

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Πειραματική μόλυνση τσιπούρας (*Sparus aurata*, L.) με τον ιό της
λεμφοκύστης (LCDV)»**

Σαγρής Βασίλειος

Βόλος 2017

«Πειραματική μόλυνση τσιπούρας (*Sparus aurata*, L.) με τον ιό της λεμφοκύστης (LCDV)»

Διμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1. Γκολομάζου Ελένη**, Επίκουρη Καθηγήτρια, Προστασία – Ευζωία Ιχθύων , Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, **Επιβλέπουσα**
- 2. Παναγιώτα Παναγιωτάκη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιεργειών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, **Μέλος**

Η επιστήμη μας έκανε θεούς πριν γίνουμε άξιοι να είμαστε άνθρωποι.

Jean Rostand (1894-1977)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα προπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά τη χρονική περίοδο 2016-2017.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια κα Ελένη Γκολομάζου για την καθολική βοήθεια της, τις πολύτιμες συμβουλές και το αμέριστο ενδιαφέρον της για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας αλλά και την προσπάθεια της να μετατρέψει τον νεανικό ζήλο σε επιστημονική πληρότητα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την κα Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Αναπληρώτρια καθηγήτρια για την πολύτιμη βοήθεια της, τη συμπαράσταση και τις εύστοχες παρατηρήσεις της τόσο κατά τη διάρκεια του πειράματος, αλλά και καθ'ολη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ιδιαίτερη μνεία αξίζει και ο Πιερ Ψωφάκης, υποψήφιος Διδάκτορας, για τις γνώσεις και την πρακτική εξάσκηση περί ενυδρειολογίας που με χαρά και επιμονή μετέφερε σε εμένα και την υπόλοιπη ομάδα που ασχολούμασταν από κοινού στο σταθμό ενυδρείων του Γεωπονικού τμήματος του ΠΘ.

Η οικογένεια αξίζει την κύρια αναγνώριση και ευγνωμοσύνη, καθώς είναι πάντα στο πλευρό μου, με ηθική και οικονομική στήριξη αλλά και ανιδιοτελή αγάπη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ασθένεια που οφείλεται στον ιό της λεμφοκύστης (LCDV) χαρακτηρίζεται από υπερτροφία των ινοβλαστικών κυττάρων στον συνδετικό ιστό. Στα εντατικά συστήματα εκτροφής, το ποσοστό προσβολής των ψαριών είναι αρκετά υψηλό με σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις. Η κάθετη και οριζόντια μετάδοση του ιού είναι επιβεβαιωμένη, ωστόσο οι πληροφορίες σχετικά με την περιγραφή των επιμέρους σταδίων εξέλιξης της ίωσης είναι περιορισμένες, καθώς επικεντρώνονται κυρίως σε περιπτώσεις φυσικά μολυσμένων πληθυσμών. Η παρούσα εργασία είναι πολυπαραγοντική, καθώς αρχικά πραγματοποιήθηκε πειραματική μετάδοση του ιού σε τσιπούρες υγιείς και σε τσιπούρες που είχαν νοσήσει στο παρελθόν, μέσω της συνύπαρξης με μολυσμένα ψάρια. Ταυτόχρονα διατηρήθηκαν υγιείς τσιπούρες, χωρίς την ύπαρξη μολυσματικού παράγοντα, ως η ομάδα του μάρτυρα. Οι υγιείς τσιπούρες που δεν είχαν νοσήσει στο παρελθόν αλλά μολύνθηκαν από τον ιό διαχωρίστηκαν σε τρεις μεταχειρίσεις ανάλογα τη διατροφή τους. Υπήρξαν 2 διαφορετικά ποσοστά αιθέριου ελαίου καννέλας (1% και 2%) και η πρότυπη διατροφή. Η εξέλιξη της μόλυνσης καταγραφόταν κάθε 15 μέρες, με τον εντοπισμό των χαρακτηριστικών οξιδίων του ιού, ενώ η θνησιμότητα καταγραφόταν καθημερινά. Επιπροσθέτως, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της Comet Assay, μια μέθοδος μέτρησης του κατακερματισμού του DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Μέσω αυτής της μεθόδου γίνεται δυνατή η εκτίμηση της βλάβης του DNA των κυττάρων, από τη γενοτοξική δράση του ιού. Οι μεταχειρίσεις με την πρόσθετη κανέλα είχαν παρόμοια πορεία στα ποσοστά προσβολής και θνησιμότητας. Μέχρι την 15^η ημέρα, είχαν παρουσιάσει το μέγιστο ποσοστό προσβολής (83-94 %) και η θνησιμότητα έφτασε το 1/6 του συνολικού πληθυσμού μέχρι και την 45^η ημέρα, παραμένοντας ύστερα σταθερή. Η

μεταχείριση με την πρότυπη διατροφή ακολούθησε διαφορετική πορεία, καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας (40%) καταγράφηκε μέχρι την 15^η ημέρα, ενώ μόνο το 22,5% των μολυσμένων ατόμων αυτοϊάθηκε και επιβίωσε. Η εξάπλωση των οξιδίων ήταν κυρίως στο ραχιαίο, πλευρικό και ουριαίο περύγιο των ψαριών, ενώ ήταν ισοκατανεμημένα στις ανατομικές περιοχές. Η μετάδοση του ιού δεν παρατηρήθηκε στα ψάρια της ομάδα του μάρτυρα και στις τσιπούρες που είχαν νοσήσει στο παρελθόν. Στα αποτελέσματα της Comet assay, μόνο η διατροφή με 2% κανελέλαιο είχε στατιστικά σημαντική διαφορά. Την ημέρα 30 καταγράφηκε υψηλότερη βλάβη του DNA σε σχέση με την 90^η – το τέλος το πειράματος. Περαιτέρω έρευνα απαιτείται σχετικά με τους μηχανισμούς απόκρισης του ξενιστή, καθώς τα μολυσμένα κύτταρα μπορεί να αντιδρούν μέσω μηχανισμών καταστροφής και επιδιόρθωσης του DNA εμπλέκοντας τον ρόλο των ιόν στην εξέλιξη των κυτταρικών μονοπατιών.

Λέξεις κλειδιά: Τσιπούρα, Λεμφοκύστη, Κανελέλαιο, Comet assay

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Υδατοκαλλιέργεια και ιχθυοπαθολογία.....	9
1.2 Η Τσιπούρα και η εκτροφή της στην Ελλάδα.....	10
1.3 Λεμφοκύστη.....	12
1.4 Αιθέριο έλαιο κανέλας.....	13
1.5 Ηθική χρήσης πειραματόζων.....	14
1.6 Σκοπός της εργασίας.....	15
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	16
2.1 Πειραματικός σχεδιασμός.....	16
2.2 Πρωτόκολλο Comet Assay.....	19
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	25
3.1 Ποσοστό προσβολής.....	25
3.2 Ποσοστά θνησιμοτήτων.....	25
3.3 Ένταση οξειδίων.....	27
3.4 Comet Assay.....	29
4. ΣΥΖΥΤΗΣΗ.....	30
5 . ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	33
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	34
6. ABSTRACT.....	37
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	39

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υδατοκαλλιέργεια και ιχθυοπαθολογία

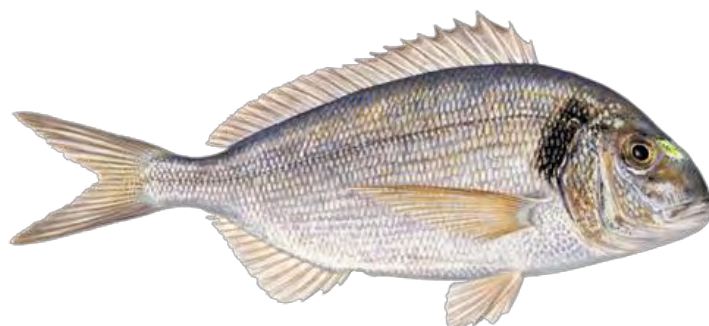
Η υδατοκαλλιέργεια αποτελεί τον ταχύτερα αναπτυσσόμενο τομέα προϊόντων διατροφής παγκοσμίως καθώς η εντατική εκτροφή ψαριών και οστρακοειδών είναι μια σχετικά νέα παραγωγική γραμμή. Οι λόγοι άνθησης της υδατοκαλλιέργειας είναι πολλοί, όπως η συνεχής αύξηση του παγκόσμιου ανθρώπινου πληθυσμού (10 δις το 2055), με αντίστοιχη αύξηση της ζήτησης καλής ποιότητας ζωική πρωτεΐνη ενώ ταυτόχρονα η αλιευτική παραγωγή παραμένει στάσιμη λόγω της έντονης αλιευτικής πίεσης αλλά και της μείωσης των ιχθυαποθεμάτων. Επίσης η τεχνολογική ανάπτυξη επιτρέπει την οικονομικά βιώσιμη λειτουργία και επέκταση των ιχθυοτροφικών μονάδων με ταυτόχρονη αύξηση της παραγωγής. Σε παγκόσμιο επίπεδο, η παραγωγή προϊόντων υδατοκαλλιέργειας έφτασε τους 73.800 τόνους το 2014, ενώ η ίδια χρονιά αποτέλεσε ορόσημο για την υδατοκαλλιέργεια καθώς για πρώτη φορά, η παραγωγή της ξεπέρασε σε ποσότητα τα προϊόντα της αλιευτικής παραγωγής, που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση (FAO 2016). Στην Ελλάδα, η υδατοκαλλιέργεια ξεκίνησε με τη δημιουργία και λειτουργία ενός κρατικού ιχθυογεννητικού σταθμού στις πηγές του ποταμού Λούρου το 1956, εμπλουτίζοντας τον ποταμό με πέστροφες (*Oncorhynchus mykiss*). Μετά το 1985 η υδατοκαλλιέργεια στην Ελλάδα άλλαξε πορεία και στράφηκε στην εντατική εκτροφή τσιπούρας (*Sparus aurata*) και λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) σε πλωτούς θαλάσσιους κλωβούς. Μια σημαντική κίνηση καθώς η χώρα έχει 16.000χλμ ακτογραμμής σε ένα ολιγοτροφικό υδάτινο περιβάλλον. Το 2015 η παραγωγή των υδατοκαλλιεργειών πανελλαδικά ήταν 105.987 τόνοι προϊόντων (87.289,7 τόνους στα ψάρια) με συνολική αξία 463.477,6 χιλιάδες ευρώ (455.941,7 χιλιάδες ευρώ στα ψάρια) - (ΕΛΣΤΑΤ 2016). Εύκολα διαπιστώνουμε ότι οι κύριες

οικονομικές αποδοχές προέρχονται από την ιχθυοκαλλιέργεια και κυρίως την τσιπούρα και το λαβράκι. Όλη αυτή η ραγδαία ανάπτυξη της ιχθυοτροφίας τα τελευταία 30 έτη ανέδειξε και νέες παθολογικές καταστάσεις με τις κυριότερες από αυτές να αφορούν την προσβολή από παράσιτα, παθογόνα βακτήρια και ιογενή νοσήματα όπως επίσης διατροφικά νοσήματα και νοσήματα που οφείλονται σε παράγοντες του περιβάλλοντος. Ο μεγάλος αριθμός των παραπάνω νοσημάτων καθιστά αναγκαία τη συστηματική μελέτη τους αλλά και την ανάπτυξη μεθόδων για την αντιμετώπιση τους. Με τον τρόπο αυτό αναπτύχθηκε και στην Ελλάδα ο τομέας της ιχθυοπαθολογίας. Η ιχθυοπαθολογία είναι απαραίτητη για την αντιμετώπιση πάσης φύσεως παθολογικών προβλημάτων στον κύκλο της αναπαραγωγής, εκτροφής και καλλιέργειας υδρόβιων οργανισμών, όπως επίσης και την προστασία της δημόσιας υγείας από ζωοανθρωπονόσους (Φώτης & Αγγελίδης 2003). Η ιχθυοπαθολογία στηρίζεται στην πρόληψη, την διάγνωση και τη θεραπεία των νοσημάτων, ενώ οι απαραίτητες προϋποθέσεις για την εκδήλωση παθολογικών καταστάσεων στα ψάρια είναι η παρουσία παθογόνου παράγοντα, η έλλειψη κατάλληλων συνθηκών διαβίωσης (υψηλή ιχθυοπυκνότητα) και το επίπεδο ευαισθησίας του ίδιου του οργανισμού (Πρακτικός οδηγός ιχθυοπαθολογίας, Υπουργείο Γεωργίας, 2000).

1.2 Η Τσιπούρα και η εκτροφή της στην Ελλάδα

Η τσιπούρα (*Sparus aurata* – Σπάρος ο χρυσόχρους) ανήκει στην οικογένεια των Sparidae (Linnaeus, 1758) και είναι ένας οστεϊχθύς που χαρακτηρίζεται από υψηλό και συμπίεσμένο πλευρικά σώμα, μεγάλα κτενοειδή λέπια, μοναδικό ραχιαίο πτερύγιο και ισόλοβο εγκοπτόμενο ουριαίο πτερύγιο. Διαβιεί στη Μεσόγειο, τον βόρειο ανατολικό Ατλαντικό ενώ έχει εντοπιστεί και στη Μαύρη Θάλασσα (Fishbase – *Sparus aurata*).

Είναι σαρκοφάγος ιχθύς και τρέφεται με ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς, πολύχαιτους, αμφίποδα, γαστερόποδα μαλάκια, καρκινοειδή και κατάλληλου μεγέθους ιχθύς. Είναι ευρύθερμο είδος με το βιολογικό θερμοκρασιακό εύρος του, να κυμαίνεται από 4 °C έως 30°C με μέγιστη τιμή ρυθμού ανάπτυξης του στους 22-24 °C, ενώ παράλληλα θεωρείται και ευρύαλο καθώς μπορεί να διαβιεί σε υφάλμυρα νερά, με τη μέγιστη ανάπτυξη του είδους να παρατηρείται σε 28 έως 32‰ αλατότητα (Παπουτσόγλου Σ., 2008). Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της τσιπούρας είναι ο πρωτανδρικός ερμαφροδιτισμός, με τα αρσενικά άτομα να ωριμάζουν γεννητικά το πρώτο ή δεύτερο έτος της ηλικίας τους και έπειτα να καθίστανται θηλυκά με την πλήρη ατροφία των αρσενικών γονάδων κατά το τρίτο και τέταρτο έτος. Το είδος χαρακτηρίζεται από πολύ γρήγορη ανάπτυξη με ιδιαίτερο οικονομικό ενδιαφέρον για τους εκτροφείς. Γενικά μια τσιπούρα 3 ετών μπορεί να φτάσει σε μήκος 40-45 εκ. και βάρος 600-800 γραμμ. σε υφάλμυρα νερά και 25-30 εκ. με βάρος 400-500 γραμμ. σε αλμυρά νερά (Γ. Χώτος, Ι. Ρογδάκης 1992). Κατά την εκτροφή τους όμως σε πλωτούς ιχθυοκλωβούς στην Ελλάδα, ιχθύδια τσιπούρας βάρους 5 γραμμ. φτάνουν το εμπορικό μέγεθος των 350-400 γραμμ. σε 16 μήνες με τη συνολική παραγωγή το 2015 να φτάνει τους 47.008 τόνους, οικονομικής αξίας 241.672 χιλιάδων ευρώ (FAO; ΕΛΣΤΑΤ 2016).



Εικόνα 1. Φωτογραφία τσιπούρας (*Sparus aurata*)

1.3 Λεμφοκύστη

Το νόσημα της λεμφοκύστης προκαλείται από ένα ευρέως διαδεδομένο ιριδιοί, τον ιό της λεμφοκύστης (Lymphoystis Disease Virus, LCDV). Ο LCDV, μολύνει περισσότερο από 125 είδη τελεόστεων γλυκών και θαλάσσιων υδάτων, με κύριο κλινικό σύμπτωμα την υπερτροφία των ινοβλαστικών κυττάρων στον συνδετικό ιστό και τη δημιουργία οζωδών αλλοιώσεων κυρίως στην επιδερμίδα και τα περύγια (Colbomi & Diamand, 1995). Η οζώδης αλλοίωση ή οζίδιο (Εικ. 2), αποτελεί ένα μοναδικό μολυσμένο από τον LCDV κύτταρο με διάμετρο μέχρι και ένα χιλιοστό (Paperna et al. 1982). Στα υπερτροφικά κύτταρα εμφανίζονται βασεόφιλα στο κυτταρόπλασμα, ενώ στο ώριμο στάδιο, περιβάλλονται από μια υαλώδη κάψουλα αποτελούμενη από θεικές και καρβοξυλικές γλυκοπρωτεΐνες (Sarasquete et al. 1998). Το χρώμα των οζιδίων είναι υπόλευκο και πολλές φορές σκουραίνει λόγω των χρωματοφόρων κυττάρων στον επιθηλιακό ιστό. Ο ιός της λεμφοκύστης έχει 9 διαφορετικούς γενοτύπους ανάλογα με τα είδη που μολύνει και όχι την γεωγραφική εξάπλωση (Hossain et al. 2008). Συγκεκριμένα η τσιπούρα της Μεσογείου ανήκει στον VII γενότυπο μαζί με την γλώσσα της Σενεγάλης (*Solea senegalensis*, Kaup 1858), (Cano et al. 2010). Ο ιός μεταφέρεται μέσω της άμεσης επαφής με άρρωστα ψάρια ενώ η κάθετη μετάδοση του ιού είναι επιβεβαιωμένη, αφού ο ιός εντοπίζεται στην επιφάνεια των αυγών (Cano et al. 2013). Κατά τη διάρκεια εμφάνισης των συμπτωμάτων του ιού τα ψάρια παρουσιάζουν χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης, που πιθανολογείται στην αναιμία, ένα χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου ιού (Nishida et al. 1998). Ο ιός σπάνια είναι θανατηφόρος αλλά προκαλούνται θνησιμότητες στα άτομα των οποίων η κίνηση, η αναπνοή ή η τροφοληψία καθίσταται αδύνατη λόγω μεγάλου αριθμού και μεγέθους οζιδίων στα επιμέρους όργανα (Colbomi & Padros 2011). Επίσης παρατηρείται θνησιμότητα από

δευτερογενείς βακτηριακές λοιμώξεις (Flugel R.H., 1985). Η νόσος προκαλεί σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις στις εταιρίες ιχθυοκαλλιεργειών λόγω των θνησιμοτήτων αλλά και της αδυναμίας πώλησης των ιχθύων με τα χαρακτηριστικά οζίδια (Masoero et al. 1986).



Εικόνα 2. Τσιπούρες του πειράματος με οζίδια

1.4 Αιθέριο έλαιο κανέλας

Τα αιθέρια έλαια είναι πτητικές, φυσικές ενώσεις που απομονώνονται από αρωματικά φυτά με διάφορους τρόπους απόσταξης. Χαρακτηρίζονται από ισχυρή οσμή και είναι γνωστά για τις αντισηπτικές και φαρμακευτικές ιδιότητες (Bakkali et al. 2008). Η κανέλα είναι ένα μπαχαρικό, που προέρχεται από τον εσωτερικό φλοιό μερικών ειδών του γένους Κιννάμωμον (*Cinnamomum*) μια ομάδα αειθαλών αρωματικών δέντρων και θάμνων. Ένα από αυτά τα είδη είναι το Κιννάμωμον το γνήσιον (*Cinnamomum zeylanicum*) ή αλλιώς καννέλα Κεϋλάνης. Η καννέλα Κεϋλάνης είναι γνωστή για το κύριο συστατικό της, την κινναμαλδεϋδη, η οποία είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αρωματική ένωση με αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δράση

(Molania et al. 2012; Verlinden et al. 2013; Chao et al. 2008). Διάφορα νοσήματα στα εκτρεφόμενα ψάρια προκαλούν οικονομική ζημιά στις ιχθυοκαλλιέργειες και η συνεχή χρήση αντιβιοτικών και άλλων φαρμακευτικών σκευασμάτων ρυπαίνει το περιβάλλον επηρεάζοντας ζώα και ανθρώπους (Baskaralingam & Rajagopalan 2014). Το αιθέριο έλαιο καννέλας θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως αντιμικροβιακό και ανοσοενισχυτικό σκεύασμα, μειώνοντας τη χρήση αντιβιοτικών στην ιχθυοκαλλιέργεια (Elok et al. 2014)

1.5 Ηθική χρήσης πειραματόζωων

Η χρήση ζώων στις πειραματικές διαδικασίες είναι ένα πολυδιάστατο θέμα. Ξεκίνησε από τον 4^ο αιώνα π.Χ., με τον Αριστοτέλη να χρησιμοποιεί ζώα για την καταγραφή των δομών και των λειτουργιών τους, δημιουργώντας την πρώτη συλλογή βιβλίων με αυτή τη θεματολογία, Τῶν περὶ τὰ ζῶα ἱστοριῶν. Πολλά χρόνια αργότερα, και μετά την έκδοση του βιβλίου *Origin of Species* το 1859 από τον Κάρολο Δαρβίνο, αυξήθηκαν τα πειράματα με ζώα καθώς υπερασπιζόταν τις βιολογικές ομοιότητες των ζώων και των ανθρώπων (Baumans, 2004). Σήμερα πληθώρα πολιτών απαιτεί την διακοπή χρήσης πειραματόζωων, ενώ ταυτόχρονα απολαμβάνει τα αποτελέσματα των πειραμάτων στην καθημερινότητα. Η ορθή επιστημονική πρακτική ορίζει τη χρήση πειραματόζωων εάν δεν υπάρχει άλλη λύση, ενώ ταυτόχρονα τη χρήση του εν δυνάμει μικρότερου αριθμού ζώων. Η ευημερία (welfare) και η εξάλειψη του πόνου μέσω της χρήσης αναισθητικών για την θανάτωση είναι απαραίτητη προϋπόθεση κανονισμών και οδηγιών της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Προεδρικό Διάταγμα 160/1991, Οδηγία 2010/63/ΕΕ). Στη παρούσα πειραματική διαδικασία τα πειραματόζωα διαβιούσαν σε μεγάλα ενυδρεία

με συστήματα καθαρισμού και οξυγόνωσης του νερού, ταΐζόντουσαν επαρκώς και η θανάτωση τους έγινε με χρήση υπερβολικής δόσης αναισθητικού.

1.6 Σκοπός της εργασίας

Η συγκεκριμένη εργασία αποσκοπεί στην καταγραφή των σταδίων εξέλιξης του ιού με πειραματική μόλυνση καθώς οι προηγούμενες μελέτες πραγματοποίησαν δειγματοληψίες σε φυσικά μολυσμένους πληθυσμούς. Παράλληλα η εργασία αποσκοπεί στην εξαγωγή δεδομένων ποσοστού προσβολής, θνησιμότητας και έντασης της νόσου με οπτική ποσοτικοποίηση των οζιδίων ανά ανατομική περιοχή του σώματος. Επιπλέον γίνεται χρήση του πρωτόκολλου Comet assay για την ανίχνευση της γενετοξικότητας του ιού. Γενικότερος σκοπός είναι η συσχέτιση των παραπάνω αποτελεσμάτων με τη χρήση κανελέλαιου στη διατροφή των ψαριών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Το συγκεκριμένο πείραμα διεξήχθη στο Σταθμό Ενυδρείων (TOLL) του Τμήματος Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και διήρκησε 3 μήνες (90 days) από τις 18/11/2016 μέχρι και την 23/02/17. Στο Toll (Εικ. 3), ένα κλειστό και κλιματιζόμενο χώρο, τα ενυδρεία που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κατασκευασμένα από ακρυλικό υλικό Plexiglass©, είχαν επαρκή οξυγόνωση με αντλίες αέρα, και ο καθαρισμός του νερού πραγματοποιούταν από 3 διαφορετικά μηχανικά φίλτρα διήθησης (συνθετικό μαλλί, σπόγγος, κεραμικά υλικά βιολογικής διήθησης). Η αλατότητα του νερού ήταν 33 ± 1 ‰, ενώ η φωτοπερίοδος ρυθμίστηκε σε 12 ώρες φωτός/ 12 ώρες σκότους. Πραγματοποιήθηκαν περιοδικές μετρήσεις της ποιότητας του νερού (αμμωνία, νιτρικά, νιτρώδη), για την διασφάλιση της ορθής διαβίωσης των ιχθύων.



Εικόνα 3. Εξωτερική όψη Toll

Οι ιχθύες – τσιπούρες εισήχθησαν στα ενυδρεία, από ιχθυογεννητικό σταθμό με ιστορικό στον ιό της λεμφοκύστης. Μετά από μια απαραίτητη περίοδο εγκλιματισμού διαχωρίστηκαν στις εξής ομάδες:

1. Τσιπούρες μεγέθους 2g με ύπαρξη μολυσματικού παράγοντα
2. Τσιπούρες μεγέθους 15g που είχαν νοσήσει από LCDV και αυτοϊαθεί στο παρελθόν σε συνύπαρξη με μολυσμένα ψάρια.
3. Τσιπούρες μεγέθους 2g χωρίς την ύπαρξη μολυσματικού παράγοντα (μάρτυρας).

Η πρώτη ομάδα διαχωρίστηκε σε 3 διαφορετικές μεταχειρίσεις ανάλογα με την τροφή που τους παρεχόταν:

- I. Πρότυπη τροφή τσιπούρας (M)
- II. Εμπλουτισμένη τροφή τσιπούρας με 1% κανελέλαιο (K1)
- III. Εμπλουτισμένη τροφή τσιπούρας με 2% κανελέλαιο (K2)

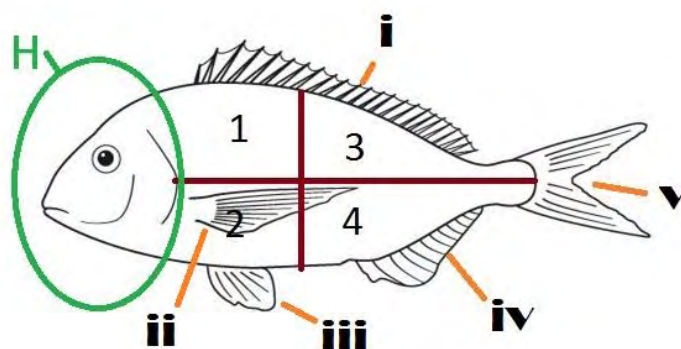


Εικόνα 4. Τα ενυδρεία στο TOLL

Ο τρόπος μόλυνση των υγείων ψαριών ήταν η συνύπαρξη με μολυσμένα άτομα καθώς η οριζόντια μετάδοση του ιού με άμεση επαφή μέσω του δέρματος και των βραγχίων είναι επιβεβαιωμένη (Bowser et al. 1999). Η καταγραφή της εξέλιξης της μόλυνσης, δηλαδή η καταμέτρηση των οζιδίων, γινόταν κάθε 15 ημέρες, ενώ η καταγραφή της θνησιμότητας ήταν καθημερινή. Οι μετρήσεις βάρους, μήκους και εξέλιξης της νόσου των ψαριών, όπως και η θανάτωση τους για την περαιτέρω διαδικασία της μεθόδου Comet assay, πραγματοποιούνταν πάντα με τη χρήση αναισθητικού (φαινοξυαιθυλο-αλκοόλη) για τον καλύτερο χειρισμό των ιχθύων, τη μείωση του στρες και την εκπλήρωση των ηθικών κανονισμών πειραμάτων με ζώα.

Οι τσιπούρες μεγέθους 15 γραμμαρίων προήλθαν από ιχθυογεννητικό σταθμό με ιστορικό στον ιό της λεμφοκύστης. Μολύνθηκαν στο παρελθόν από τον ιό, εμφανίζοντας τα συμπτώματα, αυτοιάθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της πιθανότητας επαναμόλυνσης.

Για να γίνει δυνατή η οπτική ποσοτικοποίηση των οζιδίων, δημιουργήθηκε η εικόνα 5, όπου με αραβικούς αριθμούς εμφανίζονται οι ανατομικές περιοχές (1, 2, 3, 4, H) και με λατινικούς αριθμούς τα πτερύγια (i - Ραχιαίο, ii - Πλευρικό, iii - Κοιλιακό, iv - Εδρικό, v - Ουραίο)



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση των ανατομικών περιοχών

2.2 Πρωτόκολλο Comet Assay

Το πρωτόκολλο της Comet assay είναι μια μέθοδος μέτρησης της θραύσης των κλώνων της αλυσίδας δεσοξυριβονουκλεϊνικού οξέος (DNA) στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η κύρια χρήση αυτής της μεθόδου είναι η εκτίμηση της βλάβης του DNA των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν και συνεπώς του ιστού – οργανισμού που μελετάμε. Η αρχική τεχνική εφευρέθηκε από τους Ostling and Johanson το 1984, και χρησιμοποιείται σήμερα παγκοσμίως ως εργαλείο γενετοξικότητας και γενικότερης ανίχνευσης βλαβών στο DNA που προκαλούνται από τις ιονίζουσες ακτινοβολίες, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, τις ελεύθερες ρίζες, τους αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs), διάφορες χημικές ουσίες και τα βαρέα μέταλλα (Olive et al. 1993; Tice R. 1995; Salagovic et al 1996). Η ονομασία της τεχνικής προέρχεται από το στάδιο παρατήρησης των κυττάρων, τα οποία ομοιάζουν με κομήτες. Ο κομήτης που παρατηρείται κατά την ανάλυση της εικόνας αποτελείται από κεφαλή και ουρά. Η περιοχή της κεφαλής αντιπροσωπεύει το DNA που παρέμεινε στον πυρήνα, ενώ η ουρά είναι τα θραύσματα του DNA που εξήχθησαν από την κυτταρική μεμβράνη. Η εφαρμογή της μεθόδου πραγματοποιείται σε αλκαλικό περιβάλλον (pH>7 αгарόζη, pH>10 ηλεκτροφόρηση). Υπάρχουν πολλά βήματα για την ολοκλήρωση αυτής της τεχνικής και τα πιο βασικά είναι η δειγματοληψία, η προετοιμασία των δειγμάτων στο εργαστήριο, η ηλεκτροφόρηση, η παρατήρηση και καταγραφή των κομητών στο φθορίζον μικροσκόπιο και τέλος η ανάλυση των δεδομένων.

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα ηπατικά κύτταρα από τις τσιπούρες και ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Δειγματοληψία

Οι δειγματοληψίες διεξήχθησαν στο χώρο των ενυδρείων, με τυχαία επιλογή ψαριών, από κάθε ενυδρείο διαφορετικής ομάδας. Μετά από την ελαφριά αναισθησία των ψαριών μέσα σε κουβά, θανατώθηκαν με κοπή του νωτιαίου μυελού και έγινε μια τομή στην κοιλιακή χώρα. Ύστερα εξήχθη το ήπαρ και τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου «Falcon» που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμά HBSS (Hank's salt solution). Έπειτα τοποθετήθηκαν πάνω στο πάγο μέχρι να μεταφερθούν στο εργαστήριο για την απομόνωση των ηπατοκυττάρων.

Προετοιμασία των δειγμάτων

Κατόπιν στο εργαστήριο, ο ιστός καθαρίστηκε από διάφορα υπολείμματα με διαδοχικές πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμά HBSS και εφαρμόστηκαν ενέσεις κολλαγονάσης (CLS, type I) συγκέντρωσης 0,04% για την αφομοίωση του ιστού του ήπατος. Ο ιστός τεμαχίστηκε και μεταφέρθηκε σε καινούριο δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με HBSS και κολλαγονάση και τοποθετήθηκαν στη φυγόκεντρο με 4000 στροφές για πέντε λεπτά. Ύστερα το δείγμα διηθήθηκε με αποστειρωμένη γάζα και ακολούθησε ξανά φυγοκέντριση με τις ίδιες ρυθμίσεις. Μετά την φυγοκέντριση αφαιρέθηκε το υγρό υπερκείμενο με τη χρήση πιπέτας από τους σωλήνες και προστέθηκε HBSS στο εναπομένον απόθεμα. Ακολούθησαν δύο παρόμοιες εκπλύσεις και στο τέλος προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate-buffered saline) αντί του HBSS.

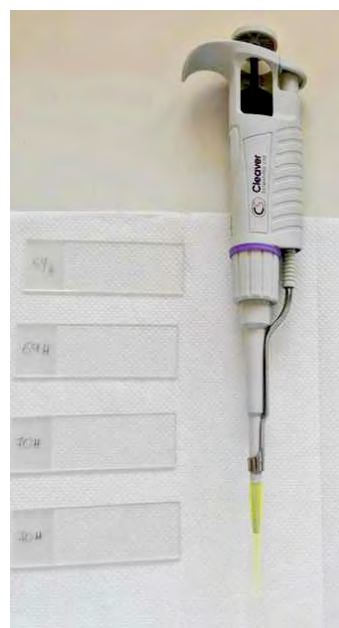
Στη συνέχεια ακολούθησε η επίστρωση της αгарόζης σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες καταψύχθηκαν στους -20°C για 20 λεπτά αφού προηγουμένως είχαν εμβαπτισθεί σε αιθανόλη.

Επόμενο στάδιο, ήταν η προετοιμασία δύο διαφορετικών πηκτωμάτων αγαρόζης. Το πρώτο διάλυμα αγαρόζης (NMP - Normal Melting Point) συγκέντρωσης 0,5%, παρασκευάστηκε σε διάλυμά PBS. Μετά την ομογενοποίηση του, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για 5 λεπτά μέχρι να γίνει διαυγές. Ταυτόχρονα, αφαιρέθηκαν οι αντικειμενοφόρες πλάκες από την κατάψυξη και εμβαπτίστηκαν στη ζεστή αγαρόζη (>60°C) για σύντομο χρονικό διάστημα, ώστε να επικαθήσει στην κρύα και καθαρή επιφάνεια της. Το κάτω μέρος του πλακιδίου καθαρίστηκε από την αγαρόζη και τοποθετήθηκαν σε πάγο για να στεγνώσουν.

Το δεύτερο διάλυμα αγαρόζης (Low Melting Point) συγκέντρωσης 0,07% σε PBS παρασκευάστηκε με παρόμοιο τρόπο. Όταν έφτασε σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν 20μl του δείγματος με τα ηπατικά κύτταρα σε 80μl αγαρόζης (LMP) και τοποθετήθηκαν στην αντικειμενοφόρο πλάκα που ήταν ήδη καλυμμένη με το πρώτο πήκτωμα αγαρόζης. Από πάνω τοποθετήθηκε καλυπτρίδα για την διατήρηση της θέσης του LMP, η οποία μετά την πήξη του, αφαιρέθηκε.



Εικόνα 6. Φυγόκεντρος με τα δείγματα



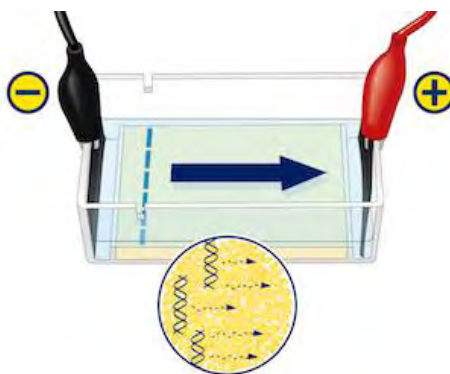
Εικόνα 7. Προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών

LYSIS BUFFER

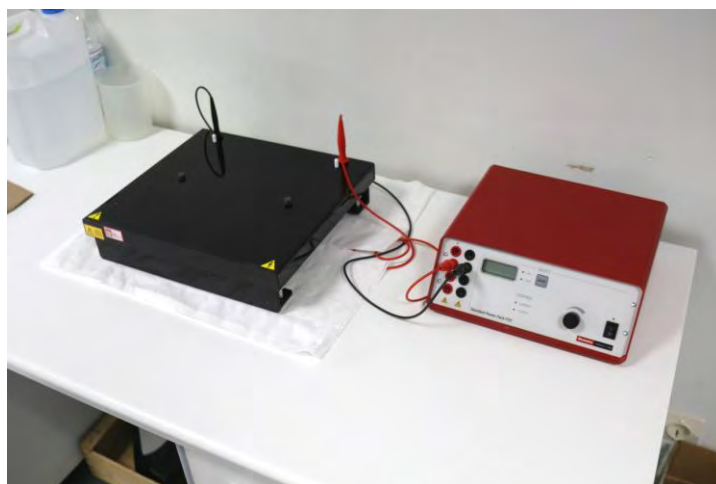
Στη συνέχεια, η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε σε διάλυμα λύσης- lysis buffer- (EDTA 100mM, Tris 10mM, 1% Triton-X 100, NaCl 2,5M και 10% DMSO-dimethyl sulfoxide) και το pH ρυθμίστηκε με HCl ή NaOH πάνω από 10. Η αντικειμενοφόρος πλάκα παρέμεινε στο διάλυμα λύσης για τουλάχιστον τέσσερις ώρες και ύστερα ξεπλύθηκε με απεσταγμένο νερό. Λόγω του διαλύματος, επήλθε η λύση της πλασματικής μεμβράνης των ηπατικών κυττάρων και η απελευθέρωση του γενετικού υλικού.

Ηλεκτροφόρηση

Ακολουθεί η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, δηλαδή μια μέθοδος διαχωρισμού ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων όπως το νουκλεϊκής φύσης DNA. Σε μια συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (Εικ. 9) τοποθετήθηκε διάλυμα 1,5 λίτρων, παρασκευασμένο από 0,075 M NaOH και 1 mM EDTA σε απεσταγμένο νερό με pH < 12,1. Μετά τη συγκέντρωση 10 επιστρωμένων αντικειμενοφόρων πλακών εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα και η συσκευή ενεργοποιήθηκε με ρυθμίσεις 30V και 300mA για 15 λεπτά. Κατόπιν με ουδέτερο διάλυμα Tris (συγκέντρωσης 0,4M και pH 7,5) οι αντικειμενοφόρες πλάκες εκπλύθηκαν για την απομάκρυνση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτροφόρησης



Εικόνα 8. Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης

Καταγραφή κομητών

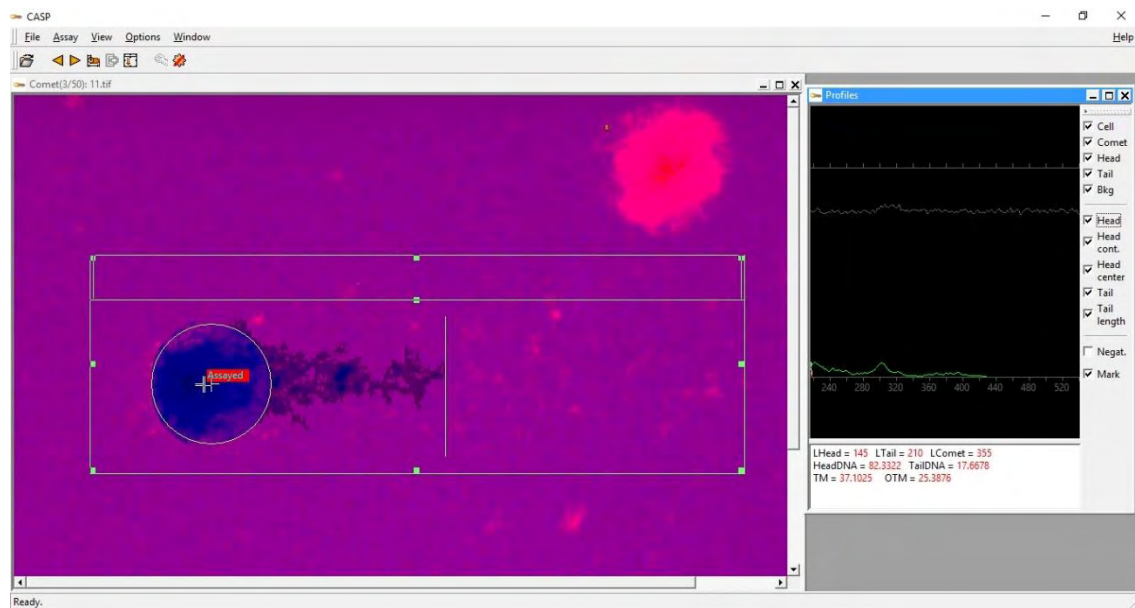
Στις αντικειμενοφόρες πλάκες μετά την ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε χρώση με 20μL βρωμούχου αιθιδίου (EtBr) έκαστη, μια ουσία που παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA και φθορίζει στο υπεριώδες φως. Έτσι δύναται η λεπτομερής προβολή και καταγραφή των θραυσμάτων DNA. Η παρατήρηση και καταγραφή των κομητών έγινε σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axiostar plus), σε μεγέθυνση 40x. Συλλέχθηκαν τυχαία 100 εικόνες κυττάρων-κομητών από κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα. Η καταγραφή έγινε με βιντεοκάμερα υψηλής ανάλυσης και το λογισμικό ProgRes Capture Pro 2.1. (Εικ. 9).



Εικόνα 9. Ηλεκτρονικά συστήματα καταγραφής κομητών

Ανάλυση δεδομένων

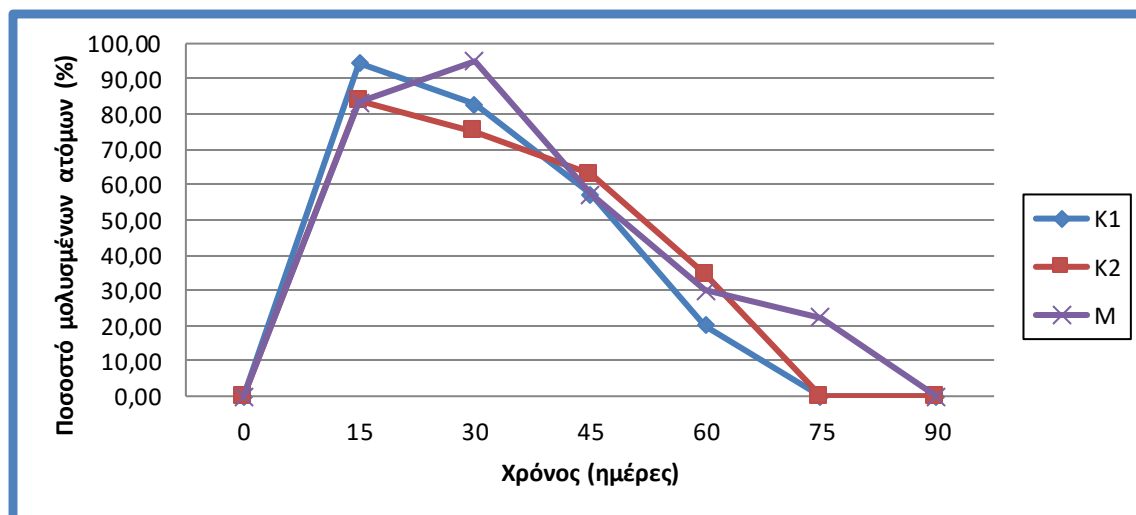
Για τον υπολογισμό των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Comet Assay Software Project – CASP όπως φαίνεται και στην Εικόνα 10 (Konca et al., 2002). Για την εκτίμηση του ποσοστού των θραυσμάτων DNA, υπολογίστηκε το Tail Moment, δηλαδή το γινόμενο του μήκους της ουράς, επί το ποσοστό του DNA στην ουρά του κομήτη. Η τιμή αυτή συσχετίζεται με την βλάβη του DNA και την πιθανή γενοτοξικότητα του ιού της λεμφοκύστης. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων τα πραγματοποιήθηκε με τα λογισμικά SPSS statistic 17.0 και το Excel 2016 της Microsoft.



Εικόνα 10. Λογισμικό καταγραφής κομητών -CASP

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ποσοστό προσβολής

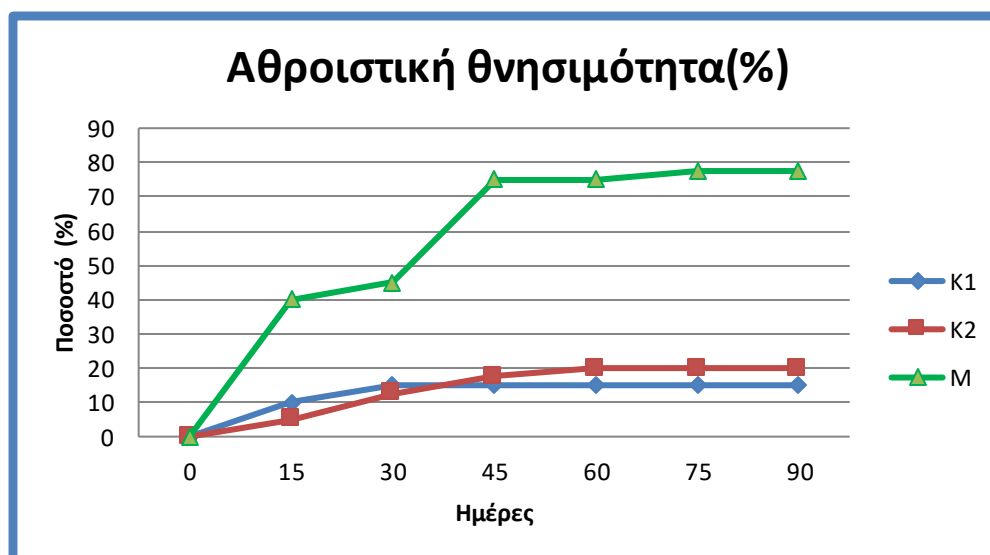


Σχήμα 1. Μεταβολή της τιμής μολυσμένων ατόμων σε συνάρτηση με το χρόνο (ημέρες) – ποσοστό προσβολής (%).

Στο σχήμα 1 φαίνεται το ποσοστό προσβολής κάθε διαφορετικής διατροφής (K1,K2,M). Το μέγιστο ποσοστό προσβολής εμφανίστηκε στη διατροφή M (95%) μεταξύ της 15^{ης} και 30^{ης} ημέρας. Τα ψάρια με την διατροφή K1 και K2 ακολούθησαν παρόμοια πορεία μόλυνσης, και μέχρι την 15^η ημέρα έφτασαν στο ζενίθ της μόλυνσης ενώ την 75^η δεν υπήρχαν άτομα με συμπτώματα. Με τη διατροφή M αντίθετα, η πορεία της μόλυνσης καθυστέρησε να μεταδοθεί αλλά και να ξεπεραστεί καθώς δεν υπήρχαν άτομα με συμπτώματα μεταξύ της 75^{ης} και 90^{ης} ημέρας.

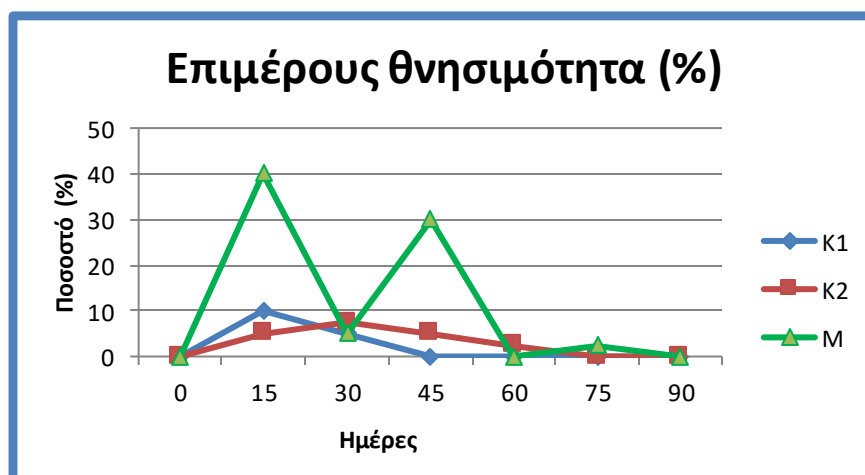
3.2 Ποσοστά θνησιμοτήτων

Η θνησιμότητα καταγραφόταν καθημερινά με την καταμέτρηση και αφαίρεση των νεκρών ψαριών από τα ενυδρεία.



Σχήμα 2. Μεταβολή του συνόλου νεκρών ψαριών σε συνάρτηση με το χρόνο (ημέρες) - αθροιστική θνησιμότητα (%).

Στο σχήμα 2 φαίνεται η αθροιστική θνησιμότητα των ψαριών ανάλογα με τη διατροφή (K1, K2, M). Η μεταχείριση M ακολουθεί εντελώς διαφορετική πορεία σε σχέση με τις άλλες δύο (K1, K2) καθώς η μέγιστη τιμή θνησιμότητας ήταν 78%. Επιβίωσε δηλαδή μόνο το 22% του συνολικού πληθυσμού. Αντίθετα τα ψάρια των ενυδρείων που τρεφόντουσαν με κανελέλαιο είχαν σταδιακά αυξανόμενο ποσοστό θνησιμότητας και υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης (K1=85%, K2=80%).



Σχήμα 3. Επιμέρους θνησιμότητα (%) διαφορετικής διατροφής (K1, K2, M) μεταξύ των δειγματοληπτικών ημερών (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90).

Στο συγκεκριμένο σχήμα παρατηρείται η συνολική θνησιμότητα μεταξύ των δειγματοληπτικών ημερών. Στην Μ μεταχείριση, μεταξύ της 1^{ης} και 30^{ης} ημέρας καταγράφηκε το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας 40%. Επίσης υπήρξαν δύο διαφορετικές κορυφές (peaks) της θνησιμότητας με τη δεύτερη να φτάνει το 30% των ψαριών. Η αθροιστική και επιμέρους θνησιμότητα συσχετίζονται άμεσα.

3.3 Ένταση οξιδίων

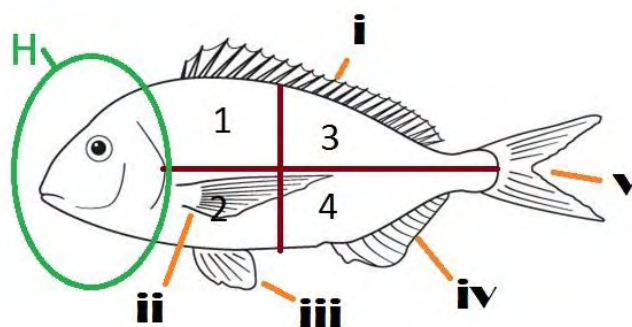
K1		Day 15	Day 30	Day 45	Day 60	Day 75	Day 90
Σώμα	Σώμα 1	38,7	45,8	25,0	40,0	0,0	0,0
	Σώμα 2	35,3	20,8	50,0	20,0	0,0	0,0
	Σώμα 3	35,3	29,2	41,7	0,0	0,0	0,0
	Σώμα 4	26,5	16,7	41,7	20,0	0,0	0,0
Πτερύγια:	Ραχιαίο	32,4	45,8	41,7	20,0	0,0	0,0
	Πλευρικό	17,6	33,3	58,3	80,0	0,0	0,0
	Κοιλιακό	2,9	12,5	8,3	20,0	0,0	0,0
	Εδρικό	5,9	12,5	25,0	60,0	0,0	0,0
	Ουραίο	11,8	37,5	41,7	60,0	0,0	0,0
	Κεφάλι	26,5	50,0	33,3	60,0	0,0	0,0

Σχήμα 4. Ένταση οξιδίων ανά ανατομική περιοχή της μεταχείρισης K1

Με τη χρήση της εικόνας 5 και τους πίνακες ανά μεταχείριση (K1, K2, M), καθίσταται δυνατή η οπτική ποσοτικοποίηση των οξιδίων (ένταση) σε κάθε ανατομική περιοχή και πτερύγιο. Οι τιμές στους πίνακες είναι τα ποσοστά των ψαριών που εμφάνισαν οξίδια προς τα μολυσμένα άτομα.

K2		Day 15	Day 30	Day 45	Day 60	Day 75	Day 90
Σώμα	Σώμα 1	35,3	16,7	35,3	44,4	0,0	0,0
	Σώμα 2	20,6	20,8	41,2	33,3	0,0	0,0
	Σώμα 3	32,4	33,3	29,4	44,4	0,0	0,0
	Σώμα 4	29,4	29,2	35,3	22,2	0,0	0,0
Πτερόγυια:	Ραχιαίο	35,3	37,5	52,9	66,7	0,0	0,0
	Πλευρικό	38,2	29,2	41,2	55,6	0,0	0,0
	Κοιλιακό	2,9	8,3	11,8	11,1	0,0	0,0
	Εδρικό	8,8	8,3	23,5	33,3	0,0	0,0
	Ουραίο	23,5	20,8	29,4	88,9	0,0	0,0
	Κεφάλι	23,5	12,5	17,6	11,1	0,0	0,0

Σχήμα 5. Ένταση οξιδίων ανά ανατομική περιοχή της μεταχείρισης K2



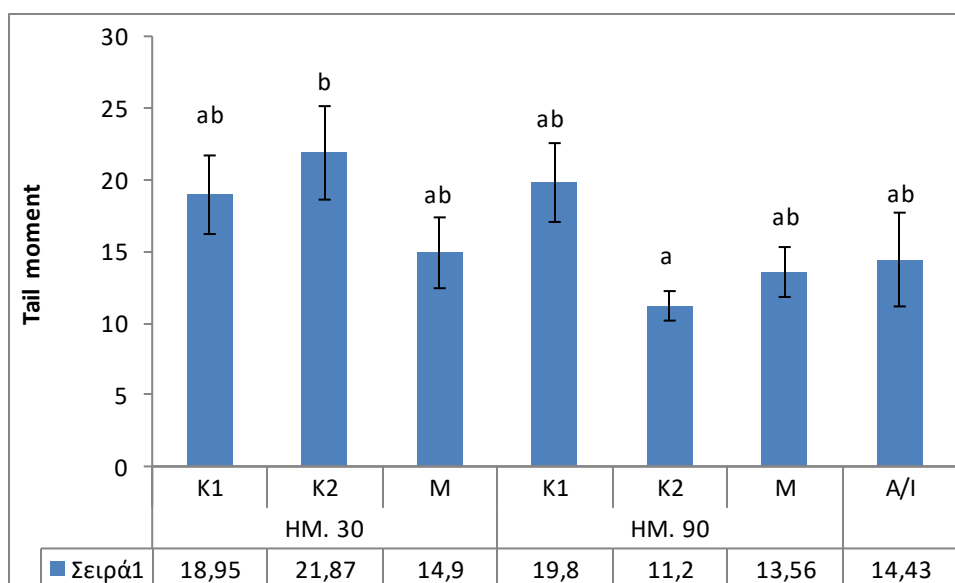
Εικόνα 5 (επανάληψη). Σχηματική αναπαράσταση των ανατομικών περιοχών

M		Day 15	Day 30	Day 45	Day 60	Day 75	Day 90
Σώμα	Σώμα 1	15,0	36,8	12,5	0,0	0,0	0,0
	Σώμα 2	30,0	31,6	25,0	33,3	0,0	0,0
	Σώμα 3	20,0	10,5	25,0	33,3	100,0	0,0
	Σώμα 4	35,0	21,1	25,0	33,3	50,0	0,0
Πτερόγυια:	Ραχιαίο	40,0	42,1	37,5	33,3	50,0	0,0
	Πλευρικό	40,0	36,8	25,0	66,7	100,0	0,0
	Κοιλιακό	5,0	10,5	0,0	0,0	50,0	0,0
	Εδρικό	10,0	10,5	12,5	33,3	100,0	0,0
	Ουραίο	25,0	31,6	25,0	66,7	100,0	0,0
	Κεφάλι	15,0	15,8	12,5	33,3	50,0	0,0

Σχήμα 6. Ένταση οξιδίων ανά ανατομική περιοχή της μεταχείρισης M

3.4 Comet Assay

Για την εκτίμηση της βλάβης του DNA χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος Tail Moment, που είναι το γινόμενο του μήκους της ουράς, επί το ποσοστό του DNA στην ουρά του κομήτη.



Σχήμα 7. Αποτελέσματα Comet assay, Tail moment την ημέρα 30 και την ημέρα 90 ανά μεταχείριση. A/I Τσιπούρες που είχαν μολυνθεί και αυτοϊαθεί στο παρελθόν

Στο σχήμα X παρατηρείται ότι οι μεταχειρίσεις K1 και M, δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά την ημέρα 30 και την ημέρα 90. Αντίθετα, στη μεταχείριση με πρόσθετο κανελέλαιο 2%, η αρχική βλάβη του DNA ήταν η υψηλότερη (TM= 21,87) και την ημέρα 90 ήταν η χαμηλότερη (TM= 11,2) σε σχέση με τις τιμές των άλλων μεταχειρίσεων. Η τελευταία στήλη (A/I) είναι η ομάδα των τσιπουρών που είχαν νοσήσει στο παρελθόν από τον ιό της λεμφοκύστης. Και σε αυτή την ομάδα δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά με την K1 και την πρότυπη M μεταχείριση. Να παρατηρηθεί ότι οι συγκεκριμένοι ιχθύς δεν εμφάνισαν ξανά τον ιό ακόμα και αν ήταν σε επαφή με τα άρρωστα ψάρια.

4. ΣΥΖΥΤΗΣΗ

Για τον χειρισμό των ιογενών νοσημάτων στην υδατοκαλλιέργεια χρειάζεται καλή γνώση της φύσης του ίδιου του ιού αλλά και των βιολογικών ιδιοτήτων του ψάρι-ξενιστή από πολλές και διαφορετικές επιστημονικές προσεγγίσεις (Hossain & Oh, 2011). Υπάρχουν πολλοί ερευνητές παγκοσμίως που ασχολούνται με την ανίχνευση, μετάδοση, ανοσοαπόκριση, ιστοπαθολογία και φυλογένεση του ιού της λεμφοκύστης. Στην Μεσογειακή περιοχή, η λεμφοκύστη είναι η πιο συχνή ίωση της εκτρεφόμενης τσιπούρας (Paperna et al. 1982; Masoero et al. 1986) και η βιβλιογραφία αυξήθηκε αρκετά τα τελευταία χρόνια. Δεν υπάρχει ακόμα εμβόλιο κατά του ιού, αλλά υπάρχουν τρόποι ανίχνευσης του, πριν εμφανιστούν τα συμπτώματα. Οι Cano et al. (2007) ανέπτυξαν μια ευαίσθητη τεχνική για την ανίχνευση του ιού, αξιοποιώντας την PCR και την υβριδοποίηση των νουκλεϊκών οξέων (Dot blot), καταφέροντας να ανιχνεύσουν σε ασυμπτωματικούς φορείς τον ιό χωρίς να θανατώνονται τα ψάρια. Η έλλειψη όμως πληροφοριών στην εξέλιξη του ιού, από πειραματική μόλυνση, οδήγησε στην εκπόνηση αυτής της μελέτης. Τα μολυσμένα άτομα από τον LCDV εμφανίζουν μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης και είναι πιο ευαίσθητα στη δευτερογενή βακτηριακή λοίμωξη (Cano et al 2013). Το δραστικό συστατικό του ελαίου της καννέλας, η κεναλδεΐδη, με τις αντιμικροβιακές της ιδιότητες μείωσε πιθανότατα αυτές τις βακτηριακές λοιμώξεις (Elok Ning Faikoh et al. 2014). Τα κύρια βακτήρια που είναι γνωστό ότι μολύνουν την τσιπούρα είναι τα *Pseudomonas* spp. και του γένους *Vibrio*, τα *V. alginolyticus*, *V. harveyi* και *Photobacterium damsela* ssp. *Piscicida* (Zorrilla et 2003). Τα περισσότερα από αυτά τα βακτήρια βρίσκονται στη μικροπανίδα του νερού και υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να μολύνανε τα ψάρια όλων των μεταχειρίσεων. Εκείνα όμως που τρεφόντουσαν με την διατροφή K (κανελέλαιο 1% και 2%), εμφάνισαν μικρότερα

ποσοστά θνησιμότητας. Με τον συνδυασμό των αποτελεσμάτων του ποσοστού προσβολής, θνησιμότητας και της αντιμικροβιακής δράσης του κανελέλαιου πιθανόν προκύπτει ότι ο ιός μολύνει το μεγαλύτερο μερίδιο των ατόμων ανεξάρτητα από τη διατροφή ενώ το κανελέλαιο βοήθησε στη μείωση της θνησιμότητας ενισχύοντας το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών.

Από την βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι οι οζώδεις αλλοιώσεις της νόσου του ιού της λεμφοκύστης καταγράφονται κυρίως στην επιδερμίδα και τα πτερύγια (Colomi & Diamand, 1995). Κάθε οζίδιο αποτελεί ένα υπερτροφικό κύτταρο το οποίο μεταβάλει το κυτταρόπλασμα του, περιβάλλεται από μια υαλώδη κάψουλα αλλά δεν υφίσταται κυτταρική μίτωση (Hossain et al. 2011). Στο συγκεκριμένο πείραμα τα οζίδια εμφανίστηκαν κυρίως στο ραχιαίο, πλευρικό και ουριαίο πτερύγιο των ψαριών, ενώ ήταν ισοκατανεμημένα στις ανατομικές περιοχές. Επίσης δεν παρατηρήθηκε κάποιο μοτίβο εξάπλωσης των οζιδίων.

Η μετάδοση του ιού της λεμφοκύστης στην τσιπούρα γίνεται μέσω της επαφής ή ύπαρξης σε νερό με άλλα μολυσμένα άτομα – οριζόντια μετάδοση (Kvit et al. 2008) και από τους γεννήτορες στους απογόνους – κάθετη μετάδοση. Όσον αφορά την κάθετη μετάδοση, ο ιός βρίσκεται στην επιφάνεια των αυγών και όχι εσωτερικά στο ζυγωτό ενώ με την απολύμανση των αυγών με ιώδιο, ο ιός καταστρέφεται (Cano et al 2013). Στην ιχθυοκαλλιέργεια παρά ταύτα, οι νύμφες (πρώιμο στάδιο ψαριών) μολύνονται από τα τροχόζωα και τις αρτέμιες, δύο από τις κύριες τροφές που δίνονται σε αυτό το στάδιο. Τα τροχόζωα και οι αρτέμιες είναι φορείς του ιού της λεμφοκύστης (Cano et al 2009). Ύστερα το ψάρι-φορέας θα εμφανίσει τα συμπτώματα του LCDV την πρώτη στρεσογόνο περίοδο. Ως πλήρως ανεπτυγμένη τσιπούρα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος, δεν θα ξαναεμφανίσει συμπτώματα.

Η comet assay είναι μια χρήσιμη τεχνική για την εκτίμηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων σε ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς. Είναι ευαίσθητη στην ανίχνευση των θραυσμάτων του DNA των κυττάρων αλλά χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή καθώς το ποσοστό του κερματισμένου DNA, αντιπροσωπεύει μια δυναμική κατάσταση, που ισορροπεί μεταξύ της δημιουργίας της βλάβης αλλά και της επιδιόρθωσής της (Dusinska and Collins, 2008). Σε άλλες μελέτες, υπήρξαν περιπτώσεις όπου μετά από έκθεση σε μεταλλαξογόνες ουσίες, τα θραύσματα του DNA ήταν αποτέλεσμα των μηχανισμών επιδιόρθωσης, δηλαδή εκδηλώθηκαν ως αντίδραση της άμυνας των οργανισμών στους γενετοξικούς παράγοντες (Speit and Hartmann, 1995). Ένας γενετοξικός παράγοντας για τις τσιπούρες του πειράματος, είναι και ο ενδοκυτταρικός ιός της λεμφοκύστης. Στα αποτελέσματα, το K2 που είχε στατιστικά σημαντική διαφορά, παρατηρείται ότι την ημέρα 30 είχε υψηλότερο Tail moment ενώ την ημέρα 90, όταν τα οζίδια είχαν εξαφανιστεί ήταν αρκετά χαμηλό. Υπάρχουν δύο πιθανές απαντήσεις στο ερώτημα για ποιο λόγο υπήρξε αυτή η διαφορά. Αρχικά την ημέρα 30, το ποσοστό προσβολής για το K2 ήταν 75%. Ο ιός καθώς μολύνει τα κύτταρα, χρησιμοποιεί τον "ξενιστή" του ώστε να παράγει τα απαιτούμενα υλικά για την αναπαραγωγή και την σύνθεση πρωτεϊνών του ίδιου του ιού. Τα νέα τμήματα του ιού που παράγονται απελευθερώνονται τελικά από το κύτταρο, ενώ το ίδιο αποσυντίθεται. Για το λόγο αυτό τα θραύσματα DNA είναι λογικό να είναι περισσότερα την ημέρα 30. Η δεύτερη εξήγηση φαίνεται να είναι πιο ορθή. Η αύξηση του κατακερματισμένου DNA την ημέρα 30, φαίνεται να είναι ο φυσιολογικός τρόπος άμυνας του οργανισμού απέναντι στον ιό. Ο ίδιος ο οργανισμός απαγορεύει την επιδιόρθωση στα μολυσμένα κύτταρα, καθώς το ανοσοποιητικό σύστημα λειτουργεί ενεργητικά για να θεραπεύσει τον οργανισμό. Αντίστοιχα την ημέρα 90, η βλάβη στο DNA έφτασε τις τιμές των

υπολοίπων μεταχειρίσεων, μεταξύ αυτών και τις τσιπούρες που είχαν περάσει τη λεμφοκύστη στο παρελθόν.

5 . ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συγκεντρωτικά τα συμπεράσματα της παρούσας εργασίας είναι τα εξής:

- Ο ιός της λεμφοκύστης μολύνει το μεγαλύτερο ποσοστό των ψαριών ανεξάρτητα από τη διατροφή (K1, K2, M) ενώ το πρόσθετο κανελέλαιο βοήθησε στη μείωση της θνησιμότητας ενισχύοντας το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών.
- Η εμφάνιση των οζωδών αλλοιώσεων ήταν κυρίως στο ραχιαίο, πλευρικό και ουριαίο πτερύγιο των ψαριών, ενώ ήταν ισοκατανεμημένα στις ανατομικές περιοχές. Η εξάπλωση των οζιδίων δεν ακολούθησε κάποιο μοτίβο, ενώ ήταν ανεξάρτητη από τη διατροφή.
- Οι τσιπούρες που είχαν νοσήσει και αυτοϊαθεί στο παρελθόν από τον LCDV, παρόλο που βρισκότουσαν σε άμεση επαφή με άρρωστα ψάρια, δεν ξαναεμφάνισαν συμπτώματα.
- Με τη χρήση του πρωτόκολλου Comet assay στον ιστό του ήπατος, μόνο η διατροφή με πρόσθετο 2% κανελέλαιο (K2) είχε στατιστικά σημαντική διαφορά, καθώς την ημέρα 30 είχε υψηλότερο Tail moment ενώ την ημέρα 90, όταν τα οζίδια είχαν εξαφανιστεί ήταν αρκετά χαμηλό. Το Tail moment αποτελεί το κατακερματισμένο DNA των ηπατοκυττάρων και αντιπροσωπεύει μια δυναμική κατάσταση, που ισορροπεί μεταξύ της δημιουργίας της βλάβης αλλά και της επιδιόρθωσής του DNA.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Idaomar. 2008. Biological Effects of Essential Oils - A Review. *Food and Chemical Toxicology* 46:446–75. Retrieved November 2, 2017 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691507004541?via%3Dihub>).
- Borrego, Juan J., Estefania J. Valverde, Alejandro M. Labella, and Dolores Castro. 2017. “Lymphocystis Disease Virus: Its Importance in Aquaculture.” *Reviews in Aquaculture* 9(2):179–93.
- Cano, I. et al. 2006. “Detection of Lymphocystis Disease Virus (LCDV) in Asymptomatic Cultured Gilt-Head Seabream (*Sparus Aurata*, L.) Using an Immunoblot Technique.” *Veterinary Microbiology* 113(1–2):137–41.
- Cano, I., B. Lopez-Jimena, E. Garcia-Rosado, J. B. Ortiz-Delgado, et al. 2009. “Detection and Persistence of Lymphocystis Disease Virus (LCDV) in Artemia Sp.” *Aquaculture* 291(3–4):230–36. Retrieved October 27, 2017 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848609002506>).
- Cano, I., B. Lopez-Jimena, E. Garcia-Rosado, J. B. Ortiz-Delgado, et al. 2009. “Detection and Persistence of Lymphocystis Disease Virus (LCDV) in Artemia Sp.” *Aquaculture* 291(3–4):230–36. Retrieved September 15, 2017 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848609002506>).
- Collins, a R. 2004. “The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations.” *Molecular Biotechnology* 26(3):249–61. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15004294>).
- Colorni, A. and Diamant, A. (1995), Splenic and cardiac lymphocystis in the red drum, *Sciaenops ocellatus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 18: 467–471.
- Colorni A & Padros F (2011), Diseases and health management. In: Pavlidis MA, Mylonas CC (eds) *Sparidae: Biology and aquaculture of Gilthead Sea Bream and other Species*, pp. 321-357. Wiley-Blackwell, Oxford
- Chao LK, Hua KF, Hsu HY, Cheng SS, Lin IF, Chen CJ, (2008). Cinnamaldehyde inhibits pro-inflammatory cytokines secretion from monocytes/macrophages through suppression of intracellular signaling. *Food Chem Toxicol* 2008;46:220e31
- Cordero, H., A. Cuesta, J. Meseguer, and M. A. Esteban. 2016. “Characterization of the Gilthead Seabream (*Sparus Aurata* L.) Immune Response under a Natural Lymphocystis Disease Virus Outbreak.” *Journal of Fish Diseases* 39(12):1467–76. Retrieved August 30, 2017 (<http://doi.wiley.com/10.1111/jfd.12481>).
- Dusinska M. and Collins A. R. (2008). The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*, 23:191-205.
- Ezura, Yoshio. 1998. “Detection of Antibody against Lymphocystis Disease Virus in Japanese Flounder by Enzyme Linked Immunosorbent Assay Lymphocystis Cells Were Collected from the Infected.”
- Faikoh, Elok Ning, Yong Han Hong, and Shao Yang Hu. 2014. “Liposome-Encapsulated Cinnamaldehyde Enhances Zebrafish (*Danio Rerio*) Immunity and Survival When Challenged with *Vibrio Vulnificus* and *Streptococcus Agalactiae*.” *Fish and Shellfish Immunology* 38(1):15–24. Retrieved November 2, 2017 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.02.024>).

- Flugel R.H. (1985) Lymphocystis disease virus. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 116, 113–150.
- Konca K.,Lankoff A.,Banasik A.,Lisowska H.,Kuszewski T.,Goźdz S.,Koza Z.,Wojcik A. A cross platform public domain PC image analysis program for the comet assay. *Mutation Research* 534:15-20, 2003.
- Kvitt, Hagit, Gilad Heinisch, and Ariel Diamant. 2008. “Detection and Phylogeny of Lymphocystivirus in Sea Bream (*Sparus Aurata*) Based on the DNA Polymerase Gene and Major Capsid Protein Sequences.” *Aquaculture* 275(1–4):58–63.
- Masoero L, Ercolini C, Caggiano M, Rossa A (1986) Osservazioni preliminary sulla linfocisti in una maricoltura intensive italiana. *Rivista Italiana di Piscicoltura e Ittiopatologia* 21: 70–74.
- Molania T, Moghadamnia AA, Pouramir M, Aghel S, Moslemi D, Ghassemi L,. The effect of cinnamaldehyde on mucositis and salivary antioxidant capacity in gamma- irradiated rats (a preliminary study). *Daru* 2012;20:89.
- Olive P. (1989), Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in chinese hamster V79 Spheroids,*Radiation Research* 117,79-92
- Olive, P.L., Frazer, G., Banath J.P. (1993). Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Radiat. Res.* 136, 130-136.
- Rattanachaikunsopon, Pongsak and Parichat Phumkhachorn. 2010. “Potential of Cinnamon (*Cinnamomum Verum*) Oil to Control *Streptococcus Iniae* Infection in Tilapia (*Oreochromis Niloticus*).” *Fisheries Science* 76(2):287–93. Retrieved November 1, 2017 (<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs12562-010-0218-6.pdf>).
- Paul R. Bowser, Gregory A. Wooster & Rodman G. Transmission of Walleye Dermal Sarcoma and Lymphocystis via Waterborne Exposure. *Getchell Journal of Aquatic Animal Health* Vol. 11 , Iss. 2,1999
- Salagovic, J., Gilles, J., Verschaeve, L. & Kalina, I. The comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworms: a promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites. *Folia Biol. (Praha.)* 42, 17?21 (1996).
- Sarasquete C, Gonzalez de Canales ML, Arellano J, Perez-Prieto SI, Garcia-Rosado E, Borrego JJ (1998) Histochemical study of lymphocystis disease in skin of gilthead seabream, (*Sparus aurata*) from the South Atlantic coast of Spain. *Histology and Histopathology* 13: 37–45.
- Speit, G. and Hartmann, A. (1995). The contribution of excision repair to the DNA-effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* 10:555–559.
- Tidona, C. a and G. Darai. (1997). “The Complete DNA Sequence of Lymphocystis Disease Virus.” *Virology* 230(2):207–16.
- Vaseeharan, Baskaralingam and Rajagopalan Thaya. 2014. “Medicinal Plant Derivatives as Immunostimulants: An Alternative to Chemotherapeutics and Antibiotics in Aquaculture.” *Aquaculture International* 22(3):1079–91. Retrieved November 2, 2017 (<http://link.springer.com/10.1007/s10499-013-9729-3>).
- Verlinden M, Pasmans F, Mahu M, Vande Maele L, De Pauw N, Yang Z, (2013). In vitro sensitivity of poultry *Brachyspira intermedia* isolates to essential oil components and in vivo reduction of *Brachyspira intermedia* in rearing pullets with cinnamaldehyde feed supplementation. *Poult Sci* 2013;92:1202e7.

Zorrilla, I. et al. 2003. "Bacteria Recovered from Diseased Cultured Gilthead Sea Bream (*Sparus Aurata* L.) in Southwestern Spain." *Aquaculture* 218(1-4):11-20. Retrieved November 1, 2017 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848602003095>).

DNA Damage Detection in Situ, Ex Vivo and In Vivo (2011), Methods and Protocols. Springer Protocols, Humana Press (Book)

Directive File: Anand Tunsutapanichb (1979) AN IMPROVED TECHNIQUE FOR DECAPSULATION AND PRESERVATION OF ARTEMIA CYSTS (BRINE SHRIMP EGGS) DEVELOPED AT THE CHACHEONGSAO FISHERIES STATION, <http://www.fao.org/3/contents/cfdb9336-631a-5da5-9ee1-07036476b605/AB909E00.htm>

Ελληνική Βιβλιογραφία

Κάβουρας Μ. (2009). Ανίχνευση DNA βλάβης/επιδιόρθωσης με COMET ανάλυση σε εκτρεφόμενους και φυσικούς πληθυσμούς ιχθύων εκτρεφόμενους σε βαρέα μέταλλα. Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Κασιμάτης Δ. (2008). Ανίχνευση DNA βλάβης/επιδιόρθωσης με comet Ανάλυση σε εκτρεφόμενους ιχθύς εκτεθειμένους σε στρες. Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Κλαουδάτος Σ. & Κλαουδάτος Δ. (2012). Καλλιέργειες φυτικών και εκτροφές υδρόβιων ζωικών οργανισμών. Βιβλίο, Εκδόσεις Προπομπός.

Φώτης Γ. & Αγγελίδης Π. (2003). Εκτροφή και παθολογία ιχθύων (τόμος Α'). Βιβλίο, Εκδόσεις Σύγχρονη παιδεία.

Υπουργείο Γεωργίας- Γενική Δ/ση αλιείας (2000). Πρακτικός Οδηγός Ιχθυοπαθολογίας, Βιβλίο, Εκδόσεις Διεύθυνση αλιευτικών εφαρμογών.

Κλαουδάτος Σ. (2005). Υδατοκαλλιέργειες και περιβάλλον, Βιβλίο, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ελληνική Στατιστική Αρχή (ΕΛΣΤΑΤ 2015), Έρευνα Υδατοκαλλιεργειών.

Οδηγία 2010/63/ΕΕ του ευρωπαϊκού κοινοβουλίου και του συμβουλίου της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης

FishBase.org, Sea bream – *Sparus aurata*, (25/10/2017)

Εικόνες – Φωτογραφίες:

Όλες οι εικόνες ανήκουν στον συγγραφέα εκτός των:

Εικόνα1

<http://www.aller-aqua.com/media/11406/19-hatchery-pack-seabream.png?anchor=center&mode=crop&rnd=130772869510000000>

Εικόνα8

<http://www.ncbe.reading.ac.uk/MATERIALS/Electrophoresis%20and%20DNA/Resources/electrophoresis.png>

6. ABSTRACT

Thesis title: «Experimental infection of Sea bream (*Sparus aurata*, L.) with Lymphocystis disease virus (LCDV) »

Author: Sagris Vasileios

Lymphocystis disease virus (LCDV) is the causative agent of a well-known fish viral disease that is characterized by hypertrophy of fibroblastic cells in the connective tissue. In intensive aquaculture systems, the prevalence of LCDV infection is very high causing significant economic losses. Even though horizontal and vertical transmission of the virus is confirmed, information about the transmission mode of LCDV is limited, as most of them refer to naturally infected populations. Presently, infected-carrier fish have been involved in viral transmission to healthy and LCDV self-recovered gilthead seabreams by cohabitation. In parallel, healthy fish were maintained without the viral infestation, as the control group. The healthy fish that were not involved in viral transmission but were experimentally infected, were divided into three different treatments depending on their diet. There were 2 different diets including essential oil of cinnamon (1% and 2% of Cinnamon oil) and a control diet. The progress of the infection was monitored every 15 days by the detection of LCDV characteristic nodular lesions while mortality rate was daily recorded. Essential oils are volatile, natural compounds isolated from aromatic plants and are well known for their medicinal properties. Cinnamaldehyde compound, is extracted from cinnamon oil and it can be used as an antibacterial and immunostimulant, reducing the use of antibiotics in aquaculture. Additionally, the Comet Assay protocol, a method of measuring DNA fragmentation in eukaryotic cells, was tested. Through this method, it is possible to assess the DNA damage of the cells, from genotoxic agents, like LCDV. The treatments with the extra

cinnamon oil were similar in prevalence and mortality rates. By the 15th day, the highest rate of prevalence was presented (83-94%) and a 1/6 of the total population mortality rate was achieved till the 45th day, remaining stable afterwards. The treatment with the standard nutrition was quite different, as the highest mortality rate (40%) was recorded till the 15th day, while only the 22.5% of the infected population was self-treated and survived. The nodules were mainly presented in the dorsal, pectoral and caudal fins of the fish, while they were evenly distributed on the rest anatomical regions. LCDV characteristic nodular lesions were not detected in self-recovered gilthead seabreams and the control group. Furthermore, in the Comet assay results, only the 2% Cinnamon oil diet had a statistically significant difference. On day 30, higher DNA damage was recorded relative to the 90th - the end of the experiment. During infection, host cells responded with various defense systems including the cellular DNA damage and repair mechanisms. However, as LCDV is a major threat to aquaculture practice, further research on host respond mechanisms is necessary. These interactions could possibly reinforce the view that viruses can reveal key regulators of cellular pathways through the proteins they target.

Keywords: Sea bream, Lymphocystis disease virus – LCDV, Cinnamon oil, Comet assay

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



Η ομάδα εργασίας κοινής θεματολογίας, με την ταυτόχρονη εκπόνηση διαφορετικών διπλωματικών πτυχιακών εργασιών.

Αποτελούνταν από τους: Βουσουρέλη Πάρη, Γεωργιάδης Νικόλαος, Κολαΐτη Ιωάννα Αγγελική, Κυδωνάκης Ευάγγελος, Νατούδη Ματίνα, Παπαδοπούλου Κατερίνα, Σηφάκης Παναγιώτης, Σαγής Βασίλειος