: 505-511.
- Sudová E., Máchová J., Svobodová Z., Veselý T. 2007: Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 52: 527-539.
- Sudová E. 2010: Technická zpráva pilotního projektu. Technologie chovu lososovitých druhů ryb s využitím nových preventivních a terapeutických postupů. Ministerstvo zemědělství České republiky, 23 s.
- Sudová E., Straus D.L., Wienke A., Meinelt T. 2010: Evaluation of continuous 4-day exposure to peracetic acid as a treatment for *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitology Research*, 106: 539-542.
- Svobodová Z., Pravda D., Paláčková J. 1991: Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb. Edice Metodik, VÚRH Vodňany, 31 s.
- Svobodová Z., Groch L., Flajšhans M., Vykusová B., Máchová J. 1997: Effect of long-term therapeutic bath of malachite green on common carp (*Cyprinus carpio*). *Acta Veterinaria*, Brno, 66: 111-116.
- Svobodová Z., Kolářová J., Navrátil S., Veselý T., Chloupek P., Tesarčík J., Čítek J. 2007: Nemoci sladkovodních a akvarijských ryb. Informatorium, Praha, 264 s.
- Svobodová Z., Pravda D., Modrá H. 2012: Metody hematologického vyšetřování ryb. Edice Metodik, VÚRH Vodňany, 38 s.
- Van Heerden E., van Vuren J.H.J., Steyn G.J. 1995: LC50 determination for malachite green and formalin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Water SA*, 21: 87-92.
- Velišek J., Svobodová Z., Piačková V., Novotný V., Bláhová J., Sudová E., Malý V., 2008. Effects of metribuzin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinární Medicína*, 53: 324-332.
- Verner-Jeffreys D.W., Joiner C.L., Bagwell N.J., Reese R.A., Husby A., Dixon P.F. 2009: Development of bactericidal and virucidal testing standards for aquaculture disinfectants. *Aquaculture*, 286: 190-197.
- Volf F., Havelka J. 1958: Rybářská zdravotní věda. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 206 s.
- Walmsley R.N., Watkinson L.R., Koay E.S.C., 1992: Cases in chemical pathology: a diagnostic approach. World Scientific, Singapore, 451 s.
- Wedemeyer G.A., Meyer F.P., Smith L. 1976: Environmental stress and fish diseases. V: Snieszko S.F., Axelrod H.R. (Ed.): Diseases of fishes: Book 5. T.F.H. Publications, Neptune City, 192 s.
- Wester P.W., Vethaak A.D., van Muiswinkel W.B. 1994: Fish as biomarkers in immunotoxicology. *Toxicology*, 86: 213-232.

- Woo P.T.K. 1995: Fish diseases and disorders. CAB International, Wallingford, 808 s.
- Yildiz H.Y., Guzey İ.M., Ergonul M.B. 2009: Changes of Non-Specific Immune Parameters in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, After Exposure to Antimicrobial Agents Used in Aquaculture. *Journal of Applied Aquaculture*, 21: 139-150.
- Yonar M.E., Yonar S.M. 2010: Changes in selected immunological parameters and antioxidant status of rainbow trout exposed to malachite green (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97: 19-23.
- Yuan Z., Ni Y., Van Heiningen A.R.P. 1997: Kinetics of peracetic acid decomposition. 1. Spontaneous decomposition at typical pulp bleaching conditions. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 75: 37-41.
- Zar J.H. 1996: Biostatistical Analysis. Prentice-Hall. New Jersey, 662 s.
- Zhao X., Zhang T., Zhou Y., Liu D. 2007: Preparation of peracetic acid from hydrogen peroxide Part I: Kinetics for peracetic acid synthesis and hydrolysis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 271: 246-252.
- Zusková E., Máchová J., Velíšek J., Gela D. 2011: Možnosti využití kyseliny peroctové v rybářské praxi. Edice Metodik. VÚRH Vodňany, 26 s.
- Vyhláška č. 389/2008 Sb., Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 232/2004 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů, týkající se klasifikace, balení a označování nebezpečných chemických látek a chemických přípravků, ve znění pozdějších předpisů
- Zákon č. 356/2003 Sb., o chemických látkách a přípravcích.

8. Seznam zkratek

24hLC ₅₀	– koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50% testovaných organismů za 24 hodin
48hEC ₅₀	– koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn nebo imobilizaci 50% testovaných organismů perloočky v časovém úseku 24 hodin
ADP	– adenosindifosfát
ALT	– alaninaminotransferáza
AST	– aspartátaminotransferáza
ATP	– adenosintrifosfát
CK	– kreatinkináza
EC ₅₀	– efektivní koncentrace testovaného vzorku, která způsobí úhyn nebo imobilizaci 50% testovaných organismů
ErC ₅₀	– koncentrace testovaného vzorku, která způsobí 50% inhibici růstové rychlosti řasové kultury ve srovnání s kontrolou
GLU	– glukóza
Hb	– hemoglobin
H×E	– hematoxylin-eozin
HPPAPA	– formulace potenciálního léčiva založená na peroxidu vodíku, kyselině peroctové a kyselině peroxyoktanové
KPO	– kyselina peroctová
LC	– letální koncentrace
LDH	– laktátdehydrogenáza
MCH	– střední obsah hemoglobinu v erytrocytu
MCHC	– střední barevná koncentrace
MCV	– střední objem erytrocytu
MPPL	– minimální požadovaný pracovní limit
PCV	– hematokrit
RBC	– erytrocyty
TP	– celkové bílkoviny
WBC	– leukocyty

9. Seznam tabulek, obrázků a příloh

Tabulka 1: Výsledková tabulka s rozsahem naměřených hodnot hematologických ukazatelů u *C. idella*. V tabulce jsou znázorněny kontrolní skupina ryb bez aplikované kyseliny peroctové (kontrola), skupina ryb s koncentrací 1 mg·l⁻¹ KPO (P1) a skupina ryb s koncentrací 3 mg·l⁻¹ KPO (P2). Ukazatel je vyjádřen hodnotou průměru v dané skupině ± směrodatná odchylka. Index ^a charakterizuje shodu hodnot mezi skupinami na hladině významnosti (p<0,05).

Tabulka 2: Výsledková tabulka s rozsahem naměřených hodnot biochemických ukazatelů u *C. idella*. V tabulce jsou znázorněny kontrolní skupina ryb (kontrola) bez aplikované kyseliny peroctové a skupina ryb s koncentrací 1 mg·l⁻¹ KPO (P1). Ukazatel je vyjádřen hodnotou průměru v dané skupině ± směrodatná odchylka. Indexy ^{a,b} charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami na hladině významnosti (p<0,01).

Graf 1: Zvýšení aktivity enzymu aspartátaminotransferázy (AST) v pokusné skupině ryb (P1), která byla vystavena koncentraci kyseliny peroctové 1 mg·l⁻¹, ve srovnání s kontrolní neexponovanou skupinou ryb (kontrola). Ukazatel je vyjádřen hodnotou průměru v dané skupině ± směrodatná odchylka. Indexy ^{a,b} charakterizují rozdílnost hodnot mezi skupinami na hladině významnosti (p<0,01).

Graf 2: Zvýšení aktivity enzymu laktátdehydrogenázy (LDH) v pokusné skupině ryb (P1), která byla vystavena koncentraci kyseliny peroctové 1 mg·l⁻¹, ve srovnání s kontrolní neexponovanou skupinou ryb (kontrola). Ukazatel je vyjádřen hodnotou průměru v dané skupině ± směrodatná odchylka. Indexy ^{a,b} charakterizují rozdílnost hodnot mezi skupinami na hladině významnosti (p<0,01).

Graf 3: Zvýšení aktivity enzymu kreatinkinázy (CK) v pokusné skupině ryb (P1), která byla vystavena koncentraci kyseliny peroctové 1 mg·l⁻¹, ve srovnání s kontrolní neexponovanou skupinou ryb (kontrola). Ukazatel je vyjádřen hodnotou průměru v dané skupině ± směrodatná odchylka. Indexy ^{a,b} charakterizují rozdílnost hodnot mezi skupinami na hladině významnosti (p<0,01).

Obrázek 1: Histologické změny na kůži v pokusné skupině ryb (P1), která byla vystavena koncentraci kyseliny peroctové 1 mg·l⁻¹. Pro příklad jsou zmnožené a zvětšené pohárkové buňky označeny šipkami. Barveno H×E, zvětšení 400×.

Obrázek 2: Odběr krve z ocasních cév u amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*).

Obrázek 3: Vzorčky krevní plazmy uložené na ledu.

10. Přílohy



Obrázek 2: Odběr krve z ocasních cév u amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*).



Obrázek 3: Vzorky krevní plazmy uložené na ledu.

11. Abstrakt

Možnosti využití kyseliny peroctové v terapii amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*)

Od doby, kdy bylo zakázáno používání malachitové pro ryby určené k lidskému konzumu v Evropě a Severní Americe, se celosvětově přistoupilo k testování alternativních léčiv k terapii ryb. Kyselina peroctová se jeví být jednou z nejpoužitelnějších alternativních látek.

Cílem této studie bylo zhodnotit vliv dvou odlišných terapeutických koncentrací kyseliny peroctové na vybrané hematologické a biochemické ukazatele u amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*). Ryby byly náhodně rozděleny do akvárií a byly vystaveny koncentracím 0 mg·l⁻¹ KPO (kontrolní skupina), 1,0 mg·l⁻¹ KPO (skupina P1) a 3,0 mg·l⁻¹ KPO (skupina P2). Téměř totální úhyn ryb byl pozorován v koncentraci 3,0 mg·l⁻¹ KPO v průběhu terapie ve srovnání se skupinou P1 a neléčenou kontrolní skupinou, kde nebyl pozorován žádný úhyn. Po ukončení pokusné expozice ryb kyselině peroctové, bylo přistoupeno k odběru vzorků krve. Tyto vzorky krve byly vyšetřeny za účelem stanovení hematologických a biochemických ukazatelů. Na podkladě těchto vyšetření nebyly zjištěny statisticky významné ($p < 0,05$) změny v hematologickém profilu krve ryb vystavených koncentraci 1,0 mg·l⁻¹ KPO. Pohárkové buňky byly zmnožené a zvětšené, což způsobila expozice kyselině peroctové. V biochemickém profilu krve ryb byly zjištěny statisticky významné změny ($p < 0,01$) ve třech ukazatelích po expozici ryb koncentraci 1,0 mg·l⁻¹ KPO. Změněné byly následující ukazatele: aspartátaminotransferáza, kreatinkináza a laktátdehydrogenáza. Statisticky nevýznamná změna ($p < 0,05$) v hematologických ukazatelích poukazuje na minimální negativní vliv doporučené terapeutické koncentrace (1,0 mg·l⁻¹ KPO) na zdravotní stav *C. idella*.

Klíčová slova: kyselina peroctová, hematologie, biochemie krve, histologie, nemoci ryb

12. Abstract

Possibilities of the use of peracetic acid in therapy of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

Since the use of malachite green was banned for food fish in European and North American countries, alternative substances has been tested worldwide for treatment of fish diseases. Peracetic acid seems to be one of the most useable alternative substance.

The aim of the present study was to assess an influence of two different therapeutical concentrations of peracetic acid on selected haematological and biochemical parameters in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Fish were radomly distributed to aquaria and exposed to concentrations of 0 mg·l⁻¹ PAA (control group), 1.0 mg·l⁻¹ PAA (P1 group), 3.0 mg·l⁻¹ PAA (P2 group). Almost total mortality of fish was observed in the concentration 3.0 mg·l⁻¹ PAA during the treatment comparing with the P1 group and untreated control where no mortality was observed. After the end of the experimental exposure of fish to peracetic acid, the sampling of blood has been realised. The samples of the blood were examined in order to determine haematological and biochemical parameters. Consequently, there were no significant differences (p<0.05) in a haematological profile of fish exposed to concentration of 1.0 mg·l⁻¹ PAA. Goblet cells count and size have risen, that caused exposure of fish to peracetic acid. In the biochemical profile of fish, significant changes (p<0.01) in three parameters were found after exposure of fish to peracetic acid in concentration 1.0 mg·l⁻¹. Changed parameters were: aspartate aminotransferase, creatine kinase and lactate dehydrogenase. The changes were moderate and it can be supposed that these changes are reversible. No significant change (p<0.05) in haematological parameters points out to the minimum negative influence of recommended therapeutical concntration (1.0 mg·l⁻¹ PAA) to the health of *C. idella*.

Keywords: peracetic acid, haematology, blood biochemistry, histology, fish diseases