



Anestetika pro ryby

*J. Kolářová, J. Velíšek, L. Nepejchalová, Z. Svobodová, J. Kouřil,
J. Hamáčková, J. Máchová, V. Piačková, J. Hajšlová, K. Holadová,
V. Kocourek, E. Klimánková, H. Modrá, R. Dobšíková, L. Groch, L. Novotný*



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ





FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Anestetika pro ryby

(aktualizované vydání z roku 2007)

*J. Kolářová, J. Velíšek, L. Nepejchalová, Z. Svobodová, J. Kouřil,
J. Hamáčková, J. Máchová, V. Piačková, J. Hajšlová, K. Holadová,
V. Kocourek, E. Klímánková, H. Modrá, R. Dobšíková, L. Groch, L. Novotný*

**VYDÁNÍ PUBLIKACE BYLO USKUTEČNĚNO
ZA FINANČNÍ PODPORY PROJEKTU:**

Inovace prezenčního studia bakalářského studijního oboru Rybářství

(CZ.1.07/2.2.00/15.0076)



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

**OBSAHOVÁ ČÁST PUBLIKACE BYLA ZPRACOVÁNA
ZA FINANČNÍ PODPORY NÁSLEDUJÍCÍCH PROJEKTŮ:**

MZe ČR NAZV – Harmonizace s EU v uplatňování principů farmakovigilance v akvakulturních chovech ČR

(QF3029)

Biologické, environmentální a chovatelské aspekty v rybářství

(MŠMT č. MSM6007665809)

CENAKVA – Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz (OPVaVpl,

CZ.1.05/2.1.00/01.0024)

Chovatelské a environmentální aspekty akvakultury a hydrocenóz

(GA JU 047/2010/Z)



ISBN 978-80-87437-44-5

OBSAH

1. ANESTESIE OBECNĚ	6
2. ANESTETIKA	7
3. MS 222	8
4. 2-PHENOXYETHANOL	11
4.1. Testování účinnosti	11
4.2. Testování negativního účinku na cílový organismus (ryby)	12
4.2.1. Test akutní toxicity na rybách po podání jedné dávky	12
4.2.2. Hematologické vyšetření	13
4.2.3. Biochemické vyšetření krevní plazmy	13
4.2.4. Histologické vyšetření	14
4.3. Farmakokinetické testování	14
4.4. Testování přetrvávání reziduí ve svalovině s kůží	14
4.5. Ekotoxikologické testování	16
4.6. Shrnutí (teoretický návrh příbalového letáku)	17
5. HŘEBÍČKOVÝ OLEJ	18
5.1 Testování účinnosti	18
5.2. Testování negativního účinku na cílový organismus (ryby)	19
5.2.1. Test akutní toxicity na rybách po podání jedné dávky	19
5.2.2. Hematologické vyšetření	20
5.2.3. Biochemické vyšetření krevní plazmy	20
5.2.4. Histologické vyšetření	21
5.3. Ekotoxikologické testování	21
5.4. Shrnutí	23
LITERATURA	24

1. ANESTESIE OBECNĚ

V humánní medicíně se používá pojem **anestésie** (anaesthesia) ve smyslu ztráty citu, citlivosti, čítí – místní znecitlivění; nesprávně „umrtvení“. Pro bezvědomí, v němž pacient účinkem narkotik (látky uspávající, tlumící bolest a omamující) necítí bolesti útlumem vyšších nervových funkcí mozkových, se používá pojem narkóza (narcosis). Ve veterinární medicíně je pojem **anestésie ryb** chápán jako celkové znecitlivění ryb za účelem manipulace s rybami či provádění různých veterinárních či chovatelských zákroků. Anestésie ryb je prevencí manipulačního stresu a mechanického poškození. Zákon na ochranu zvířat proti týrání (č. 246/1992 Sb.) požaduje postupovat tak, aby bylo zabráněno nešetrné manipulaci a následnému poškození ryb. Proto je doporučeno používat anestezii při umělém výtěru ryb, při injekční aplikaci léčiv a hormonálních přípravků, při odběrech krve, při mechanickém odstraňování parazitů, při měření a vážení ryb, fotografování ryb apod. Použití anestetik v dávkách pro sedací (uklidnění) a imobilizaci (znehynění) se uplatňuje také při dlouhodobé přepravě zejména akvarijních ryb, kdy anestetikum snižuje reakci ryb na vnější podněty a oslabuje metabolické procesy, což má za následek pokles spotřeby kyslíku a menší hromadění konečných produktů metabolismu. Vliv anestetika je využíván při přepravě akvarijních ryb také z důvodu snížení agresivity a následného vzájemného poškozování ryb. Anestésie ryb se v podmínkách ČR provádí převážně formou anestetické koupele. Anestezii ryb lze provádět i sprejováním žaber naředěným roztokem anestetika, které se používá v zahraničí u ryb větší velikosti.

Průběh nástupu anestésie se skládá ze 4 fází:

- 1. fáze = klidné chování – ryba je ve fyziologické poloze, má pravidelné dýchací pohyby, normální pohybovou aktivitu, při plavání se bez námahy vyhýbá překážkám.
- 2. fáze = excitace – ryba je ve fyziologické poloze, vykazuje však zvýšenou aktivitu, neklid, rychlé plavání, při plavání se nevyhýbá překážkám, má silné obranné reflexy, nepravidelné dýchací pohyby – u některých druhů ryb mělké dýchací pohyby, u jiných naopak roztažená skřelová víčka.
- 3a. fáze = celkové povrchní znecitlivění (= sedace a imobilizace) – ryba vykazuje sníženou aktivitu, pomalu se naklání na bok, ztrácí obranné reflexy, vyjma akustického, dýchací pohyby jsou již pravidelné, klidné, hluboké, zpomalující se.
- 3b. fáze = celkové úplné znecitlivění (= fáze odpovídající narkóze = bezvědomí u savců – útlumem vyšších mozkových funkcí není vnímána bolest; tato fáze narkózy je u ryb nazývána anestezii) – ryba je v boční poloze, vykazuje naprostou ztrátu pohyblivosti, je bez obranných reflexů, vyjma akustického, dýchací pohyby jsou pravidelné, klidné, hluboké, zpomalené.

- 4. fáze = zástava dýchání (hraniční mez hluboké anestezie – narkózy) – ryba je v bočním postavení, dýchací pohyby jsou zcela zastavené nebo jen povrchní – mělké, až zanikající, bez obranných reflexů včetně akustického.

Všechny fáze anestezie na sebe plynule navazují. Zotavení probíhá v opačném pořadí, přechody mezi fázemi jsou méně výrazné, fáze se prolínají. Anestezii ryb lze řídit koncentrací anestetika a délkou anestetické koupele podle požadavku, v jaké fázi anestezie ryby je potřebné pro konkrétní manipulaci mít. Velmi důležité je zohlednit druh a věkovou kategorii ryb a jejich citlivost vůči zvolenému anestetiku, tzn. provést vždy zkoušku snášenlivosti pro konkrétní látku, zvolenou koncentrací anestetika a teplotu vody anestetické koupele.

Při provádění anestezie je nutné sledovat teplotu anestetické koupele (vyšší teplota vody zpravidla zvyšuje účinek anestetika) a mít připravené nádrže s čistou dobře prokysličenou vodou stejné teploty, jako má anestetická koupel. Po provedení manipulace či úkonu na anestetizované rybě je vhodné provést ponořovací nebo krátkodobou koupel s desinfekčním účinkem (např. koupel v manganistanu draselném – ve formě ponořovací koupele: 1 g.l⁻¹ po dobu 30 až 45 sekund nebo krátkodobé koupele: 0,1 g.l⁻¹ po dobu 5 až 10 minut).

2. ANESTETIKA

Látky používané pro navození anestezie ryb se nazývají **anestetika**. Pro použití u ryb je ověřeno několik druhů anestetik. Problém v jejich použití u potravinových ryb spočívá v jejich registraci. Smyslem registrace léčiv je posouzení kvality, účinnosti a neškodnosti léku. Použití léčivého přípravku, který je registrovaný, se řídí přesným návodem k použití, který garantuje výrobce.

U registrovaného léčivého přípravku určeného pro potravinová zvířata (ta zvířata, která se potenciálně mohou dostat na potravinový trh – tedy i raná vývojová stadia ryb a generační ryby) musely být provedeny testy (Kolářová a Nepejchalová, 2006), ve kterých bylo akreditovaně stanoveno:

- chemické složení léčiva a jeho stabilita;
- účinek léčiva na cílový organismus (ryby);
- snášenlivost léčiva pro cílový organismus (ryby);
- vliv na životní prostředí (ekotoxikologické testy);
- přetrvávání reziduí léčiva v cílovém organismu, u ryb ve svalovině v přirozené souvislosti s kůží, v odůvodněných případech v játrech – hepatopankreatu (u kaprovitých ryb) a přidělena vhodná ochranná lhůta **OL**. Ta je odvozována od **MRL** (maximální reziduální limit – maximální množství účinné látky, které lze v požitelné tkáni akceptovat). Po dobu OL nelze potravinová zvířata

(tedy i ryby) dodat na trh za účelem konzumu. U ryb se OL vyjadřuje v denních stupních (stupňodnech). Jeden denní stupeň (= stupňoden) je představován průměrnou denní teplotou 1 °C po dobu 1 dne (24 h), např. 100 stupňodnů = 10 dní při průměrné teplotě 10 °C. Pokud není OL stanovena výrobcem, přiřazuje se danému léčivému přípravku nejdelší ochranná lhůta: pro ryby 500 stupňodnů (Zákon č. 166/1999 Sb., o veterinární péči).

MS 222 (tricain) je v současné době jediné anestetikum, které splnilo všechny podmínky, a v některých zemích EU (VB, Švédsko) je registrované jako jediné anestetikum pro ryby. Jeho registrace však zatím není platná v ČR, ale lze jej používat jako přípravek registrovaný pro ryby v jiné zemi EU. Pro jeho dovoz a použití v ČR je nutno získat souhlas od Státní veterinární správy ČR (SVS ČR, www.svscr.cz) podáním žádosti o dovoz veterinárního léčivého přípravku. Další dvě anestetické látky v praxi často používané u ryb (2-phenoxyethanol a hřebíčkový olej) nejsou registrované. 2-phenoxyethanol nemá stanoven MRL. Isoeugenol (účinná látka hřebíčkového oleje) má od roku 2011 stanoven MRL (Nařízení komise EU č. 363/2011) a lze v dohledné době očekávat registraci tohoto anestetika pro ryby. V současné době může obě tato anestetika předepsat jako „magistraliter“ pouze veterinární lékař, který přebírá veškerou zodpovědnost, a je nutno dodržet maximální ochrannou lhůtu (OL) 500 stupňodnů. Za dodržení ochranné lhůty nese odpovědnost veterinární lékař a chovatel.

Jednodušší situace je v zájmových chovech ryb (akvarijní a okrasné ryby), kde je možné použít přípravky dostupné chovatelské veřejnosti. I v tomto případě je však doporučena konzultace s veterinárním lékařem.

V rámci řešení projektu NAZV MZe ČR č. GF3029 „Harmonizace s EU v uplatňování principů farmakovigilance v akvakulturních chovech ČR“ (2003–2007) bylo ve VÚRH JU Vodňany provedeno testování neregistrovaných anestetik 2-phenoxyethanolu a hřebíčkového oleje za účelem poskytnutí maximálního množství informací o těchto léčivech pro veterinární lékaře. Dále bylo provedeno ověření registrovaného přípravku MS 222.

3. MS 222

MS 222 lze v ČR použít jako léčivý přípravek pro ryby registrovaný v jiné zemi EU. Pro jeho dovoz do ČR je nutné získat souhlas SVS ČR podáním žádosti o dovoz veterinárního léčivého přípravku. Tuto žádost podává veterinární lékař.

MS 222 (tricain methanosulfonát) je bílý prášek velmi dobře rozpustný ve vodě. Používá se v koncentraci **30–350 mg.l⁻¹** – dle druhu ryb, věkové kategorie ryb, teploty vody (při vyšší teplotě vody je účinek vyšší) a volby účinku. Použitím MS 222 lze docílit sedace na dobu 1–30 minut (při aplikaci vysoké dávky pro sedaci) nebo až 48hodinové sedace (při použití nízké dávky pro sedaci), popř. imobilizace a anestezie ryb.

Před aplikací anestetické koupele doporučuje výrobce hladovku (tzn. vysadit krmení) po dobu 12–24 h. Ryby absorbují anestetický roztok MS 222 žaberním epitelem, účinná látka je distribuována do celého těla, zpomaluje krevní oběh a snižuje spotřebu kyslíku. Během 1–15 minut dojde ke ztrátě základních reflexů (fáze anestezie 3a–3b). Návrat do původního stavu po přelovení ryb do čisté vody může trvat 1–30 min. Exkrece účinné látky z těla probíhá z větší části žaberním epitelem a také ledvinami. **Ochranná lhůta** po použití anestetika MS 222 je **70 stupňodnů**.

Použití MS 222 je doporučeno pro ryby, včetně ornamentálních, a jejich vývojová stádia. Před aplikací anestetické koupele je vždy nutné provést zkoušku snášenlivosti a účinku (na malém počtu ryb vyzkoušet danou koncentraci při konkrétních podmínkách – hlavně teplotních). Výrobce výslovně nedoporučuje použít MS 222 u tropických ryb *Apistogramma ramirezi*, *Balantiocheilus melanopterus*, *Etioplos surrantsensis*, *Melanotaenia macculochi*, *Monodactylus argenteus*, *Phenacogrammus interruptus* a *Scalopagus argus*.

Tab. 1. Příklady dávek MS 222 (7–17 °C).

Druh ryby	Účinek	Koncentrace MS 222 (mg.l ⁻¹)	Délka účinku (min)
Pstruh (<i>Oncorhynchus</i> sp.)	sedace	10–30	do 480
	anestezie lehká	30–80	do 30
	anestezie hluboká	80–180	do 10
Losos (<i>Salmon</i> sp.)	sedace	7–30	do 240
	anestezie lehká	30–80	do 10
	anestezie hluboká	80–100	do 5
Okounovité (obecně)	sedace	8–30	do 480
	anestezie lehká	30–70	do 20
Kapr obecný (<i>Cyprinus carpio</i>)	sedace	20–30	do 1 440
	anestezie	30–200	do 8
Tropické ryby	sedace	30–50	do 1 440

MS 222 je nutné skladovat v suchu při teplotě nižší než 25 °C a chránit před přímým sluncem, jeho skladovatelnost je za těchto podmínek 5 let. Již připravenou anestetickou koupel lze použít pouze tentýž den. Při manipulaci s MS 222 je třeba dbát na základní opatření bezpečnosti práce, zvláště předcházet možnosti inhalace prášku při přípravě anestetické koupele.

Majitelem registrace je Thomson and Joseph Limited, T+J House, 119 Plumstead Road, Norwich, Norfolk, NR1 4JT. V současné době je distributorem MS 222 Alpha Animal Health Limited, Unit 15 Sandleheath Industrial Estate, Fordingbridge, Hampshire. SP6 1PA, tel.: (01425) 656081, fax: (01425) 655309.

Při testování ve VÚRH JU Vodňany byly ověřeny následující koncentrace MS 222: 50 mg.l⁻¹; 75 mg.l⁻¹ a 100 mg.l⁻¹ u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) o průměrné hmotnosti 200 g při teplotě vody 15,5 °C. Ve všech případech byla zaznamenána minimální excitace (2. fáze anestezie), téměř hned (max. po 1 min) nastoupila 3. fáze anestezie. Délka rekonvalescence byla 2–25 minut, podle dávky MS 222. U jesetera sibiřského (*Acipenser baerii*) byla efektivní koncentrace 125 mg MS 222 na 1 litr vody a u candáta obecného (*Sander lucioperca*) 100 mg.l⁻¹. Dále bylo prováděno testování MS 222 během telemetrických terénních prací. Pro intraperitoneální implantaci vysílaček bylo nutné ryby uvést do hluboké anestezie pro chirurgický zákrok. U dospělých jelců tloušťů (*Squalius cephalus*) byla používána koncentrace 133 mg.l⁻¹, u pstruhů obecných (*Salmo trutta fario*) 100 mg.l⁻¹ a u sumců velkých (*Silurus glanis*) 350 mg.l⁻¹.

Naše zkušenosti s použitím přípravku v MS 222 jsou velmi dobré. Podle našeho názoru je MS 222 velmi kvalitním registrovaným nástupcem dříve oblíbeného anestetika Menocain (původní název: Monetan), které se dnes již nevyrábí.

4. 2-PHENOXYETHANOL

Roztok **2-phenoxyethanol** (ethylen glycol monophenyl ether) má přesně definované chemické složení. Obecně je používán v koncentraci **0,3–0,4 ml.l⁻¹**. Anestezie nastupuje do 5–10 minut, doba zotavení v čerstvé vodě trvá zhruba 10 minut. 2-phenoxyethanol lze použít k sedaci, imobilizaci a anestezii, nemá však stanoven MRL (maximální limit reziduí) a není registrovaný. Proto je jeho použití možné pouze na předpis „magistraliter“ veterinárního lékaře a na jeho vlastní odpovědnost. Veterinární lékař musí nařídí dodržení maximální **ochranné lhůty**, tj. **500 stupňodů**, za které odpovídá společně s chovatelem.

Nevýhodou 2-phenoxyethanolu je jeho negativní účinek na obsluhující personál (dráždí oči a kůži). Při aplikaci je nutné dodržovat základní bezpečnostní opatření a použít ochranné pomůcky (rukavice, obuv, brýle nebo ochranný štít).

4.1. TESTOVÁNÍ ÚČINNOSTI

Tab. 2. Příklady dávek 2-phenoxyethanolu.

Druh ryb	Věk ryb	Hmotnost ryb (g)	Teplota vody (°C)	Účinná koncentrace (ml.l ⁻¹)
Lin obecný (<i>Tinca tinca</i>)	L ₁ –L _t	5–500	20	0,6
různé druhy jeseterů (<i>Acipenser baerii</i> , <i>A. ruthenus</i> , <i>A. stellatus</i> ,...)	4 měsíce až generačky	9	4–22	0,6–0,7
Síh peled' (<i>Coregonus peled</i>)	Pe ₃	800–1 000	1	0,4
Okoun říční (<i>Perca fluviatilis</i>)		32–40	12,5–20,0	0,4
Lipán podhorní (<i>Thymallus thymallus</i>)	generačky		11,5–12,0	0,4
Pstruh obecný (<i>Salmo trutta</i>)		100	10,5	0,4

Tab. 3. Příklady dávek 2-phenoxyethanolu – akvarijní a okrasné ryby.

Druh ryb	Teplota vody (°C)	Účinná koncentrace (ml.l ⁻¹)
Black Molla (<i>Molinesia shenops</i>)	25	0,4
Parmička čtyřpruhá (<i>Puntius tetrazona</i>)	25	0,3
Parmička nádherná (<i>Puntius conchonius</i>)	25	0,3
Závojnátka (<i>Carasius auratus</i>)	15–20	0,35

Účinnost 2-phenoxyethanolu v dávce $0,4 \text{ ml.l}^{-1}$ byla zaznamenána u štiky obecné (*Esox lucius*), jelce proudníka (*Leuciscus leuciscus*), hrouzka obecného (*Gobio gobio*), sivena amerického (*Salvenius fontinalis*) a u candáta obecného (*Sander lucioperca*). U jelce jesena (*Leuciscus idus*) byla účinná dávka $0,35 \text{ ml.l}^{-1}$. Okounovec nilský (tilápie) (*Oreochromis niloticus*) vykazoval nízkou vnímavost k tomuto anestetiku.

4.2. TESTOVÁNÍ NEGATIVNÍHO ÚČINKU NA CÍLOVÝ ORGANISMUS (RYBY)

4.2.1. Test akutní toxicity na rybách po podání jedné dávky

Testy byly provedeny podle SOP 05 (Standardní operační postup – Směrnice ekotoxikologické hodnocení léčiv určených pro ryby –VÚRH JU Vodňany). SOP je zpracován podle normy OECD 203 – Fish Acute Test of Toxicity, kde je přesně definována kromě jiných parametrů teplota vody, při které se test provádí ($21 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), a velikost ryb.

Tab. 4. Akutní toxicita 2-phenoxyethanolu pro ryby.

Testovací organismus	Zjišťované hodnoty	mg.l^{-1}	ml.l^{-1}
Kapr obecný (<i>Cyprinus carpio</i>)	96hLC50	190	0,17
	10minLC50	430	0,39
Pstruh duhový (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	96hLC50	280	0,25
	10minLC50	510	0,46
Zebříčka pruhovaná (<i>Danio rerio</i>)	96hLC50	325	0,30
Paví oko (<i>Poecilia reticulata</i>)	96hLC50	398	0,36

Pozn.:

96hLC50 = koncentrace testované látky, při které během 96 h uhynie 50 % testovacích organismů

10minLC50 = koncentrace testované látky, při které během 10 min uhynie 50 % testovacích organismů

Provedenými testy akutní toxicity byla prokázána řádová shoda citlivosti vybraných testovacích organismů vůči tomuto anestetiku. Nejvyšší citlivost překvapivě vykazoval kapr obecný (*C. carpio*). Pro posouzení rizika aplikace 2-phenoxyethanolu jako anestetika byly stanoveny hodnoty 10minLC50 pro kapra obecného a pstruha duhového a z těchto hodnot byl vypočten **terapeutický index (TI = LC50/doporučená koncentrace) pro kapra 1,3; pro pstruha 1,53**. Z těchto údajů vyplývá, že při anestezii ryb pomocí 2-phenoxyethanolu je nutno postupovat velmi zodpovědně a pečlivě dodržovat doporučené dávky, neboť zjištěné terapeutické indexy jsou velmi nízké.

Anestetikum není určeno pro opakované podání, a proto není nutné provádět test toxicity při opakovaném podání.

4.2.2. Hematologické vyšetření

Během vyšetření krve ryb byly sledovány tyto parametry: počet červených krvinek – erytrocytů (Er), koncentrace hemoglobinu (Hb), hodnota hematokritu (PCV), parametry erytrocytů (MCV – střední objem erytrocytu, MCH – hemoglobin v 1 erytrocytu, MCHC – střední barevná koncentrace = koncentrace hemoglobinu v objemové jednotce erytrocytů), počet bílých krvinek – leukocytů (Leu) a zastoupení jednotlivých druhů bílých krvinek (Leukogram).

U pstruha duhového (*O. mykiss*) nebyly po působení anestetika 2-phenoxyethanolu v koncentraci 0,3 ml.l⁻¹ zaznamenány žádné změny ve sledovaných hematologických ukazatelích. U kapra obecného (*C. carpio*) bylo bezprostředně po anestezii zaznamenáno zvýšení hodnoty hematokritu, které se po 24 hodinách upravilo. U sumce velkého (*Silurus glanis*) bylo zaznamenáno rovněž zvýšení hodnoty hematokritu a zároveň středního objemu erytrocytu. Po 24 hodinách bylo u sumce zaznamenáno snížení počtu leukocytů (Velíšek a kol., 2006a). **Změny hematologických parametrů dokladují stres, který u ryb proběhne při anestetické koupeli.**

4.2.3. Biochemické vyšetření krevní plazmy

V rámci biochemického vyšetření krevní plazmy ryb byly na biochemickém analyzáru VETTEST 8008 stanoveny koncentrace: glukózy (GLU), celkových bílkovin (TP – total protein), albuminu (ALB), globulinu (GLOB), triglyceridů (TRIG), anorganického fosfátu (PHOS), amoniaku (NH₃) a jaterních enzymů: asparát aminotransferázy (AST), alanin aminotransferázy (ALT), laktát dehydrogenázy (LDH), kreatinkinázy (CK).

Biochemické vyšetření krevní plazmy prokázalo u pstruha duhového (*O. mykiss*) ihned po anestezii zvýšení koncentrace glukózy a snížení koncentrace aspartát aminotransferázy oproti kontrole. Po 24 hodinách bylo u pstruha zaznamenáno zvýšení koncentrace celkových bílkovin, albuminů a globulinů. U kapra obecného (*C. carpio*) nebyly ihned po anestezii zaznamenány žádné změny v biochemickém profilu, po 24 hodinách byla zjištěna zvýšená koncentrace alanin aminotransferázy (Velíšek a Svobodová, 2004a,b). U sumce velkého (*Silurus glanis*) bylo zaznamenáno zvýšení glukózy a albuminů hned po anestetické koupeli a snížení ALT, které přetrvávalo ještě 24 hodin po anestezii (Velíšek a kol., 2006b). **Zaznamenané změny biochemických parametrů krve dokladují hepatotoxický a stresový účinek anestetické koupele, vesměs reverzibilního charakteru.**

4.2.4. Histologické vyšetření

Histologické vyšetření prokázalo u kapra (*C. carpio*) 24 hodin po anestésii edém epitelu sekundárních žaberních lamel a mírnou hyperplasii a hypertrofii eosinofilních buněk při bázi sekundárních lamel na žábřách (Kolářová a kol., 2005). U sumce (*S. glanis*) došlo po anestetické koupeli ke kapilární ektázii žaberních lístků (Velíšek a kol., 2006b).

U každého ze tří sledovaných druhů ryb byly zaznamenány změny jiných parametrů, z čehož se dá usuzovat na druhově specifickou citlivost vůči působení 2-phenoxyethanolu. **Zjištěné změny sledovaných parametrů však nebyly natolik závažné, aby nebylo možno přípravek 2-phenoxyethanol považovat za bezpečné anestetikum pro ryby.**

4.3. FARMAKOKINETICKÉ TESTOVÁNÍ

Za účelem zjištění dynamiky účinné látky 2-phenoxyethanolu v krevním řečišti po anestetické koupeli (0,3 ml.l⁻¹; teplota vody 8,5–10 °C) byla pstruhům duhovým (*O. mykiss*) (vždy třem rybám – A, B, C; po 24 h šesti rybám – A, B, C, D, E a F) odebrána krev z ocasní cévy v příslušných časových intervalech od začátku anestetické koupele a následného přemístění ryb do čisté vody. Jako protisrážecí přípravek byl použit heparin. Z odebrané krve byla získána krevní plazma a v ní bylo na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze (VŠCHT Praha) provedeno stanovení koncentrace 2-phenoxyethanolu nově vyvinutou metodou.

Stanovení bylo provedeno pomocí techniky mikroextrakce na tuhou fázi (SPME) v „head-pase“ prostoru. Pro sorpci 2-phenoxyethanolu z plynné fáze nad vzorkem bylo použito vlákno se stacionární fází polydimethylsiloxan /karboxen/ divinylbenzen. Jako instrumentální koncovka byla využita plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí s analyzátozem typu iontová past.

Farmakokinetická sledování ukázala, že účinná látka 2-phenoxyethanolu přetrvává v krevním řečišti ryb krátkou dobu. K rychlému poklesu došlo již do 15 minut po přelovení ryb z anestetické koupele do čisté vody.

4.4. TESTOVÁNÍ PŘETRVÁVÁNÍ REZIDUÍ VE SVALOVINĚ S KŮŽÍ

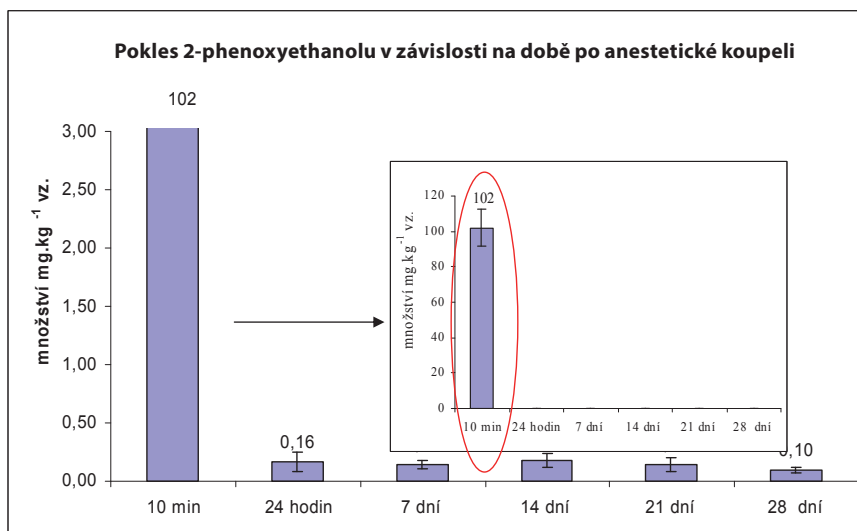
Za účelem zjištění přetrvávání reziduí 2-phenoxyethanolu ve svalovině ryb byly provedeny odběry vzorků po anestetické koupeli v roztoku 2-phenoxyethanolu (0,3 ml.l⁻¹; teplota vody 11,5–13 °C) z hřbetní svaloviny s kůží pstruhů duhových (*O. mykiss*) vždy ze stejného místa v příslušných časových intervalech od začátku anestetické koupele a následného přemístění ryb do čisté vody.

Stanovení 2-phenoxyethanolu ve svalovině s kůží bylo provedeno na VŠCHT Praha stejnou technikou jako stanovení v krevní plazmě (viz kap. 4.3.).

Tab. 5. Koncentrace 2-phenoxyethanolu v krevní plazmě.

Doba odběru vzorku krve	Vzorek	Konc. 2-phenoxyethanolu v krevní plazmě ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (% výchozího obsahu)		
		A	B	C
Před aplikací	P1	0	0	0
Těsně po aplikaci	P2	254,6 (100%)	252,1 (100%)	137,1 (100%)
15 min po aplikaci	P3	14,0 (5,5%)	34,6 (13,7%)	43,1 (31,5%)
1 h po aplikaci	P4	12,8 (5,0%)	5,6 (2,2%)	14,7 (10,7%)
4 h po aplikaci	P5	1,7 (0,5%)	1,0 (0,4%)	2,0 (1,5%)
24 h po aplikaci	P6	A: 1,4 (0,5%)	B: 0,8 (0,3%)	C: 0,9 (0,6%)
		D: 1,4 (0,5%)	E: 0,7 (0,3%)	F: 0,9 (0,6%)

Ze zjištěných hodnot je zřejmé, že účinná látka 2-phenoxyethanolu přetrvává v krevním řečišti ryb krátkou dobu.



Obr. 1. Znárodnění dynamiky 2-phenoxyethanolu v dodaných vzorcích rybí svaloviny s kůží. Hodnoty uvedené nad jednotlivými sloupci znázorňují průměrné nálezy ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 2-phenoxyethanolu u příslušné řady.

Je možné konstatovat, že **nejvýraznější pokles v obsahu 2-phenoxyethanolu v rybí svalovině s kůží byl zaznamenán během prvních 24 hodin**. Nízké koncentrace reziduí však přetrvávaly po celou dobu sledování. **Maximální ochranná lhůta, kterou je nutné dodržet – 500 stupňodů, zaručuje bezpečnost pro lidský konzum.**

4.5. EKOTOXIKOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ

Testy byly provedeny podle standardních operačních postupů SOP 5, 6, 7, 8, 9, 10 (Směrnice pro ekotoxikologické hodnocení léčiv určených pro ryby, VÚRH JU Vodňany). SOP jsou zpracovány podle normy OECD.

Tab. 6. Ekotoxikologické testování 2-phenoxyethanolu.

Organismus	Stanovené hodnoty	mg.l ⁻¹	ml.l ⁻¹
Kapr obecný (<i>Cyprinus carpio</i>)	96hLC50 10minLC50	190 430	0,17 0,39
Pstruh duhový (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	96hLC50 10minLC50	280 510	0,25 0,46
Zebříčka pruhovaná (<i>Danio rerio</i>)	96hLC50	325	0,30
Paví oko (<i>Poecilia reticulata</i>)	96hLC50	398	0,36
Drápatka vodní (<i>Xenopus laevis</i> ^{*)})	96hLC50 96hEC50	458 328	0,42 0,30
Perloočka velká (<i>Daphnia magna</i>)	48hEC50	236	0,21
Okřehek menší (<i>Lemna minor</i>)	168hLC50	325	0,30

Pozn.:

96hLC50 = koncentrace testované látky, při které během 96 h uhynie 50 % testovacích organismů

10minLC50 = koncentrace testované látky, při které během 10 min uhynie 50 % testovacích organismů

96hEC50 = koncentrace testované látky, při které se vyskytne během 96 h sledovaný účinek (v případě testu na drápatkách *X. laevis* – malformace)

^{*} Teratogenní index pro *X. laevis* (podíl LC50/EC50) = 1,39; tato hodnota nasvědčuje tomu, že 2-phenoxyethanol nepředstavuje vysoké teratogenní riziko pro obojživelníky

48EC50 = koncentrace testované látky, při které se vyskytne během 48 h sledovaný účinek (v případě *D. magna* – imobilizace)

168hLC50 = koncentrace testované látky, při které se vyskytne během 168 h inhibiční účinek

Na základě zjištěných hodnot LC50, EC50 a IC50 lze konstatovat, že **2-phenoxyethanol nepředstavuje vážné riziko pro životní prostředí, všechny zjištěné hodnoty jsou nad 100 mg.l⁻¹ a k takovým přípravkům není přiřazována žádná z rizikových vět (R50–R52).**

4.6. SHRnutí (TEORETICKÝ NÁVRH PŘÍBALOVÉHO LETÁKU)

Název přípravku: 2-phenoxyethanol.

Složení: ethylene glykol monophenyl ether, $C_8H_{10}O_2$ (farmaceutická surovina).

Indikační skupina: anestetikum pro ryby.

Popis přípravku: bezbarvý roztok.

Charakteristika přípravku: látka s anestetickým účinkem pro ryby, rozpustná ve vodě.

Farmakokinetické účinky: 2-phenoxyethanol se vstřebává žaberním epitelem, jeho přítomnost v krvi ryb je krátkodobá.

Indikace: sedace, imobilizace, lehká anestezie pro manipulaci mimo vodní prostředí i hluboká pro chirurgický zákrok.

Nežádoucí účinky: reversibilní změny v krevním obraze

Dávkování: 0,3–0,4 ml.l⁻¹; 2-phenoxyethanol dobře rozmíchat v menším množství vody a teprve pak nalít do lázně. Používat vodu stejné kvality a teploty v jaké jsou ryby přechovávány. Do lázně vkládat ryby postupně. Anestezie nastupuje během 5–10 min. Rekonvalescence po přemístění do čisté vody trvá 10 min.

Způsob použití: anestetická koupel pro ryby. Před aplikací anestetika je doporučena hladovka (tzn. vysadit krmení) po dobu 12–24 h.

Uchování a způsob skladování: skladovat v pevně uzavřené lahvi, na vzdušném místě při teplotě do 25 °C, chránit před zdroji ohně a před mrazem!

Varování: Látka toxická a nebezpečná pro člověka! Dráždí oči a kůži. Dodržovat bezpečnost práce! Při vniknutí do oka provést výplach vodou a vyhledat lékaře! Manipulace může být prováděna pouze veterinárním lékařem nebo jím pověřenou osobou a s jeho odpovědností. Přestože 2-phenoxyethanol nepředstavuje vážné riziko pro životní prostředí, je nutno likvidovat anestetickou lázeň několikanásobným zředěním, nevypouštět do volné ani odpadní vody.

Upozornění: nutný veterinární předpis „magistraliter“ – phenoxyethanol jako farmaceutická surovina.

Ochranná lhůta: 500 stupňodnů.

5. HŘEBÍČKOVÝ OLEJ

Hřebíčkový olej je látka přírodního původu získaná destilací z rostliny *Eugenia aromatica* nebo *E. caryophyllata*. Účinnou látkou je eugenol, který tvoří 72–90 % hřebíčkového oleje. Přednost tohoto anestetika (přírodní původ) je i jeho nevýhodou – nelze přesně definovat složení jednotlivých šarží hřebíčkového oleje. Z eugenolu je možné syntetizovat isoeugenol, jehož obsah již lze přesně definovat. Pro isoeugenol byl stanoven MRL (Nařízení komise EU č. 363/2011) a lze v dohledné době očekávat registraci tohoto anestetika pro ryby.

Hřebíčkový olej (eugenol) je k dostání v lékárenské síti. V našem případě byl testován: *Caryophylli floris etheroleum* (Hřebíčková sílice), atest 0036/0204/517; ČL 2002, dodává firma: Kulich (RNDr. Jan Kulich), Hradec Králové.

Doporučená anestetická dávka je **30–40 mg.l⁻¹** (= 0,03–0,04 ml.l⁻¹ → 1 g hřebíčkového oleje zhruba odpovídá 1 ml), anestezie nastupuje do 5–10 minut, doba zotavení je poněkud delší než u jiných anestetik. Jeho použití je proto možné pouze na předpis „magistraliter“ veterinárního lékaře a na jeho vlastní odpovědnost. Veterinární lékař musí nařídít dodržení maximální **ochranné lhůty**, tj. **500 stupňodnů**, za které odpovídá společně s chovatelem.

5.1. TESTOVÁNÍ ÚČINNOSTI

Tab. 7. Příklady dávek – hřebíčkový olej (eugenol 78%, Dr. Kulich Pharma, s.r.o., ČR).

Druh ryb	Věk ryb	Hmotnost ryb (g)	Teplota vody (°C)	Účinná koncentrace (ml.l ⁻¹)
Kapr obecný (<i>Cyprinus carpio</i>)	K ₁ –K ₃	50–3 000	5–25	0,04–0,06
Mník jednovousý (<i>Lota lota</i>)	Mn ₂₋₃	80–100	5	0,02–0,07
Jeseter malý (<i>Acipenser ruthenus</i>)	0+ až generační	9–10 000	4–20	0,07
Okoun říční (<i>Perca fluviatilis</i>)	0 ₊₂₋₃	32–40	12,5–20,0	0,033
Siven americký (<i>Salvenius fontinalis</i>)	Si ₁	20–50	5	0,033
Sih peled (<i>Coregonus peled</i>)	Pe ₃	800–1 000	1	0,033

Tab. 8. Příklady dávek – hřebíčkový olej – akvarijní a okrasné ryby (eugenol 78%, Dr. Kulich Pharma, s.r.o., ČR).

Druh ryb	Teplota vody (°C)	Účinná koncentrace (ml.l ⁻¹)
Black Molla (<i>Molinesia shenops</i>)	25	0,025
Parmička čtyřpruhá (<i>Puntius tetrazona</i>)	25	0,025
Parmička nádherná (<i>Puntius conchorius</i>)	25	0,025
	15	0,033
Závojnátka (<i>Carasius auratus</i>)	20	0,033

Účinnost hřebíčkového oleje byla také zaznamenána u štiky obecné (*Esox lucius*) v dávce 0,033 ml.l⁻¹, jelce jesena (*Leuciscus idus*) v dávce 0,25 ml.l⁻¹, jelce proudníka (*Leuciscus leuciscus*) v dávce 0,066 ml.l⁻¹, hrouzka obecného (*Gobio gobio*) v dávce 0,033 ml.l⁻¹, okouna říčního (*Perca fluviatilis*) 0,033 ml.l⁻¹, pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) 0,033 ml.l⁻¹, jesetera sibiřského (*Acipenser baerii*) 0,075 ml.l⁻¹ a u candáta obecného (*Sander lucioperca*) 0,033 ml.l⁻¹. Okounovec nilský (tilápie, *Oreochromis niloticus*) vykazoval nízkou vnímavost k tomuto anestetiku.

5.2. TESTOVÁNÍ NEGATIVNÍHO ÚČINKU NA CÍLOVÝ ORGANISMUS (RYBY)

5.2.1. Test akutní toxicity na rybách po podání jedné dávky

Testy byly provedeny podle SOP 05 (Směrnice ekotox. hodnocení léčiv určených pro ryby – VÚRH JU Vodňany). SOP je zpracována podle normy OECD 203 – Fish, Acute test toxicity, kde je přesně definována kromě jiných parametrů teplota vody, při které se test provádí (21 ± 2 °C) a velikost ryb.

Tab. 9. Akutní toxicita pro ryby – hřebíčkový olej (eugenol 78%, Dr. Kulich Pharma, s.r.o., ČR).

Testovací organismus	Zjišťované hodnoty	mg.l ⁻¹
Kapr obecný (<i>Cyprinus carpio</i>)	96hLC50	15
	10minLC50	74
Pstruh duhový (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	96hLC50	14
	10minLC50	81
Zebřička pruhovaná (<i>Danio rerio</i>)	96hLC50	19
Paví oko (<i>Poecilia reticulata</i>)	96hLC50	17

Pozn.:

96hLC50 = koncentrace testované látky, při které během 96 h uhynie 50 % testovacích organismů

10minLC50 = koncentrace testované látky, při které během 10 min uhynie 50 % testovacích organismů

Provedenými testy akutní toxicity byla prokázána shoda citlivosti vybraných testovacích organismů vůči testovanému anestetiku. Pro posouzení rizika aplikace hřebíčkového oleje jako anestetika byly stanoveny hodnoty 10minLC50 pro kapra obecného a pstruha duhového a z těchto hodnot byl vypočten **terapeutický index (TI = LC50/ doporučená koncentrace) pro kapra 2,5; pro pstruha 2,7**. Z tohoto hlediska je tedy hodnocení hřebíčkového oleje podstatně příznivější, neboť podíl letální a používané koncentrace je výrazně vyšší ve srovnání s 2-phenoxyethanolem.

Anestetikum není určeno pro opakované podání, a proto testy po opakovaném podání není nutné provádět.

5.2.2. Hematologické vyšetření

Při vyšetření krve ryb byly sledovány tyto parametry: počet červených krvinek – erytrocytů (Er), koncentrace hemoglobinu (Hb), hodnota hematokritu (PCV), parametry erytrocytů (MCV – střední objem erytrocytu, MCH – hemoglobin v 1 erytrocytu, MCHC – střední barevná koncentrace = koncentrace hemoglobinu v objemové jednotce erytrocytů), počet bílých krvinek – leukocytů (Leu) a zastoupení jednotlivých druhů bílých krvinek (Leukogram).

U kapra obecného (*C. carpio*) a pstruha duhového (*O. mykiss*) **nebyly po působení anestetika hřebíčkového oleje zaznamenány žádné statisticky významné změny** v hodnotách hematologických ukazatelů. U sumce velkého (*S. glanis*) došlo bezprostředně po anestezii ke snížení průměrné hodnoty MCHC (střední barevné koncentrace) a ke snížení počtu leukocytů. U tohoto druhu byla ihned po anestezii průměrná hodnota Hb nižší a průměrná hodnota PCV vyšší oproti kontrole, ovšem bez statistické významnosti (Velíšek a kol., 2005a,b; 2006b).

5.2.3. Biochemické vyšetření krevní plazmy

Během biochemického vyšetření krevní plazmy ryb byly na biochemickém analyzáru VETTEST 8008 stanoveny koncentrace: glukózy (GLU), celkových bílkovin (TP – total protein), albuminu (ALB), globulinu (GLOB), triglyceridů (TRIG), anorganického fosfátu (PHOS), amoniaku (NH_3) a jaterních enzymů: asparát aminotransferázy (AST), alanin aminotransferázy (ALT), laktát dehydrogenázy (LDH), kreatinkinázy (CK).

Biochemickým vyšetřením krevní plazmy bylo zjištěno u kapra obecného (*C. carpio*) ihned po anestezii zvýšení koncentrace glukózy a anorganického fosforu, u pstruha duhového (*O. mykiss*) ihned po anestezii zvýšení koncentrace glukózy a amoniaku a v obou pokusných skupinách (ihned po anestezii a po 24 hodinách) nižší koncentrace AST oproti kontrolám. U sumce velkého (*S. glanis*) došlo ihned po anestezii ke zvýše-

ní TRIG a ALT (Velíšek a kol., 2005a,b; 2006b). **Zaznamenané změny biochemických parametrů krve dokladují hepatotoxický a stresový účinek anestetické koupele, vesměs reverzibilního charakteru.**

5.2.4. Histologické vyšetření

Histologickým vyšetřením byly po desetiminutové anestezii u pstruha, kapra a sumce zjištěny kapilární ektázie žaberních tyčinek. Po 24 hodinách tyto změny diagnostikovány nebyly. (Velíšek a kol., 2005a,b; 2006b).

Vzhledem k tomu, že většina změn, které byly zjištěny histologickým vyšetřením a v hematologickém a biochemickém profilu ryb bezprostředně po anestezii (s výjimkou snížení koncentrace alanin aminotransferázy u pstruhů), se do 24 hodin upravila, lze usuzovat, že **hřebíčkový olej lze hodnotit z hlediska negativního účinku na ryby jako bezpečný přípravek k anestezii.**

5.3. EKOTOXIKOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ

Testy byly provedeny podle SOP 5, 6, 7, 8, 9, 10 (Směrnice ekotoxikologického ekotox. hodnocení léčiv určených pro ryby, VÚRH JU Vodňany). SOP je zpracována podle norem OECD.

Tab. 10. Ekotoxikologické testování – hřebíčkový olej (eugenol 78%, Dr. Kulich Pharma, s.r.o., ČR).

Organismus	Sledované hodnoty	mg.l ⁻¹
Kapr obecný (<i>Cyprinus carpio</i>)	96hLC50	15
	10minLC50	74
Pstruh duhový (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	96hLC50	14
	10minLC50	81
Zebříčka pruhovaná (<i>Danio rerio</i>)	96hLC50	19
Paví oko (<i>Poecilia reticulata</i>)	96hLC50	17
Drápatka vodní (<i>Xenopus laevis</i> ^{*)})	96hLC50	11
	96hEC50	34
Perloočka velká (<i>Daphnia magna</i>)	48hEC50	4
Okřehek menší (<i>Lemna minor</i>)	168hLC50	61

Pozn.:

96hLC50 = koncentrace testované látky, při které během 96 h uhynie 50 % testovacích organismů

10minLC50 = koncentrace testované látky, při které během 10 min uhynie 50 % testovacích organismů

96hEC50 = koncentrace testované látky, při které se vyskytne během 96 h sledovaný účinek (v případě testu na drápatkách *X. laevis* – malformace)

^{*)} Teratogenní index pro *Xenopus laevis* (podíl LC50/EC50) = 0,32 tato hodnota nasvědčuje tomu, že hřebíčkový olej nepředstavuje teratogenní riziko pro obojživelníky

48EC50 = koncentrace testované látky, při které se vyskytne během 48 h sledovaný účinek (v případě *D. magna* – imobilizace)

168hLC50 = koncentrace testované látky, při které se vyskytne během 168 h inhibiční účinek

Provedenými testy akutní toxicity byla prokázána řádová shoda citlivosti vybraných testovacích organismů vůči tomuto anestetiku s výjimkou *Daphnia magna*, která je o řád citlivější ve srovnání s ostatními použitými organizmy.

Na základě zjištěných hodnot LC50, EC50 a IC50 lze konstatovat, že **hřebíčkový olej je díky své akutní toxicitě pro *Daphnia magna* označen rizikovou větou R51 (přípravek toxický pro vodní organismy).**

5.4. SHRnutí (TEORETICKÝ NÁVRH PŘÍBALOVÉHO LETÁKU)

Název přípravku: hřebíčkový olej (eugenol).

Složení: látka přírodního původu získaná destilací z rostliny *Eugenia aromatica* nebo *E. caryophyllata*, nelze přesně definovat obsah účinné látky (eugenolu) v jednotlivých šaržích.

Indikační skupina: anestetikum pro ryby.

Popis přípravku: mírně nažloutlý až nahnědlý olejovitý roztok.

Charakteristika přípravku: látka s anestetickým účinkem pro ryby, méně rozpustná ve vodě.

Farmakokinetické účinky: eugenol se vstřebává žaberním epitelem a částečně kůží.

Indikace: sedace, imobilizace, lehká anestezie pro manipulaci mimo vodní prostředí i hluboká pro chirurgický zákrok.

Nežádoucí účinky: reversibilní změny v krevním obraze.

Dávkování: 30–40 mg.l⁻¹ (= cca 0,03–0,04 ml.l⁻¹) dobře rozmíchat v menším množství vody a teprve pak nalít do lázně. Používat vodu stejné kvality a teploty v jaké jsou ryby přechovávány. Do lázně vkládat ryby postupně. Anestezie nastupuje během 5–10 min. Rekonvalescence po přemístění do čisté vody je delší než u jiných anestetik.

Způsob použití: anestetická koupel pro ryby. Před aplikací anestetika je doporučena hladovka (tzn. vysadit krmení) po dobu 12–24 h.

Uchovávání a způsob skladování: skladovat v pevně uzavřené lahvi, na vzdušném místě při teplotě do 25 °C, chránit před mrazem.

Varování: Látka nebezpečná pro člověka! Dráždí oči a kůži. Výpary mohou způsobovat u jednotlivců stav nevolnosti. Dodržovat bezpečnost práce! Při vniknutí do oka provést výplach vodou a vyhledat lékaře! Manipulace může být prováděna pouze veterinárním lékařem nebo jím pověřenou osobou a s jeho odpovědností. Anestetickou lázeň je nutno likvidovat několikanásobným zředěním, nevypouštět do volné ani odpadní vody. Hřebíčkový olej je díky akutní toxicitě pro *Daphnia magna* označen rizikovou větou R51 (přípravek toxický pro vodní organismy).

Upozornění: nutný veterinární předpis „magistraliter“ – hřebíčkový olej jako farmaceutická surovina.

Ochranná lhůta: 500 stupňodnů.

LITERATURA

- Kolářová, J., Nepejchalová, L., 2006. Testování veterinárních léčivých přípravků pro ryby podle norem EU. *Veterinářství* 56 (1): 31–34.
- Kolářová, J., Svobodová, Z., Velíšek, J., Piačková, V., Hajšlová, J., Holadová, K., Kocourek, V., Klimánková, E., 2005. Effect of 2 anaesthetics (2-phenoxyethanol and clove oil) to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). In: Book of Abstracts 12 th Conference „Diseases of Fish and Shellfish“, 11–16 September 2005, Copenhagen, Denmark, p. 32.
- Nařízení komise EU č. 363/2011
- Velíšek, J., Svobodová, Z., 2004a. Anaesthesia of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with 2-phenoxyethanol: acute toxicity and biochemical blood profile. *Acta Veterinaria Brno* 73 (3): 379–384.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., 2004b. Anaesthesia of common carp (*Cyprinus carpio*) with 2-phenoxyethanol: acute toxicity and effects on biochemical blood profile. *Acta Veterinaria Brno* 73 (2): 247–252.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Piačková, V., 2005a. Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Veterinaria Brno* 74 (1): 139–146.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Piačková, V., Groch, L., Nepejchalová, L., 2005b. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Veterinarni Medicina* 50 (6): 269–275.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Piačková, V., 2006a. Vliv anestetika 2-phenoxyethanol na hematologický profil kapra (*Cyprinus carpio* L.) a pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Sborník 6. Konference: „Využití doplňkové a nekonvenční péče o zdraví zvířat“, JU České Budějovice, 115–119.
- Velíšek, J., Wlasow, T., Gomulka, P., Svobodová, Z., Novotný, L., Zíonek, E., 2006b. Effects of clove oil anaesthesia on European catfish (*Silurus glanis* L.). *Acta Veterinaria Brno* 75 (1): 99–106.
- Zákon na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992 Sb.

EXTERNÍ ODBORNÝ OPONENT

MVDr. Jiří Škaloud, CSc.

Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv

Hudcova 56a

621 00 Brno – Medlánky

Adresa autorského kolektivu

MVDr. Jitka Kolářová (kolarova@frov.jcu.cz), Prof. MVDr. Zdeňka Svobodová, DrSc., dr. hab Ing. Josef Velišek, Ph.D.,

Ing. Jana Máchová, Ph.D., prof. Ing. Jan Kouřil, Ph.D., Ing. Jitka Hamáčková, MVDr. Veronika Piačková, Ph.D.,

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod,

Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz,

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany

MVDr. Leona Nepechalová (nepechalova@USKVBL.CZ), Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů

a léčiv Brno, Hudcova 56a, 621 00 Brno – Medlánky

Prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc. (jana.hajslova@vscht.cz), Ing. Dr. Kateřina Holadová, doc. Ing. Vladimír Kocourek,

CSc., Ing. Eva Klímánková, Vysoká škola chemicko-technologická Praha, Ústav chemie a analýzy potravin,

Technická 5, 166 28 Praha 6

MVDr. Helena Modrá, Ph.D. (modrah@vfu.cz), MVDr. Radka Dobšíková, Ph.D., MVDr. Doc. MVDr. Ladislav Groch,

CSc., MVDr. Ladislav Novotný Ph.D., Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1–2, Brno

Vedíci Metodik (Technologická řada)

vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod,

Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany

Vydáno v roce 2012, aktualizované vydání z roku 2007, ISBN 978-80-85887-61-7 (1. vyd.)

redakce: Zuzana Dvořáková

Náklad: 200 ks

Grafický design a technická realizace: iDigitisk s. r. o.







FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

VYDÁNÍ PUBLIKACE BYLO USKUTEČNĚNO
ZA FINANČNÍ PODPORY PROJEKTU:

INOVACE PREZENČNÍHO STUDIA BAKALÁŘSKÉHO STUDIJNÍHO OBORU RYBÁŘSTVÍ

(CZ.1.07/2.2.00/15.0076)



ISBN 978-80-87437-44-5