



EVROPSKÁ UNIE  
Evropský námořní a rybářský fond  
Operační program Rybářství



Fakulta rybnářství  
a ochrany vod  
Faculty of Fisheries  
and Protection  
of Waters

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice  
Czech Republic

# TECHNICKÁ ZPRÁVA PROJEKTU

Název projektu:

**Nové terapeutické postupy eliminující  
motolice oční v chovu kaprovitých ryb  
- zejména u amura bílého.**

Registrační číslo projektu: CZ.10.2.101/2.1/0.0/17\_011/0000454



EVROPSKÁ UNIE  
Evropský námořní a rybářský fond  
Operační program Rybářství



Fakulta rybářství  
a ochrany vod  
Faculty of Fisheries  
and Protection  
of Waters

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice  
Czech Republic

### **Příjemce (veřejnoprávní subjekt):**

*Obchodní firma nebo název:* Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod

*Adresa:* Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany

*IČ:* 60076658

*Registrační číslo projektu:* CZ.10.2.101/2.1/0.0/17\_011/0000454

*Název projektu:* Nové terapeutické postupy eliminující motolice oční v chovu kaprovitých ryb - zejména u amura bílého.

*Jméno a příjmení osoby, která je oprávněna vědecký subjekt zastupovat:*

doc. Tomáš Machula, Dr., Ph.D., Th.D.

### **Provozní subjekt (podnik akvakultury spolupracující na projektu s příjemcem):**

*Název nebo obchodní jméno:* Rybářství Hluboká cz. s.r.o.

*Adresa:* Tyršova 681, 373 41 Hluboká nad Vltavou

*IČ:* 28087992

*Jméno a příjmení osoby, která je oprávněna příjemce dotace zastupovat:*

Ing. Vladimír Kaiser

### **Zpracovatel technické zprávy projektu:**

*Název nebo obchodní jméno:* Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod

*Adresa:* Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany

*IČ:* 60076658

*Místo a datum zpracování technické zprávy:* Vodňany, 20. 12.2019

*Jména a příjmení osob, které zpracovaly technickou zprávu:*

MVDr. Eliška Zusková, Ph.D.

*Jméno a příjmení osoby, která je oprávněna zpracovatele technické zprávy zastupovat:*

doc. Tomáš Machula, Dr., Ph.D., Th.D.



EVROPSKÁ UNIE  
Evropský námořní a rybářský fond  
Operační program Rybářství



Fakulta rybnářství  
a ochrany vod  
Faculty of Fisheries  
and Protection  
of Waters

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice  
Czech Republic

**Souhlas s publikací technické zprávy:**

Souhlasím se zveřejněním této technické zprávy projektu v rámci opatření 2.1. Inovace z Operačního programu Rybářství 2014 – 2020 na internetových stránkách Ministerstva zemědělství a s využíváním výsledků této technické zprávy všemi subjekty z odvětví rybnářství.

Podpis osoby oprávněné zastupovat:

1. Příjemce dotace (veřejnoprávní subjekt):

doc. Ing. Tomáš Machula, Dr., Ph.D., Th.D.

2. Partnera projektu (podnik akvakultury):

Ing. Vladimír Kaiser

3. Zpracovatele technické zprávy:

doc. Ing. Tomáš Machula, Dr., Ph.D., Th.D.



## Obsah

1. Cíl .....	4
1.1. Co je cílem projektu .....	4
1.2. V čem spočívá inovativnost testované technologie.....	4
1.3. Proč je nutná inovace, která je předmětem testování .....	4
2. Úvod .....	5
3. Provedené pokusy a testy .....	6
3.1. Testy akutní toxicity na akvarijních rybách ( <i>Poecilia reticulata</i> ), dafniích ( <i>Daphnia magna</i> ) a zelené řase ( <i>Desmodesmus subspicatus</i> ).....	6
3.1.1. Metodika .....	6
3.1.2. Výsledky.....	8
3.1.3. Závěr .....	11
3.2. Testy účinnosti a sledování vlivu fenbendazolu na hematologické a biochemické ukazatele .....	13
3.2.1. Metodika .....	13
3.2.2. Výsledky.....	15
3.2.2.1. Hematologické vyšetření .....	15
3.2.2.2. Biochemické vyšetření .....	16
3.2.2.3. Parazitologické vyšetření .....	16
3.2.3. Závěr .....	17
3.3. Testování účinnosti fenbendazolu (FB) a praziquantelu (PQ) aplikovaných v krmivu na metacerkárie motolice oční ( <i>Diplostomum spathaceum</i> ) u kapra obecného .....	18
3.3.1. Metodika .....	18
3.3.1.1. Ryby.....	18
3.3.1.2. Zisk infekčních cercárií motolice oční ( <i>Diplostomum spathaceum</i> ) .....	18
3.3.1.3. Nakažení ryb.....	18
3.3.1.4. Příprava medikovaných krmných směsí.....	19
3.3.1.5. Design testu .....	19
3.3.2. Výsledky.....	20
3.3.2.1. Parazitologické vyšetření .....	20
3.3.2.2. Stanovení reziduí aplikovaných léčiv .....	21
3.3.2.3. Histologické vyšetření .....	23
3.2.3. Závěr .....	23
3.4. Aplikace fenbendazolu (FB) a praziquantelu (PQ) namíchaných v krmivu pro amura bílého ( <i>Ctenopharyngodon idella</i> ) – Ab0 a Ab1 v provozních podmínkách.....	23
3.3.1. Metodika .....	23
3.3.2. Výsledky.....	24
4. Závěr .....	25



## 1. Cíl

### **1.1. Co je cílem projektu**

Předkládaný projekt si klade za cíl ověřit účinnost a zpracovat aplikační protokol léčivého přípravku proti motolici oční. Výstupem projektu bude zhodnocení využitelnosti a návrh produktu (medikovaného krmiva) začlenitelného do chovného procesu, kde se potýkají s obdobnými parazitárními infekcemi.

### **1.2. V čem spočívá inovativnost testované technologie**

Inovativnost projektu spočívá ve stanovení účinných aplikačních předloh testovaných látek (fenbendazolu, praziquantelu) vedoucích ke snížení ztrát v odchovu, které pak lze dále využívat ve všech provozech, kde se prokazatelné ztráty ryb způsobené motolicí oční vyskytují. Řešení projektu navazuje na ukončený pilotní projekt CZ.1.25/3.4.00/09.00530 Strategie léčby parazitárních onemocnění kaprovitých ryb způsobených plochými červy, během kterého se účinnost testovaného praziquantelu prokázala a vyvstal naléhavý problém přesnějšího řešení infekce motolice oční u ryb.

### **1.3. Proč je nutná inovace, která je předmětem testování**

Doposud nebyla předložena dostatečně účinná a bezpečná strategie boje s infekcí motolice oční u ryb. Ačkoliv využívaný praziquantel funguje, je vzhledem k jeho využití v humánní medicíně a potenciálnímu vzniku rezistence nutné hledat další možné terapeutické alternativy. S přihlédnutím k spektru účinnosti se rovněž fenbendazol jeví perspektivně v boji s touto infekcí. Předpokládáme, že v důsledku zavedení účinné profylaxe a léčby dojde v napadených chovech k prokazatelnému zvýšení produkce násadových ryb a jejich následné udržitelnosti až do tržních velikostí.



## 2. Úvod

Péče o dobrý zdravotní stav ryb je jedním z limitujících faktorů kvalitního odchovu. Obecně je snadnější dodržovat preventivní opatření zamezující vniknutí infekčního činitele do prostředí než následně probíhající infekci léčit. S přihlédnutím k složitým vývojovým cyklům některých parazitárních infekcí se však mnohdy samotné léčbě nelze vyhnout. Příkladem je produkce ryb v rybnících vycházející z využití nabídky přirozené potravy, tj. zástupců planktonních a bentických společenstev. Tyto organismy bývají mezihostiteli infekčních parazitárních onemocnění, a tudíž i nepřetržitým zdrojem infekce. Jejich úplné odstranění je v podmínkách rybníkářství nereálné, a tudíž jedinou možností adekvátní obrany je léčba. Mezi takovými parazitárními onemocněními ryb, způsobující vysoké ztráty a vyžadující strategickou léčbu, patří trematodózy (infekce způsobené motolicemi). Vývojová stadia – metacerkárie motolice oční parazitují v oční čočce ryb, kde při masivní invazi mohou rybám způsobit závažné poškození zraku vedoucí až k oslepnutí. Ryba je zde v roli druhého mezihostitele. Prvním mezihostitelem je plovatka bahenní, konečným hostitelem je pak rybožravý pták. Ryby s narušeným zrakovým vnímáním se pohybují u prosvětlenější hladiny (chování typické zejména pro amury), kde se stávají snadnou kořistí pro predátory, kteří v případě rybožravých ptáků bývají i konečnými (definitivními) hostiteli. Výskyt tohoto onemocnění u nižších věkových kategorií kaprovitých ryb, zejména pak amura bílého, bývá limitní pro úspěšný odchov násady.

V současné době nejsou k dispozici žádná registrovaná endoparazitární léčiva pro hospodářské druhy ryb. Pro rybářskou praxi je zvláště citelná absence registrovaného léčiva proti motolicím ryb. Léčiva používaná v akvakultuře jsou podrobována přísnému posuzování, zejména s ohledem na jejich bezpečnost použití a účinnost. Avšak vzhledem k legislativnímu systému Evropské Unie jsou náklady spojené s registrací nových léčiv příliš vysoké a pro farmaceutické firmy je registrace a výroba léčivých přípravků pro tak úzce zaměřenou odbytovou skupinu, jako jsou ryby, neekonomická (Treves-Brown, 1999). Cílem předkládaného projektu je vylepšit současnou nepříznivou situaci v léčbě trematodóz ryb, a to využitím fenbendazolu. Tento přípravek lze v ČR použít veterinárním lékařem v odůvodněných případech. Má stanoven minimální residuální limit pro potravinová zvířata, a tudíž ho lze lépe využít než doposud používaný praziquantel, který v kaskádě předepisování léčiv stojí níže a předepisovat pro léčbu hospodářských druhů ryb se může užívat jen s výjimkou ÚSKVBL.



Mechanismus účinku tohoto léku spočívá v zásahu do energetického metabolismu parazita, kde působí neurotoxicky. Účinnost fenbendazolu byla prokázána u tasemnic (Treves-Brown, 2000), nematod i monogeneí ryb (Samaee, 2015; Forwood a kol., 2013). Předkládaný projekt si klade za cíl odzkoušet účinnost fenbendazolu na motolici oční u amura a následně chovným podmínkám přizpůsobit dávkování a aplikační schéma.

### **Použitá literatura:**

- Samaee, S.M., 2015: Experimental Assessment of the Efficacy of Five Veterinary Broad-Spectrum Anthelmintics to Control the Intestinal Capillariasis in Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, 12 (3):255-267.
- Forwood, J.M., Harris, J.O., Deveney, M.R., 2013: Efficacy of bath and orally administered praziquantel and fenbendazole against *Lepidotrema bidyana* Murray, a monogenean parasite of silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). *Journal of Fish Diseases*, 36 (11):939-947.
- Treves-Brown, K.M., 1999: Availability of medicines for fishes drugs. *Fish Veterinary Journal*, 4, 40-55.
- Treves-Brown, K.M., 2000: *Applied Fish Pharmacology*. Kluwer Academic Publishers, London, 309 p.

## **3. Provedené pokusy a testy**

V průběhu řešení tohoto projektu č. CZ.10.2.101/2.1/0.0/17\_011/0000454 „**Nové terapeutické postupy eliminující motolice oční v chovu kaprovitých ryb - zejména u amura bílého**“ byla realizována řada pokusů zaměřená na odzkoušení a zavedení nejúčinnějšího terapeutika do chovného procesu kapra a amura.

### **3.1. Testy akutní toxicity na akvarijních rybách (*Poecilia reticulata*), dafniích (*Daphnia magna*) a zelené řase (*Desmodesmus subspicatus*)**

#### **3.1.1. Metodika**

Testy akutní toxicity byly prováděny podle příslušných norem ČSN EN ISO a OECD (7346-2 Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby /*Brachydanio rerio* Hamilton Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae*)/ Část 2: Obnovovací metoda, OECD 203 Fish, Acute Toxicity Test; ČSN EN ISO ČSN EN ISO 6341 Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*), OECD 202 Part I – the 24h EC 50 Acute



immobilisation test; ČSN EN ISO 8692 Jakost vod - Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas a OECD 201 Alga Growth Inhibition Test).

Jako zředovací voda byla v případě testů na *Poecilia reticulata* a *Daphnia magna* použita voda připravená podle výše uvedených norem a v případě testu na *Desmodesmus subspicatus* to byl standardní živný roztok rovněž připravený dle příslušné normy.

Vzhledem k tomu, že testovaná látka Fenbendazol je velmi omezeně rozpustná ve vodě, byly provedeny dvě série testů, a to:

- 1) Bez použití rozpouštědla s tím, že lázně ze zředovací vody a odpovídající dávky Fenbendazolu byly po dobu 24 hodin před zahájením testu třepány na vertikální třepačce a poté použity do testu.
- 2) K rozpuštění Fenbendazolu bylo použito rozpouštědlo dimethylsulfoxid (DMSO) tak, aby při přípravě lázně o nejvyšší koncentraci nepřesáhla koncentrace DMSO hodnotu  $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$  a vzniklý roztok byl dávkován do připraveného příslušného objemu zředovací vody.

V případě použití prvního postupu se jednalo spíše o vodný výluh s tím, že nerozpuštěné částičky testovaného přípravku nebyly z lázně separovány ani odstředěním, ani filtrací. Celý objem připravené lázně byl protřepán a převeden do jednotlivých lázní pro testování.

Při použití druhého postupu byla testovaná látka rozpuštěna v DMSO a dávkována do zředovací vody ve formě roztoku. Po aplikaci rozpuštěné testované látky do zředovací vody však došlo i v nízkých koncentracích k vyvločkování fenbendazolu. Větší objem rozpouštědla však nebylo možno použít. (i v tomto případě koncentrace DMSO překračovala koncentraci doporučenou normami ( $0,1 \text{ ml.l}^{-1}$ ). Proto byly testy prováděny i za těchto podmínek s tím, že v každém testu byly nasazovány dvě kontroly (prostá zředovací voda a zředovací voda s DMSO v koncentraci  $0,2 \text{ ml.l}^{-1}$ ). Pro všechny testy toxicity byly připraveny lázně o nižších koncentracích fenbendazolu, neboť jeho větší množství by nebylo možno rozpustit v DMSO aniž by bylo nutno použít větší objem DMSO (a došlo by pak k navýšení koncentrace v testované lázni).





### 3.1.2. Výsledky

#### A) Výsledky testů, při kterých nebylo použito rozpouštědlo

- Test na *Poecilia reticulata* (do každé koncentrace nasazeno po 5 ks ryb)

Koncentrace (mg.l <sup>-1</sup> )	Mortalita			
	Délka expozice			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin
100	0	0	0	0
500	0	0	0	0
1000	0	0	0	0
kontrola	0	0	0	0

Nerozpouštěné částičky fenbendazolu sedimentovaly na dno nádrží. V koncentracích 500 a 1000 mg.l<sup>-1</sup> byl u ryb pozorován neklid a ve srovnání s kontrolou zrychlené pojiždění po lázni. Avšak, jak vyplývá z předložených výsledků, testovaný přípravek nevykazoval akutně letální účinky na ryby ani v nejvyšší testované koncentraci (**96hLC50 ≥ 1000 mg.l<sup>-1</sup>**)

- Test na *Daphnia magna* (2 paralelní stanovení, kde bylo do každé koncentrace nasazeno po 20 ks perlooček)

Koncentrace (mg.l <sup>-1</sup> )	Inhibice pohyblivosti (délka expozice 24 hodin)	
	(ks)	(%)
10	3 + 4	35
25	2 + 3	25
50	3 + 3	30
100	4 + 9	65
500	1 + 3	20
1000	1 + 4	25
kontrola	0 + 0	0



Z výsledků testu je patrné, že míra negativních účinků testovaného přípravku nesouvisí s výší jeho koncentrace. Podobně, jako v testu na rybách, i zde byly patrné částčky nerozpuštěného přípravku, takže lze předpokládat, že testovaný přípravek poškozoval testovací organismy spíše mechanicky než přímým toxickým účinkem. Přes zjištěné úhyny perlooček hodnota **24hEC50 > 1000 mg.l<sup>-1</sup>**.

- Test na zelené řase *Desmodesmus subspicatus* (test proveden ve dvou paralelních stanoveních, počáteční hustota řasové suspenze byla 10 400 buněk v 1 ml. Výsledky uvedené v tabulce jsou průměrem ze dvou stanovení). Test byl vyhodnocen na základě růstové rychlosti řas stanovené v kontrole a v jednotlivých koncentracích testované látky.

Koncentrace (mg.l <sup>-1</sup> )	Koncentrace řasové suspenze (počet buněk v 1 ml)			Inhibice růstové rychlosti ve srovnání s kontrolou (%)
	Délka trvání testu (h)			
	24	48	72	
10	35000	198750	538750	3,7
50	38750	201250	451250	8,0
100	40000	158750	383750	12,0
500	27500	123750	140000	36,6
1000	25000	90000	133750	37,7
kontrola	41250	187500	626250	-

Z výsledků testu na *Desmodesmus subspicatus* je zřejmé, že ani v nejvyšší testované koncentraci (1000 mg.l<sup>-1</sup>) nebylo dosaženo 50% inhibice růstové rychlosti (**72hIC50 > 1000 mg.l<sup>-1</sup>**). Navíc, ani zde nelze vyloučit inhibici růstu vyvolanou zastíněním buněk nerozpuštěnými částčkami testovaného přípravku.

#### **B) Výsledky testů, kde byl testovaný přípravek aplikován do lázní ve formě roztoku v DMSO**

- Test na *Poecilia reticulata* (do každé koncentrace nasazeno po 5 ks ryb)



Koncentrace (mg.l <sup>-1</sup> )	Mortalita			
	Délka expozice			
	24 hodin	48 hodin	72 hodin	96 hodin
25	0	0	0	0
50	0	0	0	0
100	0	0	0	0
kontrola	0	0	0	0
kontrola + 0,2 ml.l <sup>-1</sup> DMSO				

Po nadávkování přípravku rozpuštěného v DMSO do vody se vytvořila bělavá suspenze a na dně nádrží se usazovaly vložky opětně vysráženého fenbendazolu. Nicméně, ani v tomto testu nedošlo k úhynu ryb ani v nejvyšší testované koncentraci (**96hLC50  $\geq$  100 mg.l<sup>-1</sup>**).

- Test na *Daphnia magna* (2 paralelní stanovení, kde bylo do každé koncentrace nasazeno po 20 ks perlooček)

Koncentrace (mg.l <sup>-1</sup> )	Inhibice pohyblivosti (délka expozice 24 hodin)	
	(ks)	(%)
25	8 + 10	90
50	9 + 7	80
100	8 + 8	80
kontrola	0 + 0	0
kontrola + 0,2 ml.l <sup>-1</sup> DMSO	1 + 3	20

Z výsledků je zřejmé, že již samotná přítomnost DMSO v koncentraci 0,2 ml.l<sup>-1</sup> dafnie negativně ovlivnila. Úhyny v připravených lázních jsou sice vysoké, ale vzhledem ke stavbě těla perlooček a jejich citlivosti na poškození („zalepení“) dýchacího aparátu předpokládáme, že vysoká mortalita perlooček souvisí spíše s mechanickým poškozením než s přímým toxickým působením přípravku.



- Test na zelené řase *Desmodesmus subspicatus* (test proveden ve dvou paralelních stanoveních, počáteční hustota řasové suspenze byla 10 304 buněk v 1 ml. Výsledky uvedené v tabulce jsou průměrem ze dvou stanovení). Test byl vyhodnocen na základě růstové rychlosti řas stanovené v kontrole a v jednotlivých koncentracích testované látky.

Koncentrace (mg.l <sup>-1</sup> )	Koncentrace řasové suspenze (počet buněk v 1 ml)			Inhibice růstové rychlosti ve srovnání s kontrolou (%) *)
	Délka trvání testu (h)			
	24	48	72	
25	20000	75000	425000	8,2
50	30000	225000	857500	-9,1 (stimulace)
100	5000	37500	325000	14,8
kontrola	55000	325000	805000	
kontrola + 0,2 ml.l <sup>-1</sup> DMSO	37500	257500	592500	

\*) vztaženo k růstové rychlosti zjištěné v kontrole s 0,2 ml.l<sup>-1</sup> DMSO

Z výsledků je zřejmé, že ani v nejvyšší koncentraci testovaného přípravku nebylo dosaženo 50% inhibice růstové rychlosti (**72hIC50 > 100 mg.l<sup>-1</sup>**).

### 3.1.3. Závěr

- A) Na základě výsledků testů akutní toxicity provedených s přípravkem fenbendazol, kde byly jednotlivé lázně pro testování připraveny třepáním vzorku v ředící vodě po dobu 24 hodin na vertikální třepače, byly učiněny následující závěry:**

U testovacích organismů *Poecilia reticulata/Desmodesmus subspicatus* nebyly prokázány akutní letální účinky/inhibice růstu ani v nejvyšších koncentracích (1000 mg.l<sup>-1</sup>) testovaného přípravku (**96hLC50/72hIC50 > 1000 mg.l<sup>-1</sup>**).

V případě testu na perloočkách *Daphnia magna* byly zaznamenány úhyny testovacích organismů v celé škále koncentrací testovaného přípravku, které však nesouvisely s výší koncentrace. Nejvyšší mortalita byla zaznamenána v koncentraci 100 mg.l<sup>-1</sup> (65 %), v ostatních koncentracích mortalita nepřesáhla 35 %, v nejvyšší testované koncentraci (1000 mg.l<sup>-1</sup>) byla mortalita 25 %. Vzhledem k těmto skutečnostem předpokládáme, že mortalita byla vyvolána



spíše mechanickým poškozením testovacích organismů vlivem nerozpuštěného přípravku než jeho přímým toxickým působením.

**B) Na základě výsledků testů akutní toxicity provedených s přípravkem fenbendazol, který byl rozpuštěn v DMSO a jednotlivé lázně pro testování byly připraveny dávkováním takto připravené suspenze, byly získány následující výsledky:**

U testovacích organismů *Poecilia reticulata/Desmodesmus subspicatus* nebyly prokázány akutní letální účinky/inhibice růstu ani v nejvyšších koncentracích ( $100 \text{ mg.l}^{-1}$ ) testovaného přípravku ( $96\text{hLC}_{50}/72\text{hIC}_{50} > 100 \text{ mg.l}^{-1}$ ).

V případě testu na perloočkách *Daphnia magna* byly zaznamenány úhyny testovacích organismů (80 – 90 %) v celé škále koncentrací testovaného přípravku, přičemž nejvyšší mortalita (90 %) byla zaznamenána v nejnižší testované koncentraci ( $25 \text{ mg.l}^{-1}$ ) a v koncentraci  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  byla mortalita 80 %. To znamená, že ani v tomto případě mortalita nesouvisela s vyšší koncentrace fenbendazolu a lze předpokládat, že byla vyvolána mechanickým poškozením perlooček. Přes tuto skutečnost je nutno s rizikem negativního vlivu na zooplankton přítomný ve vodním prostředí počítat.

(Při použití rozpouštědla DMSO nebylo možno připravit vyšší koncentrace fenbendazolu než  $100 \text{ mg.l}^{-1}$ , neboť množství použitého DMSO nebylo možno zvyšovat díky limitaci výsledné koncentrace DMSO. Avšak u všech takto připravených koncentrací přípravku došlo po nadávkování suspenze do ředicí vody k vyvločkování a vzniklé vločky se usazovaly na dně nádrží.

**Předložené výsledky dokumentují, že přípravek fenbendazol nevykazuje akutně toxické účinky pro testované vodní organismy (ryby, zelené řasy), a to ani v koncentracích, které jsou vyšší, než je reálný předpoklad zbytkových koncentrací souvisejících s jeho aplikací ve formě koupele ( $25 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Zvýšené riziko však tato koncentrace představuje pro vodní bezobratlé (dafnie). Vzhledem k tomu, že nejnižší testovaná koncentrace fenbendazolu ( $25 \text{ mg.l}^{-1}$ ) vyvolala u dafnií 90% úhyn, nutno konstatovat, že použití fenbendazolu formou koupele ve výše uvedené koncentraci by představovalo vážné riziko pro přirozenou potravní základnu ryb.**



### Použité zkratky:

DMSO	dimethylsulfoxid
96hLC50	koncentrace, která vyvolá během expozice 96 hod. 50% úhyn ryb <i>Poecilia reticulata</i>
24hEC50	koncentrace, která vyvolá během expozice 24 hodin úhyn nebo inhibici pohyblivosti perlooček <i>Daphnia magna</i>
72hIC50	koncentrace, která vyvolá během 72 hodinové expozice 50% inhibici růstové rychlosti zelené řasy <i>Desmodesmus subspicatus</i>

## **3.2. Testy účinnosti a sledování vlivu fenbendazolu na hematologické a biochemické ukazatele**

### **3.2.1. Metodika**

40 amurů bílých (*Ctenopharyngodon idella*) o průměrné hmotnosti 20,1 g bylo aklimatizováno po dobu jednoho týdne v akvarijní místnosti VURH FROV Vodňany, kde jim bylo 2 x denně předkládáno krmivo KP1. Jeden den před začátkem testu bylo krmení zastaveno a ryby byly rozděleny do 8 akvárií o objemu lázně 20 l po 5ti rybách. Léčebné lázně byly připraveny takto (Foto 1):

- 2x kontrolní skupina (K): odstátá kouhoutková voda bez přídavku léčiv
- 2x pokusná skupina (PQ 1): Praziquantel v koncentraci 2 mg/l
- 2x pokusná skupina (PQ 2): Praziquantel v koncentraci 10 mg/l
- 2x pokusná skupina (FB): Fenbendazol v koncentraci 25 mg/l

Akvária byla dle skupin označena K, PQ1, PQ2 a FB, a to tak, že ryby ze 2 akvárií (10 ryb) tvořily vždy jednu skupinu (Foto 2).

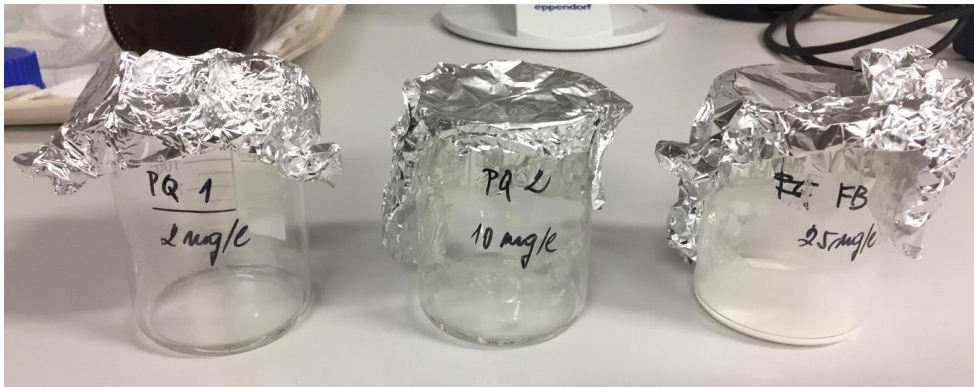


Foto 1: Navážky praziquantelu a fenbendazolu k přípravě koupelí



Foto 2: Pokusná skupina 20 l akvárií v laboratorní místnosti připravená na test. Okometricky patrné výrazné zakalení FB koupele (nejvíce vpravo) dané její špatnou rozpustností.

Ryby byly po dobu 24 hodin exponovány daným látkám a následně byla rybám z ocasní cévy (*vena caudalis*) odebrána krev. Rovněž bylo provedeno parazitologické vyšetření očí na přítomnost metacerkárií motolice oční. Při zpracování krve bylo metodicky postupováno dle Svobodové a kol. (2012).

Z odebrané krve bylo následně provedeno:

- Hematologické vyšetření, kde 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).
- Biochemické vyšetření krevní plazmy získané odstředěním krve v odstředivce Microcentrifuge MPW-55 při 14 000 otáčkách po dobu 3 minut. Separovaná plazma byla do doby biochemické analýzy uložena v mrazícím boxu při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$ . 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 (Multi – laier film slides, Kodak), laserovým čtením bar kódů. Stanoveny byly následující biochemické parametry: glukóza (GLU), celkové bílkoviny (TP), albuminy (ALB), globuliny (Glob), triacylglyceroly (TAG), alaninaminotransferáza (ALT), aspartátaminotransferáza (AST), laktátdehydrogenáza (LDH) a amoniak (NH<sub>3</sub>).

Statistické vyhodnocení výsledků hematologického a biochemického vyšetření kontrolní a pokusných skupin bylo provedeno analýzou variance počítačového programu STATISTICA verze 12.0 pro Windows (StatSoft) a byly zde vyhodnoceny statisticky významné rozdíly na hranici významnosti  $p < 0,05$  a  $p < 0,01$ .

### 3.2.2. Výsledky

#### 3.2.2.1. Hematologické vyšetření

Po koupelích došlo ke statisticky významným změnám dvou sledovaných hematologických parametrů. U skupiny FB byly naměřeny statisticky významně nižší ( $p < 0,05$ ) hodnoty RBC (počet červených krvinek) v porovnání s kontrolní skupinou K. U skupiny PQ2 došlo k statisticky významnému ( $p < 0,05$ ) poklesu MCHC (střední barevná koncentrace) v porovnání s kontrolní a FB skupinou (viz Graf 1). Zbytek naměřených hematologických parametrů u amurů bílých (*Ctenopharyngodon idella*) se nelišil od kontrolní skupiny K (viz Tabulka 1).

Tabulka 1: Výsledková tabulka s rozsahem naměřených hodnot hematologických ukazatelů amura bílého po provedených koupelích v PQ a FB. Ukazatele jsou vyjádřeny hodnotou průměru v dané skupině  $\pm$  směrodatná odchylka. Indexy <sup>a,b</sup> charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ( $p < 0,05$ ).

Parametr Skupina	RBC (T.l <sup>-1</sup> )	WBC (G.l <sup>-1</sup> )	PCV (l.l <sup>-1</sup> )	Hb (g.l <sup>-1</sup> )	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (l.l <sup>-1</sup> )
K	2,57±0,51 <sup>a</sup>	11,83±4,02	0,27±0,05	66,91±15,83	107,12±16,15	26,18±4,32	0,25±0,02 <sup>a</sup>
PQ 1	2,49±0,33 <sup>ab</sup>	14,33±5,75	0,25±0,03	66,79±5,49	98,99±9,52	27,06±2,40	0,27±0,02 <sup>ab</sup>
PQ 2	2,28±0,26 <sup>ab</sup>	17,5±7,87	0,22±0,03	64,76±7,16	97,01±7,97	28,43±1,64	0,29±0,02 <sup>b</sup>
FB	1,97±0,52 <sup>b</sup>	15,83±6,49	0,24±0,05	56,52±12,46	122,23±15,63	30,24±3,95	0,24±0,01 <sup>a</sup>





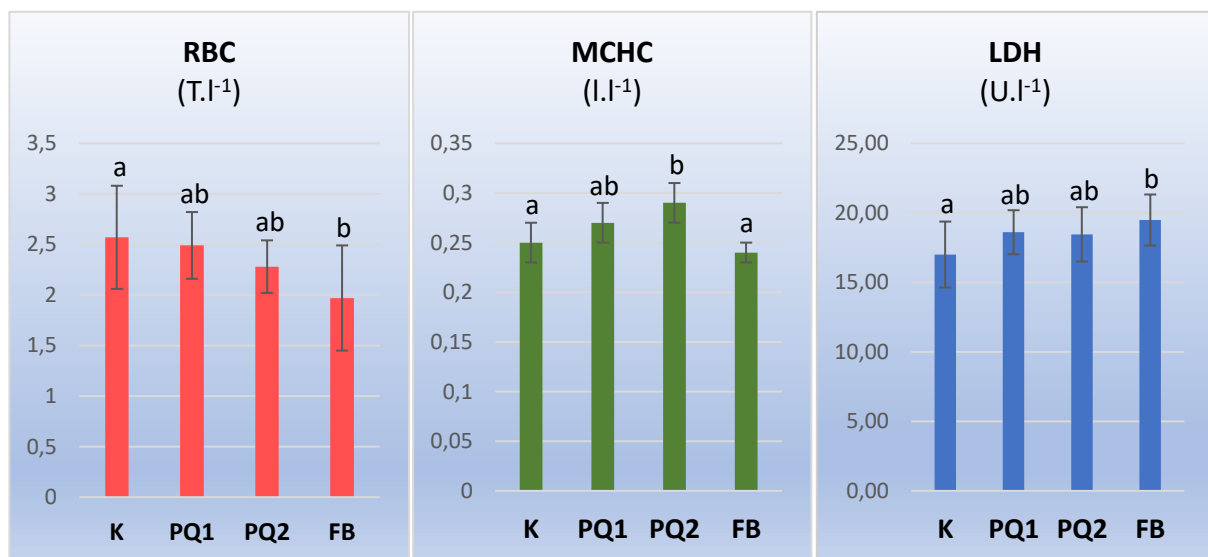
### 3.2.2.2. Biochemické vyšetření

V biochemickém profilu došlo k statisticky významnému zvýšení aktivity ( $p < 0,05$ ) LDH u skupiny FB v porovnání s kontrolní skupinou (viz Graf 1). Hodnoty ostatních parametrů se statisticky významně nelišily. Všechny měřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Výsledková tabulka s rozsahem naměřených hodnot biochemických ukazatelů amura bílého po provedených koupelích v PQ a FB. Ukazatele jsou vyjádřeny hodnotou průměru v dané skupině  $\pm$  směrodatná odchylka. Indexy a,b charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ( $p < 0,05$ ).

Parametr Skupina	Glu (mmol.l <sup>-1</sup> )	TP (g.l <sup>-1</sup> )	ALB (g.l <sup>-1</sup> )	Glob (g.l <sup>-1</sup> )	TAG (mmol.l <sup>-1</sup> )	ALT (U.l <sup>-1</sup> )	AST (U.l <sup>-1</sup> )	LDH (U.l <sup>-1</sup> )	NH3 ( $\mu$ mol.l <sup>-1</sup> )
K	1,94 $\pm$ 0,32	35,33 $\pm$ 1,75	4,50 $\pm$ 1,05	30,83 $\pm$ 2,32	0,94 $\pm$ 0,24	0,23 $\pm$ 0,15	2,03 $\pm$ 1,38	17,0 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>	496 $\pm$ 110
PQ 1	2,20 $\pm$ 0,80	38,83 $\pm$ 5,15	5,33 $\pm$ 0,82	33,50 $\pm$ 5,54	1,04 $\pm$ 0,43	0,31 $\pm$ 0,15	2,24 $\pm$ 0,79	18,6 $\pm$ 1,6 <sup>ab</sup>	439 $\pm$ 83
PQ 2	2,69 $\pm$ 0,32	36,83 $\pm$ 2,71	5,50 $\pm$ 0,55	31,33 $\pm$ 3,08	0,95 $\pm$ 0,20	0,36 $\pm$ 0,15	2,40 $\pm$ 0,81	18,5 $\pm$ 2,0 <sup>ab</sup>	510 $\pm$ 118
FB	2,63 $\pm$ 0,33	35,40 $\pm$ 4,34	5,00 $\pm$ 0,71	30,40 $\pm$ 4,45	1,04 $\pm$ 0,29	0,45 $\pm$ 0,24	2,27 $\pm$ 0,28	19,5 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>	498 $\pm$ 68

Graf 1: Grafické znázornění významných změn hematologických a biochemických parametrů



### 3.2.2.3. Parazitologické vyšetření

Prevalence metacerkárií motolice oční v kontrole dosahovala 50%, zatímco u aplikovaných ryb ze skupin PQ1 a PQ2 byla nalezena nižší prevalence 20% a 10% s patrným procentuálním nárůstem nehybajících se metacerkárií. U FB skupiny byla prevalence infekce i po koupelích shodná s kontrolou, nicméně prokazatelně vzrostl nález nehybajících se metacerkárií, naznačující pozitivní léčebný efekt FB (viz Tabulka 3).



Tabulka 3: Prevalence a intenzita infekce a pohyblivost metacerkárií motolice oční zjištěných parazitárním vyšetřením po provedených koupelích v PQ a FB.

Skupina	Prevalence (%)	Intenzita infekce (min – max)	Pohyb metacerkárií (%)	
			+	-
K	50	1-4	90	10
PQ1	20	1-3	30	70
PQ2	10	7	0	100
FB	50	3-4	50	50

### 3.2.3. Závěr

Z výsledků je patrné, že FB koupel ovlivňuje množství červených krvinek, které je však stále v optimálním rozmezí pro kaprovité ryby. Za minimální hranici se považuje množství 1,1 T.l<sup>-1</sup>. U biochemických ukazatelů lze ze zvýšené aktivity LDH u FB skupiny usuzovat na mírnou alteraci buněk jaterního parenchymu. Vážnější jaterní poškození (jaterní selhání, hepatodystrofie a toxické poškození jater) indikuje až 10-20 ti násobné zvýšení aktivity, z čehož je na podkladě výsledků stále patrná relativní bezpečnost FB dávky.

Vzhledem k nízké prevalenci infekce lze z výsledků parazitologického vyšetření pouze hodnotit trendy, kdy u všech testovaných léčebných koupelí došlo k nárůstu nehybných se (potenciálně mrtvých) metacerkárií v oční čočce. Výsledky naznačují léčebný potenciál všech testovaných koupelí s účinností PQ2>PQ1>FB.



### **3.3. Testování účinnosti fenbendazolu (FB) a praziquantelu (PQ) aplikovaných v krmivu na metacerkárie motolice oční (*Diplostomum spathaceum*) u kapra obecného**

#### **3.3.1. Metodika**

##### **3.3.1.1. Ryby**

Celkem 300 ks plůdku kapra obecného o průměrné hmotnosti 3 g bylo aklimatizováno po dobu jednoho měsíce v akvarijní místnosti VURH FROV Vodňany. Po dobu aklimatizace byly ryby denně krmeny krmivem pro plůdek Premium select a obden jim byla měněna voda.

##### **3.3.1.2. Získání infekčních cercárií motolice oční (*Diplostomum spathaceum*)**

Pro získání cercárií *Diplostomum spathaceum* byly z míst výskytu infekce sbírání mezihostitelští hlemýždi *Lymnaea stagnalis*. Šneci byli bezprostředně po sběru stimulováni světlem k produkci cercárií s následným posouzením infikovanosti a identifikací druhu. Prokazatelně infikovaní jedinci byli přechovávaní v akváriu napuštěném dechlorovanou vodou při teplotě 18°C s denním světelným režimem 14 hodin a krmeni promytým salátem ad libitum. Uvolňování cercárií pro infekční test bylo u šneků stimulováno intenzivním světlem a teplem po dobu 2 hodin v malé nádobě o objemu vody 350 ml. Získaná cercariální suspenze byla promíchána a napipetována v množství 0,5 ml do 10 jamek, ve kterých byla pod binolupou stanovena průměrná koncentrace cercárií v suspenzi.

##### **3.3.1.3. Nakažení ryb**

Ryby byly přemístěny do akvária s objemem vody 30l. K rybám byla přidáno 300ml cercariální suspenze a byly ponechány po dobu 2 hodin při teplotě 18°C bez přímého světla. Promíchání cercárií v akváriu bylo zajištěno kontinuálním provzdušňováním. Po dvou hodinách byly ryby přemístěny zpět do zásobní aklimatizační kádě.



#### **3.3.1.4. Příprava medikovaných krmných směsí**

Medikovaná směs byla připravena rozdrcením komerční kontrolní krmné směsi Premium select a následným přimícháním léčebné látky v požadované koncentraci. Následně vytvořené a vysušené peletky byly postříkány abdukční želatinou chránící peletky před rychlým rozpadem ve vodním prostředí. K přípravě krmiva byl využit práškový praziquantel (Ecological Laboratories Inc., USA) v množství 0,75 g a 1,25 g na kg krmiva a práškový fenbendazol (Jiangsu Baozong & Baoda Pharmachem Co. Ltd.) v množství 1 g na kg krmiva. Kontrolní krmivo bylo připraveno stejným postupem bez přidání léčebných látek.

#### **3.3.1.5. Design testu**

Týden po řízené infekci bylo parazitologicky vyšetřeno 10 ks ryb pro zhodnocení intenzity a prevalence infekce. Ryby byly rozděleny po 35 ks do 8mi akvárií s objemem vody 200l. Jednu skupinu tvořila vždy 2 akvária, tedy 70 ryb. Rybám bylo následně 2x denně po dobu jednoho týdne předkládáno krmivo v množství 2% jejich hmotnosti takto:

Skupina K:	kontrolní krmivo KP1
Skupina FB:	fenbendazolem medikované krmivo – denní dávka 40 mg.kg <sup>-1</sup> ž.m.
Skupina PQ1:	praziquantelem medikované krmivo – denní dávka 30 mg.kg <sup>-1</sup> ž.m.
Skupina PQ2:	praziquantelem medikované krmivo – denní dávka 50 mg.kg <sup>-1</sup> ž.m.

Krmné schéma bylo stanoveno na podkladě testů provedených ve výzkumném subjektu, kde bylo zjištěno, že dávka 40 mg FB.kg<sup>-1</sup>ž.m. je při opakované aplikaci účinná na parazitózy z třídy monogenea.

Parazitologické vyšetření bylo prováděno u skupin K, FB, PQ1 a PQ2 po týdenní aplikaci MK, dále pak 2 dny od ukončení aplikace MK, 8 dní od ukončení aplikace MK a 23 dní od ukončení aplikace MK. Pro parazitologické vyšetření bylo odebráno vždy 20 ks ryb ze skupiny (10 ks z každého akvária), pouze poslední odběrový den (23 dní od ukončení aplikace MK) bylo odebráno 10 ks z každé skupiny (5 ks z každého akvária). Byla vyhodnocena prevalence (%) a intenzita (průměrný počet nalezených parazitů na rybu) infekce *Diplostomum spathaceum*.

Po usmrcení byly všem rybám odebrány vzorky svaloviny a jater určené pro stanovení reziduí aplikovaných léčiv. Určování reziduí bylo provedeno následovně: K přibližně 0,5 g



vzorku (svalu nebo jater) v Eppendorfově zkumavce byl přidán vnitřní standard, extrakční činidlo (acetonitril a isopropanol, 1:1) a homogenizační kulička. Vzorek byl homogenizován (1800/min; 10 min) a centrifugován (9600 × g; 10 min; 4 °C). Supernatant byl filtrován (celulózový filtr; 0,45 µm) a uložen do mrazáku do -20 °C na 24 hod. Poté byl supernatant vyndán, rozmražen a znovu centrifugován. Alikvótní podíl byl odpipetován do vialek. Koncentrace léčiv byla měřena kapalinovou chromatografií s hybridní tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/HRMS).

Dále bylo provedeno histologické vyšetření, kdy na konci pokusu byly všem rybám odebrány vzorky žaber, kůže a jater. Vzorky byly ihned po odběru fixovány v 10% formaldehydu, poté odvodněny a zality do parafínu. Z parafínových bločků byly zhotoveny řezy a obarveny hematoxilínem – eozínem.

### 3.3.2. Výsledky

#### 3.3.2.1. Parazitologické vyšetření

Hodnoty parazitární prevalence a intenzity infekce počítané z prokazatelně živých metacerkárií jsou uvedeny v Tabulce 4. U kontrolních skupin se prevalence pohybovala v rozmezí 60-80% s průměrnou intenzitou infekce 3 metacerkárie/rybu. U všech medikovaných krmiv došlo k poklesu prevalence a intenzity infekce. Nejeefektivněji, i co do přetrvání efektu léčby, se jeví skupina PQ2.

Tabulka 4: Prevalence a intenzita infekce metacerkárií *Diplostomum spathaceum* stanovené u ryb bezprostředně po týdenní aplikaci MK (0), 2, 8, a 23 dní od poslední aplikace medikovaných krmiv.

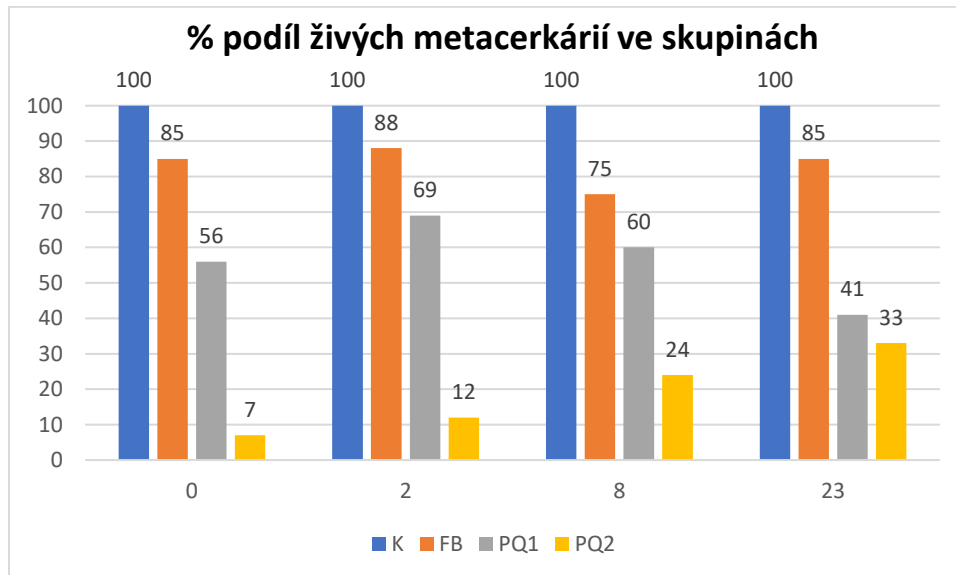
skupiny	Prevalence infekce / Intenzita infekce (%) / (průměrný počet parazitů na rybu)				
	Před testem	0	2	8	23
Kontrola	80 / 2,7	70 / 2,9	80 / 4,1	60 / 2,6	80 / 3,1
FB	-	60 / 2,3	65 / 2,2	50 / 1,8	70 / 2,2
PQ1	-	65 / 2,7	60 / 1,8	50 / 0,9	80 / 1,7
PQ2	-	15 / 2,2	15 / 0,2	50 / 0,5	50 / 0,9

Z časového hlediska je u skupiny PQ2 (nejeefektivnější léčba) patrný trend postléčebného nárůstu životaschopných metacerkárií, které bezprostředně po léčbě nevykazují žádný pohyb



naznačující jejich vitalitu. U skupin FB a PQ1 se byl % podíl živých metacerkárií v průběhu času stabilní (Graf 2).

Graf 2: Procentuální podíl živých metacerkárií v jednotlivých skupinách



### 3.3.2.2. Stanovení reziduí aplikovaných léčiv

Rezidua fenbendazolu byla nalezena v játrech a svalovině ryb ještě 2 dny po poslední aplikaci MK, nicméně koncentrace ve svalovině se pohybovala v řádech desetin ng/g, tedy v těsné blízkosti detekčního minima, a to ještě pouze u 2 kusů ryb z deseti. Osmý den po ukončení aplikace nebyly v játrech ani svalovině rezidua fenbendazolu detekována (tabulka 5). Rezidua praziquantelu přetrvávala v tkáních delší dobu. Na rozdíl od svaloviny byla u obou testovaných PQ skupin MK v játrech detekována rezidua praziquantelu i 8. den po ukončení aplikace (Tabulka 5).

Z hlediska konzumu ošetřených ryb jsou obě látky bezpečné pouze při dodržení doporučené ochranné lhůty 500 stupňodnů od poslední aplikace (počet stupňodnů se zjišťuje násobením průměrné denní teploty vody počtem dnů).



Tabulka 5: Rezidua fenbendazolu (ng/g) a praziquantelu (ng/g) v játrech a svalovině odebraných ryb ze skupin K, FB, P1 a P2. Odběry byly provedeny bezprostředně po týdenní aplikaci MK (0), 2 a 8 dní od poslední aplikace medikovaných krmiv.

<b>tkáň</b>	<b>čas odběru (dny)</b>	<b>skupina</b>	<b>koncentrace léčiv (ng/g)</b>	<b>četnost</b>	<b>LOQ (ng/g)</b>
játra	0	Kontrola	0.35 ± 0.38	2/10	0.11 - 1.20
		FB	66.4 ± 20.8	10/10	42 - 87
		PQ 1	171.3 ± 125.9	10/10	56 - 320
		PQ 2	180.7 ± 80.5	10/10	73 - 290
	2	Kontrola	0.13 ± 0.01	0/10	0.21 - 0.26
		FB	0.82 ± 0.60	10/10	0.22 - 1.50
		PQ 1	0.91 ± 0.40	10/10	0.28 - 1.40
		PQ 2	2.37 ± 1.71	10/10	0.72 - 5.20
	8	Kontrola	0.12 ± 0.01	0/10	0.21 - 0.26
		FB	0.21 ± 0.13	0/10	0.12 - 0.32
		PQ 1	0.32 ± 0.10	4/10	0.22 - 0.44
		PQ 2	0.34 ± 0.10	10/10	0.21 - 0.45
sval	0	Kontrola	0.18 ± 0.09	0/10	0.12 - 0.34
		FB	66.5 ± 20.7	10/10	32 - 98
		PQ 1	135.5 ± 149.7	10/10	46 - 550
		PQ 2	87.9 ± 22.2	10/10	60 - 130
	2	Kontrola	0.13 ± 0.04	0/10	0.12 - 0.26
		FB	0.18 ± 0.12	2/10	0.12 - 0.37
		PQ 1	0.25 ± 0.08	8/10	0.15 - 0.39
		PQ 2	0.57 ± 0.16	10/10	0.39 - 0.79
	8	Kontrola	0.12 ± 0.01	0/10	0.12 - 0.22
		FB	0.12 ± 0.01	0/10	0.12 - 0.18
		PQ 1	0.16 ± 0.01	0/10	0.15 - 0.17
		PQ 2	0.15 ± 0.01	0/10	0.14 - 0.16

Koncentrace ... průměr ± SD, výsledky <LOQ = ½ LOQ.

Četnost ... počet pozitivních/všech vzorků.

LOQ ... limit of quantification (limit kvantifikace)



### **3.3.2.3. Histologické vyšetření**

Histologickým vyšetřením nebyly zjištěny žádné patologické změny vyšetřovaných orgánů mající souvislost s předkládanými medikovanými krmivy. U všech skupin byly zaznamenány steatózní změny jaterních buněk. Tento nález bývá obvyklý u ryb krmených granulami a lze ho tedy přisuzovat spíše dietetickým chybám, kdy je rybám předkládána výživa s nízkým podílem přirozené potravy bohaté na vitamíny a esenciální látky.

### **3.2.3. Závěr**

V testu perorální aplikace medikovaných krmiv byl prokázán léčebný efekt obou testovaných látek, ale v porovnání s praziquantelom je účinnost fenbendazolu na metacerkárie významně nižší. Avšak oproti praziquantelu je fenbendazol metabolizován rychleji. Žádné z testovaných krmiv nezpůsobuje histologicky patrné změny tkání kůže, jater a žaber.

V provozních podmínkách rybnářství Hluboká CZ s.r.o. byly provedeny tyto testy:

### **3.4. Aplikace fenbendazolu (FB) a praziquantelu (PQ) namíchaných v krmivu pro amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*) – Ab0 a Ab1 v provozních podmínkách**

#### **3.3.1. Metodika**

Test probíhal v období srpna 2018 – listopadu 2019. Celkem 60 000 ks Ab<sub>0</sub> bylo nasazeno do 4 parcelových rybníčků (cca 1,3 ha) v areálu Ostrov u obce Čejkovice. Po 60ti denní aklimatizaci ryb, během které si již přivykly na příjem krmiva KP1, bylo rybám předkládáno medikované krmivo (MK) s obsahem fenbendazolu v dávce 40mg/kg (FB1 – rybníček 1) a 80mg/kg (FB2 – rybníček 2) a MK s obsahem praziquantelu v dávce 100mg/kg (PQ – rybníček 3). Obsádka rybníčku 4 byla nadále prokrmována KP1 a sloužila jako kontrolní (K). MK bylo prokrmeno v 6 ti dávkách v měsících 08. a 09. 2018 a 07. a 08.2019. Před první aplikací, na závěr testu (5 dní po poslední aplikaci MK) a měsíčně (vyjma zimního období) byla vyhodnocována prevalence a intenzita infekce metacerkárií *Diplostomum spathaceum* v oční





čočce u 10ks amurů z každého rybníčka a na podkladě výsledků byl sledován průběh infekce a účinnost zvolených dávek na eliminaci tohoto parazita.

### 3.3.2. Výsledky

Iniciální prevalence motolic dosahovala u všech rybníčků 90%. Intenzivní prokrmení MK s obsahem fenbendazolu snížilo prevalenci (o 20-30%) a intenzitu (až o 50%) infekce (Tabulka 6). Pozvolný poaplikační nárůst množství parazitů lze přičítat reinfekcím, kdy mezihostitelští šneci v závislosti na teplotě produkují další infekční cercárie napadající rybu. Pro zmírnění příznaků infekce se však stále efektivněji projevuje praziquantel, který je po aplikaci schopen metacercárie úplně eliminovat.

Tabulka 6: Prevalence a intenzita infekce *Diplostomum spathaceum* stanovené u ryb v průběhu jednotlivých měsíců let 2018-2019. Červené sloupce značí vyšetření provedené v měsíci po aplikaci medikovaného krmiva.

skupiny	Prevalence infekce / Intenzita infekce								
	(%) / (průměrný počet parazitů na rybu)								
	Před testem	10.2018	11.2018	4.2019	5.2019	6.2019	09.2019	10.2019	11.2019
Kontrola	90 / 3,6	100 / 5,8	90 / 4,8	90 / 5,5	90 / 4,5	100 / 5,2	100 / 6,4	90 / 7,2	100 / 4,8
FB1	-	80 / 3,2	80 / 2,2	90 / 3,4	70 / 2,2	90 / 2,7	70 / 2,2	70 / 2,4	80 / 2,2
FB2	-	70 / 2,1	80 / 2,3	80 / 3,6	80 / 3,0	80 / 4,5	80 / 1,7	70 / 2,5	80 / 1,9
PQ	-	0 / 0	20 / 2	75 / 3,1	80 / 3,2	80 / 2,8	0 / 0	10 / 2	20 / 1



## 4. Závěr

Při testování fenbendazolu byly nejdříve provedeny testy toxicity na modelových organismech *Poecilia reticulata*, *Daphnia magna* a *Desmodesmus subspicatus*. Na podkladě provedených testů na *Poecilia reticulata* a *Desmodesmus subspicatus* lze konstatovat, že hodnoty 96hLC50 a 78hIC50 jsou vyšší než 100 mg.l<sup>-1</sup>. Stanovená hodnota terapeutického indexu pro ryby (>4) proto vykazuje příznivou hodnotu pro jeho terapeutické využití. Avšak předpokládaná koncentrace terapeutické koupele vyvolala v testu toxicity na *Daphnia magna* 90% úhyn testovacích organismů. To svědčí o jeho vysoké toxicitě pro tento druh organismů a výrazně omezuje možnosti jeho širšího terapeutického využití v chovech ryb formou koupelí.

V dalších testech FB ovlivnil množství červených krvinek, které však stále zůstávalo v optimálním rozmezí pro kaprovité ryby. U biochemických ukazatelů došlo po FB koupeli ke zvýšení aktivity LDH, což naznačuje mírnou alteraci buněk jaterního parenchymu, avšak stále bezpečnou pro využití u ryb.

V laboratorních a provozních testech aplikace medikovaných krmiv s obsahem FB byl sice prokázán účinek na metacerkárie motolice oční, avšak v porovnání s praziquantelem byl léčebný efekt v obou testech významně nižší.

**Fenbendazol v dávce 40 mg.kg<sup>-1</sup> ž.m. zapracovaný v krmivu lze použít ke kontrole a zmírnění průběhu infekce způsobené metacerkáriemi motolice oční, avšak jeho terapeutické účinky jsou v porovnání s praziquantelem prokazatelně nižší.**