

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

Αντιμετώπιση ασθενειών και ευζώια εντατικά εκτρεφόμενων ψαριών



Χέλι (*Anguilla anguilla*)

**Γεροντής Θεοδωής
Βόλος 2014**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Γκολομάζου Ελένη, Λέκτορας, Ιχθυοπαθολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,
Μέλος.

Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (M.Sc., Ph.D.) Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,

Αθανάσιος Εξαδάκτυλος, Μόνιμος Επίκουρος Καθηγητής (Ph.D.) Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους τους ανθρώπους που συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα της εργασίας αυτής, κ. Ελένη Γκολομάζου για την πολύτιμη βοήθειά της και τη διαρκή υποστήριξή της, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την συνάδελφο Νατάσα Βεργίδου για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της στην διεκπεραίωση της εργασίας.

Περίληψη

Το ψάρι που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν το Ευρωπαϊκό χέλι (*Anguilla Anguilla*). Για τις ανάγκες του διατροφικού πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν 82 χέλια (*Anguilla anguilla*) από μονάδα εντατική εκτροφής χελιών. Τα ιχθύδια ήταν μέσου σωματικού βάρους 9,68 g και μεταφέρθηκαν στον πειραματικό σταθμό του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε 4 γυάλινα ενυδρεία χωρητικότητας(80L). Τα ψάρια ταίζονταν 1 φορά την ημέρα και γινόταν σιφωνισμός του νερού για τον καθαρισμό των απεκκρίσεων τους. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος γινόταν έλεγχος των θνησιμοτήτων και μέτρηση του αριθμού παρασίτων των νεκρών ψαριών στη συνέχεια μεταφέρονταν μέσα σε αεροστεγή πλαστική σακούλα στην κατάψυξη.Οι θεραπείες περιελάμβαναν 5 ημέρες μπάνιο με το εκάστοτε φάρμακο,5 ημέρες διακοπή και τάισμα μόνο με την control τροφή και εν συνεχεία δειγματολήψια 5 ψαριών για μέτρηση παρασίτων,αίματος και ανάλυση κομητών. Το τελευταίο κομμάτι του πειραματικού μέρους, ήταν η χορήγηση των φαρμάκων μέσω της τροφής δια στόματος με το πείραμα να διαρκεί 6 ημέρες. Στην τροφή τοποθετήσαμε 1 ml ιχθυελαίου και την ανακατέψαμε με τα φάρμακα τα οποία είχαν την μορφή πούδρας. Η θεραπεία κράτησε 6 ημέρες και καταναλώνονταν 0,6 gr τροφής. Συμπερασματικά, το φάρμακο Albendazole αποδείχθηκε το πιο αποτελεσματικό μεταξύ των φαρμάκων στην μείωση των παρασίτων.Δεν ανιχνεύθηκε γενετοξικότητα με την τεχνική της comet στα ηπατοκύτταρα του χελιού από την έκθεση σε φάρμακα στις συγκεντρώσεις που χορηγήθηκαν. Αυτά τα φάρμακα δεν προσθέτουν επιπλέον καταπόνηση και είναι ασφαλή για τα ψάρια. Η έκταση της βλάβης του DNA που προκλήθηκε σε όλες τις μεταχειρίσεις ήταν πολύ μικρή.

Πίνακας περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Βιολογία του χελιού.....	8
1.2 Αναπαραγωγή.....	9
1.3 Διατροφή του Χελιού.....	9
1.4 Τα φάρμακα στις ιχθυοκαλλιέργειες.....	10
1.5 Ορθολογική χρήση φαρμακευτικών ουσιών στις ιχθυοκαλλιέργειες.....	13
1.6 Τρόποι χορήγησης φαρμάκων στα ψάρια.....	14
1.7 Παράσιτα.....	15
1.8 Θεραπεία-Μονογενή τρηματώδη.....	15
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	17
2.1 Πειραματικά ψάρια και συνθήκες εκτροφής.....	17
2.2 Πειραματικό σιτηρέσιό.....	19
2.3 Θεραπεία με μπάνιο.....	21
2.4 Θεραπεία με φάρμακα δια στόματος.....	23
2.5 Παρασιτολογική εξέταση.....	23
2.6 Ανάλυση κομητών (Comet assay).....	25
2.6.1 Επίστρωση αγαρόζης σε αντικειμενοφόρο πλάκα	27
2.6.2 Λύση, ηλεκτροφόρηση και μέτρηση των κομητών.....	28
2.7 Εκτίμηση της βλάβης του DNA – Υπολογισμός της παραμέτρου TM.....	29
2.8 Απομόνωση ηπατοκυττάρων.....	32
2.9 Στατιστική Ανάλυση.....	33
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	34
3.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων.....	34
3.1.1 Ποσοστό προσβολής των παρασίτων μετά από θεραπεία με μπάνιο.....	34
3.1.2 Μέσος όρος παρασίτων στα χέλια (<i>A. anguilla</i>).....	35

3.1.3 Μέσος όρος του μήκους ουράς των κομητών μετά από θεραπεία με μπάνιο.....	37
3.1.4 Ποσοστό προσβολής των παρασίτων μετά από θεραπεία δια στόμα.....	39
3.1.5 Μέσος όρος των παρασίτων μετά από θεραπεία δια στόματος.....	40
3.1.6 Μέσος όρος του μήκους ουράς των κομητών- θεραπεία δια στόματος.....	41
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	43
4.2 Εφαρμογές της τεχνικής «ανάλυσης κομητών».....	44
4.3 Συμπεράσματα.....	48
4.4 Abstract.....	48
5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49
5.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία	49
5.2 Ελληνική βιβλιογραφία.....	55

Εισαγωγή

1.1 Βιολογία του χελιού

Το χέλι ανήκει στους Οστειχθύες στην τάξη Anguilliformes και στην οικογένεια Anguillidae. Το γένος *Anguilla* περιλαμβάνει 16 είδη που ζουν σε ποτάμια, λίμνες και έλη όλων των ηπείρων (Wirth & Bernatchez 2001). Το ψάρι που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν το Ευρωπαϊκό χέλι (*Anguilla anguilla*):

Συνομοταξία : Χορδωτά

Ομοταξία : Ακτινοπτερύγιοι

Υφομοταξία: Νεοπτερύγιοι

Τάξη: Εγγελυόμορφα

Οικογένεια: Anguillidae

Γένος: *Anguilla*

Είδος: *A. anguilla*

Το σώμα των χελιών είναι λεπτό και μακρύ και περιβάλλεται από βλεννώδη επιδερμίδα. Το μήκος των αρσενικών είναι μικρότερο από των θηλυκών (Deelder 1984). Οι προνύμφες παραμένουν στη θάλασσα των Σαργασσών από ένα έως δύο χρόνια και ακολούθως, μεταφέρονται με το ρεύμα του κόλπου για 200 έως 300 ημέρες στις ακτές της Ευρώπης. Στη νότια Ευρώπη καταφθάνουν από τις αρχές του χειμώνα και στη βόρεια μέχρι τις αρχές του επόμενου καλοκαιριού.

1.2 Αναπαραγωγή του Χελιού

Μια από τις πιο σύνθετες διαδικασίες αναπαραγωγής είναι αυτή του χελιού. Το χέλι ζει στα γλυκά νερά και αναπαράγεται στη θάλασσα (κατάδρομο είδος). Μόλις φτάσουν στην ηλικία των 6 χρόνων τα αρσενικά και των 9 χρόνων τα θηλυκά, αρχίζει η προετοιμασία της αναπαραγωγής. Η ωοτοκία πραγματοποιείται στο τέλος του χειμώνα και την άνοιξη στη θάλασσα των Σαργασών και σε μεγάλο βάθος (Deedler 1984-McCleave et al.1998).

1.3 Διατροφή του Χελιού

Το χέλι είναι σαρκοφάγο αν και από μερικούς χαρακτηρίζεται παμφάγο. Έτσι πέμπει με μεγάλη ευκολία τις πρωτεΐνες και ορισμένα λίπη, αλλά με δυσκολία τους υδατάνθρακες.

Μια τυπική σύνθεση τροφής στην Ιαπωνία με πρωτεΐνη 46% είναι η ακόλουθη:

- Λευκό ιχθυάλευρο 65%
- Άλφα-πατατόμυλο 24%
- Άλευρο μάγιας και συκωτιού 5%
- Μείγμα βιταμινών 2%
- Μείγμα ορυκτών αλάτων 2%
- Διάφορες άλλες προσμείξεις 2% (Κλαουδάτος 2005).

1.4 Τα φάρμακα στις ιχθυοκαλλιέργειες

Τα φάρμακα χρησιμοποιούνται στις εκτροφές ψαριών για την εκρίζωση και τη θεραπεία των νοσημάτων των ψαριών, τα οποία έχουν σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις στο κόστος της παραγωγής. Σύμφωνα με τον ορισμό του νόμου PODSA του Καναδά, ως φάρμακο ορίζεται «κάθε ουσία που χρησιμοποιείται εντός και επί των ψαριών ή άλλων ζώων για την παρεμπόδιση, τον έλεγχο ή τον περιορισμό μιας ασθένειας, μιας διαταραχής ή κάποιου συμπτώματος» (Stephen & Iwama, 1998). Η χρησιμοποίησή τους στις εντατικές εκτροφές υπόκειται σε κανονισμούς, οι οποίοι ποικίλλουν ανάλογα με το είδος που πρόκειται να εκτραφεί και ανάλογα με την εθνική πολιτική της κάθε χώρας (Schneider, 1994). Οι εγκεκριμένες αντιβακτηριακές ουσίες από τον FDA για χρήση από τους κτηνιάτρους, αναφέρονται στη βάση δεδομένων FARAD. Είναι ένα σύστημα πληροφόρησης σχεδιασμένο, για να πληροφορεί τους κτηνιάτρους, στο πώς να αποφεύγουν τα προβλήματα εμφάνισης καταλοίπων από τα κτηνιατρικά φάρμακα, τα παρασιτοκτόνα και τους περιβαλλοντικούς ρύπους (Stoffregen και συν., 1996).

Όσον αφορά στον αριθμό των χημικών ουσιών, οι οποίες χρησιμοποιούνται διεθνώς στην εκτροφή των ψαριών, έχει υπολογισθεί ότι, αν και ανέρχονται σε 50 περίπου, μόνο λίγες από αυτές είναι επίσημα εγκεκριμένες για χρήση στα ψάρια των εντατικών εκτροφών, γιατί τα υπάρχοντα τοξικολογικά δεδομένα είναι ελάχιστα και ελλιπή, ενώ απαιτούνται πολύ περισσότερα για την έγκριση της κυκλοφορίας τους (Ruiter και συν., 1996). Αυτό οφείλεται στο ότι κάθε φαρμακευτική ουσία μαζί με όλους τους μεταβολίτες της πρέπει αρχικά να μελετηθεί φαρμακολογικά, τοξικολογικά, και βακτηριολογικά. Στη συνέχεια, αφού διαπιστωθεί ποια είναι η πλέον ασφαλής, σε συνδυασμό πάντα με την ποσοστιαία συμμετοχή της στα κατάλοιπα, καθορίζεται ως η ουσία κατάλοιπο δείκτης (marker residue). Είναι μια

χρονοβόρα διαδικασία, στην οποία βασίζεται ο προσδιορισμός του Μέγιστου Ορίου Καταλοίπων (Gingerich και συν., 1998).

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση οι χημικές ουσίες οι οποίες είναι εγκεκριμένες για χρήση στα ψάρια των εντατικών εκτροφών και εκείνες για τις οποίες δεν είναι δυνατό να καθορισθεί MRL (απαγορευμένες), συμπεριλαμβάνονται στα παραρτήματα του Κανονισμού (ΕΟΚ) 2377/90 (ΕΜΕΑ, 2002). Σε όλα σχεδόν τα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης επιτρέπεται η χρησιμοποίηση των κινολονών πρώτης γενεάς όπως είναι η φλουμεκίνη και το οξολινικό οξύ. Η σαραφλοξακίνη είναι η μόνη εγκεκριμένη στην Ευρωπαϊκή Ένωση φθοριοκινολόνη για χρήση στα ψάρια, ενώ η χρήση της απαγορεύεται μόνο στην Ιρλανδία και Αγγλία (ΕΜΕΑ α,β, 1999).

Σύμφωνα με τον Εθνικό Οργανισμό Φαρμάκων (ΕΟΦ) οι κινολόνες, οι οποίες είναι εγκεκριμένες για χρήση στην κτηνιατρική θεραπευτική, είναι η δανοφλοξακίνη, η διφλοξακίνη, η ενροφλοξακίνη, η ιβαφλοξακίνη, η μαρβοφλοξακίνη, η νορφλοξακίνη, το οξολινικό οξύ και η φλουμεκίνη. Τα κτηνιατρικά φάρμακα τα οποία είναι εγκεκριμένα στην Ελλάδα για χρήση κατά των νοσημάτων των ψαριών είναι η υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη, ο συνδυασμός σουλφαδιαζίνης με τριμεθοπρίμη και δύο κινολόνες το οξολινικό οξύ και η φλουμεκίνη (ΕΟΦ, 2001).

Διεθνώς η χρήση των κτηνιατρικών φαρμακευτικών παρασκευασμάτων (VMPs) στην καταπολέμηση των ασθενειών των ψαριών των εντατικών εκτροφών διαφαίνεται, ότι πρέπει να επιλυθεί με την κατάρτιση ειδικών ερευνητικών προγραμμάτων. Τα προγράμματα αυτά αφορούν τη μελέτη της κατανομής και της απομάκρυνσής τους από τα ψάρια των διαφόρων γεωγραφικών περιοχών (Borrá-Nóτου) και πιο ειδικά του κάθε είδους ψαριού χωριστά για την κάθε περιοχή. Παρά το μεγάλο αριθμό αντιβακτηριακών ουσιών, που παράγονται και εγκρίνονται για χρήση στη ζωική παραγωγή, μόνο ελάχιστες είναι εκείνες, οι οποίες τελικά

εγκρίνονται για τα ψάρια των εντατικών εκτροφών. Ειδικότερα εγκρίνονται για τα ψάρια των ψυχρών και βορείων περιοχών, όπως είναι ο σολομός του Ατλαντικού (*Salmo salar* L.). Για το λόγο αυτό και σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για την Αξιολόγηση των Κτηνιατρικών Φαρμάκων (EMEA) επιβάλλεται η μελέτη της απομάκρυνσης των φαρμάκων και στα είδη ψαριών των θερμότερων-νότιων περιοχών, όπως είναι και η Ελλάδα. Οι ασθένειες των ψαριών των εντατικών εκτροφών αποτελούν σοβαρό κίνδυνο, με επιπτώσεις στην ευζωία τους και στην παραγωγή με αποτέλεσμα τις μεγάλες απώλειες στον ιχθυοπληθυσμό.

Στην Ελλάδα η κατάσταση από την άποψη της χρήσης των αντιβακτηριακών ουσιών στα ψάρια των εντατικών εκτροφών, φαίνεται να μην είναι πλήρως ελεγχόμενη. Αυτό λόγω της μη πραγματοποίησης μελετών και της μη ύπαρξης δεδομένων της κατανομής και της απομάκρυνσής τους από τον οργανισμό των ψαριών. Για τους παραπάνω λόγους και επειδή η κατανάλωση ψαριών εκτροφής συνεχώς αυξάνει τόσο στη χώρα μας όσο και διεθνώς, το παραγόμενο προϊόν θα πρέπει να είναι υψηλής ποιότητας, και όσο το δυνατό απαλλαγμένο καταλοίπων και τελικά ασφαλές για τον άνθρωπο. Για να μπορέσουν να ελεγχθούν οι δυσμενείς καταστάσεις στις εκτροφές ψαριών, επιστρατεύονται οι ίδιες τακτικές με εκείνες, οι οποίες εφαρμόζονται στις εντατικές εκτροφές των άλλων παραγωγικών ζώων, με κύριο στόχο την παρεμπόδιση της εισβολής του λοιμογόνου παράγοντα στην εκτροφή. Στις περισσότερες των περιπτώσεων, εκεί όπου η εκτροφή ψαριών βρίσκει μεγάλη ανάπτυξη, ακολουθούνται οι κανονισμοί και οι πρακτικές της Καλής Διαχείρισης της Εντατικής Εκτροφής, οι οποίες είναι ουσιώδεις για τη διατήρηση της καλής ποιότητας του περιβάλλοντος των εκτρεφόμενων ψαριών. Η χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων είναι άμεση και περισσότερο εκείνη των αντιβακτηριακών παραγόντων (Τυρπένου, 2002).

1.5 Ορθολογική χρήση φαρμακευτικών ουσιών στις ιχθυοκαλλιέργειες

Η χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών γίνεται πάντα με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να μη διαφεύγουν ποσότητες φαρμακευτικών ουσιών στο περιβάλλον. Για τον περιορισμό των ποσοτήτων αυτών, πολλές μέθοδοι εφαρμόζονται, όπως είναι η διατροφή των ασθενών ψαριών με το χέρι αντί με αυτοματισμούς, η χρησιμοποίηση συστημάτων βίντεο κάτω από το νερό για τον έλεγχο της κατανάλωσης, η χρησιμοποίηση μηχανικών μέσων συλλογής και απομάκρυνσης της τροφής, που χάνεται στο περιβάλλον και η ρύθμιση της συχνότητας χορήγησης (Stephen και Iwama, 1998). Για να είναι ορθολογική η χρησιμοποίηση των αντιβακτηριακών παραγόντων στις εκτροφές ψαριών, γενικά πρέπει να ακολουθούνται οι παρακάτω αρχές (Volmer και συν., 1997):

- να χρησιμοποιούνται μόνο όταν η μόλυνση είναι επιβεβαιωμένη
- να αρχίζουμε τη θεραπεία όσο το δυνατόν πιο γρήγορα, έχοντας οπωσδήποτε πάρει δείγματα για βακτηριολογικό έλεγχο
- να χρησιμοποιούμε αντιβακτηριακό παράγοντα όσο το δυνατόν στενότερου αντιβακτηριακού φάσματος, για να μπορέσουμε να προστατέψουμε τη βακτηριακή χλωρίδα
- να αποφεύγουμε την προληπτική αντιβακτηριακή θεραπεία
- να χορηγούμε πάντα τη σωστή δόση με την ορθή διάρκεια αγωγής, ώστε να διασφαλίζονται τα επιτρεπτά όρια καταλοίπων στους ιστούς, και τέλος
- να υιοθετήσουμε την πολιτική της περιορισμένης και εκ περιτροπής χρήσης των αντιβακτηριακών ουσιών

1.6 Τρόποι χορήγησης φαρμάκων στα ψάρια

• **Ένεση:** Η ένεση αποτελεί την οδό χορήγησης του αντιβακτηριακού παράγοντα και των εμβολίων για τον έλεγχο των ασθενειών των γεννητόρων και για την ανοσοποίηση των νεαρών ψαριών. Όταν τα φάρμακα χορηγούνται με ένεση, το μεγαλύτερο ποσοστό τους παραμένει στον οργανισμό του ψαριού και έτσι η πιθανότητα να εισέλθουν στο περιβάλλον μειώνεται σημαντικά. Τα ψάρια στα στάδια αυτά της ζωής τους είναι πιθανόν είτε να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα πριν τον μεταβολισμό και την πλήρη απέκκρισή τους ή να μη χρησιμοποιηθούν για ανθρώπινη κατανάλωση. Για το λόγο αυτό η ένεση είναι η πιο κατάλληλη μέθοδος χορήγησης των φαρμάκων στα ψάρια. Όμως, η χειρονακτική εργασία που απαιτείται και η καταπόνηση (στρες) των ψαριών περιορίζουν την εφαρμογή της.

• **Φαρμακευτικά λουτρά/ εμβαπτίσεις:** Χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία κυρίως των εξωτερικών παρασιτώσεων των ψαριών, των νοσημάτων τα οποία οφείλονται σε βακτήρια καθώς και σε ιώσεις για την αποτροπή των επιμολύνσεων.

• **Φαρμακούχος ιχθυοτροφή:** Η φαρμακούχος ιχθυοτροφή είναι ο συνηθέστερος τρόπος χορήγησης φαρμάκων στα ψάρια. Πραγματοποιείται με την ενσωμάτωσή τους στην ιχθυοτροφή. Η από του στόματος χορήγηση των φαρμάκων στα ψάρια γίνεται πάντοτε λαμβάνοντας υπόψη την ποσότητα τροφής στη βιομάζα και την ενσωμάτωση του φαρμάκου σ' αυτήν σε ανάλογο ποσοστό. Αν και το σχήμα αυτό σε γενικές γραμμές είναι το πρότυπο, το ποσοστό αυτό μπορεί να αλλάξει. Γνωρίζοντας την ποσότητα της τροφής, η οποία πρέπει να καταναλωθεί ανά ημέρα και το ολικό βάρος των ψαριών (βιομάζα), μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα του φαρμάκου, η οποία πρέπει να προστεθεί ανά χιλιόγραμμο τροφής. Το φάρμακο μπορεί είτε να ενσωματωθεί στην τροφή σε ειδικές εγκαταστάσεις (feed mill) ή να επικαλύψει τα σύμπηκτα (pellets) (Τυρπένου, 2007). Η χρονική διάρκεια της θεραπευτικής αγωγής,

αν και ποικίλλει από χώρα σε χώρα, συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 5 και 14 ημερών (Schneider, 1994).

1.7 Παράσιτα

Τα πρωτόζωα εξωπαράσιτα είναι τα πιο συνηθισμένα παράσιτα στις ιχθυοκαλλιέργειες. Φέρουν ένα ή περισσότερα μαστίγια τα οποία χρησιμοποιούν για να μετακινούνται (Πνευματικάτου, 1996). Τα κλινικά συμπτώματα οφείλονται σε βλάβες που προκαλούνται από τα παράσιτα. Τα παράσιτα προκαλούν ερεθισμό, δημιουργώντας υπερπλασία του επιθηλίου και αύξηση της παραγωγής βλέννας. Τα στάδια εξέλιξης του παρασίτου είναι ανθεκτικά στη θεραπεία, οπότε η αντιμετώπιση πρέπει να κατευθύνεται στο ελεύθερο κολυμβητικό στάδιο μόλυνσης. Αυτό απαιτεί την ύπαρξη χημικών ή πολλαπλές θεραπείες για την αντιμετώπιση όλων των σταδίων μόλυνσης.

1.8 Θεραπεία-Μονογενή τρηματώδη

(*Dactylogyrus* sp.), (*Gyrodactylus* sp.), (*Microcotyle* sp.), (*Lamellodiscus* sp.)
(*Furnestinia echeneis*), (*Diplectanum* sp.), (*Serranicotyle* sp.)

1. Μπάνιο με φορμόλη
2. Παρατεταταμένη εμβάπτιση σε φορμόλη
3. Παρατεταμένη εμβάπτιση σε οργανοφωσφορικά
4. Μπάνιο με οργανοφωσφορικά
5. Μπάνιο με οξικό οξύ

- 6.Μπάνιο με γλυκό νερό
- 7.Μπάνιο με θαλασσινό νερό
8. Παρατεταμένη εμβάπτιση σε υπαρμαγγανικό κάλιο
9. Παρατεταμένη εμβάπτιση σε κάλιο
- 10.Μπάνιο με χλωραμίνη-Τ
- 11.Μπάνιο με μεπενταζόλη
- 12.Παρατεταμένη εμβάπτιση σε μεπενταζόλη
- 13.Παρατεταμένη εμβάπτιση σε praziquantel
- 14.Μπάνιο με praziquantel (Noga 2000) .

2 Υλικά και μέθοδοι

2.1 Πειραματικά ψάρια και συνθήκες εκτροφής

Για τις ανάγκες του διατροφικού πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν χέλια (*Anguilla anguilla*) από μονάδα εντατική εκτροφής χελιών. Τα ιχθύδια ήταν μέσου σωματικού βάρους 9,68 g και μεταφέρθηκαν στον πειραματικό σταθμό του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε 4 γυάλινα ενυδρεία χωρητικότητας 80L. Τα ψάρια ταιζόνταν 1 φορά την ημέρα και γινόταν σιφωνισμός του νερού για τον καθαρισμό των απεκκρίσεων τους. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος γινόταν έλεγχος των θνησιμοτήτων και μέτρηση του αριθμού παρασίτων των νεκρών ψαριών. Για την διεξαγωγή του πειράματος, δημιουργήθηκε ένα κλειστό σύστημα κυκλοφορίας νερού. Στον εξοπλισμό του κλειστού συστήματος νερού, περιλαμβάνονταν:

- Τέσσερα γυάλινα ενυδρεία
- Τέσσερα φίλτρα καθαρισμού νερού
- Σύστημα παροχής οξυγόνου
- Σύστημα πλαστικών σωλήνων

Εικόνα 1:Γυάλινο ενυδρείο και φίλτρο καθαρισμού νερού



Για τον καθαρισμό του νερού χρησιμοποιήθηκαν μηχανικά φίλτρα. Το νερό εισερχόταν στο φίλτρο και εν συνεχεία στο βιολογικό φίλτρο. Στο μηχανικό φίλτρο, γινόταν η συγκράτηση των στερεών προϊόντων του μεταβολισμού και των υπολειμμάτων τροφής. Στη συνέχεια το νερό διοχετεύονταν στο βιολογικό φίλτρο, το οποίο αποτελούνταν από ειδικές πέτρες αποτελούμενες από μικροπόρους για την ανάπτυξη των απονιτροποιητικών βακτηρίων του γένους *Nitrosomonas* και *Nitrobacter*, ώστε να επιτυγχάνεται η μετατροπή της αμμωνίας, σε νιτρώδη και νιτρικά. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την εκτροφή προερχόταν από τα δίκτυο ύδρευσης της περιοχής, νέες ποσότητες του οποίου (έως 5%) προσθέτονταν σε καθημερινή βάση στο σύστημα εκτροφής

Στο κλειστό σύστημα κυκλοφορίας γλυκού νερού η θερμοκρασία ήταν $21\pm 0,2^\circ\text{C}$, το pH $8,28\pm 0,27$ και το διαλυμένο οξυγόνο διατηρήθηκε $>6,5\text{ mg/L}$. Συγκεκριμένα τα χέλια διαχωρίστηκαν σε 4 ενυδρεία:

Πίνακας 2.1 Σύνολο χελιών ανά ενυδρείο.

Ενυδρείο	Αριθμός Χελιών
1	20
2	20
3	20
4	20

2.2 Πειραματικό σιτηρέσιο

Κατά την διάρκεια του πειράματος τα ψάρια διατράφηκαν με συγκεκριμένο σιτηρέσιο. Τα εκτρεφόμενα άτομα σιτίζονταν με βιομηχανική τροφή μια φορά την ημέρα. Μετά από δύο εβδομάδες τα ψάρια χωρίστηκαν σε 3 διατροφικές ομάδες και ενώ το τελευταίο ενυδρείο ορίστηκε ως μάρτυρας. Αναλυτικότερα τα συστατικά και η χημική σύσταση του πειραματικού σιτηρεσίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2

Πίνακας 2.2 Θρεπτική σύσταση σιτηρεσίου

	Control
Ποσοστό %	100
Υγρασία	7,97
Ξηρή ουσία	91,33
Πρωτεΐνη	49,88
Λίπος	10,11
Υδατάνθρακες	19,54
Ινώδεις ουσίες	0,68
Τέφρα	12,49
Ενέργεια	19,11

Πίνακας 2.3. Συστατικά και χημική σύσταση των τριών πειραματικών σιτηρεσιών (% της τροφής).

Σύσταση σε πρώτες ύλες	Control
Ιχθυάλευρο	60,5
Σιτάρι, Άλευρο	19,5
Γλουτένη καλαμποκιού	15
Ιχθυέλαιο	4
Πρόμιγμα ανόργανων & βιταμινών	0,3
Αντιμυκητιακό	0,2
Φωσφορικό Μονοασβέστιο	0,3
Vit C	0,1
Vit E	0,1

¹ Το ποσοστό των υδατανθράκων εκτιμήθηκε με αφαίρεση από το 100 του συνόλου των ποσοστών πρωτεΐνης, λιπιδίων και τέφρας.

² Οι ινώδεις ουσίες εκτιμήθηκαν βάσει των περιεκτικοτήτων των διαφόρων συστατικών σύμφωνα με γνωστές συγκεντρώσεις (NRC 1993)

³ Η ολική ενέργεια υπολογίστηκε ως άθροισμα των επιμέρους ολικών ενεργειών που προσφέρει κάθε θρεπτικό συστατικό λαμβάνοντας υπ' όψη τους συντελεστές 5,64, 9,44 και 4,11 για τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τους υδατάνθρακες, αντίστοιχα.

2.3 Θεραπεία με μπάνιο

Οι θεραπείες περιελάμβαναν 5 ημέρες μπάνιο με το εκάστοτε φάρμακο και δειγματολήψια 5 ψαριών για μέτρηση παρασίτων και ανάλυση κομητών (Comet assay) (HMEPA 6), 5 ημέρες διακοπή και δειγματολήψια 5 ψαριών για μέτρηση παρασίτων (HMEPA 11) και 5 ημέρες μπάνιο με το εκάστοτε φάρμακο και

δειγματολόγια 5 ψαριών για μέτρηση παρασίτων και ανάλυση κομητών (Comet assay) (HMEPA 16).

Τα φάρμακα με την χρήση γουδιού έγιναν πούδρα. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται ο τρόπος χορήγησης των φαρμάκων. Για την θεραπεία από παράσιτα, χρησιμοποιήθηκαν τρία είδη φαρμάκων.

Πίνακας 2.4 Φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν

Φάρμακο	Ποσότητα δισκίων(mg)	Εταιρία παρασκευής
Febendazole	250	Intervet
Albendazole	600	Provet S.A
Menbendazole	100	Vermax

Πίνακας 2.5 Τρόπος διάλυσης φαρμάκων

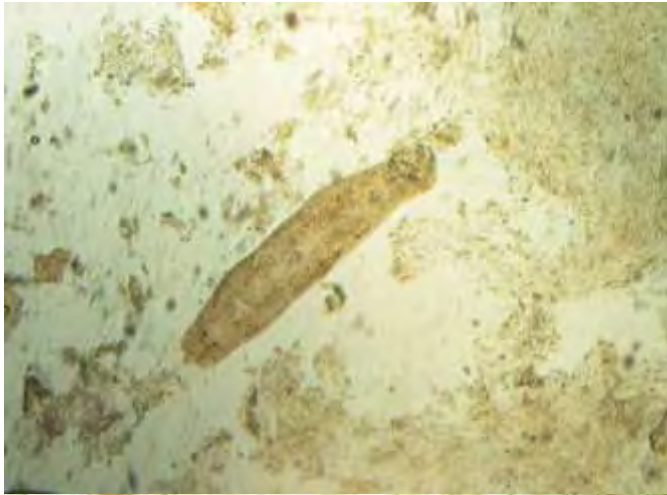
Φάρμακο(gr)	Απιονισμένο νερό	DMSO(dimethyl sulfoxide)
Febendazole (0,07)	9 ml	1ml
Albendazole (0,1)	10 ml	-
Mebendazole (0,04)	9 ml	1ml

2.4 Θεραπεία με φάρμακα δια στόματος

Το τελευταίο κομμάτι του πειραματικού μέρους, ήταν η χορήγηση των φαρμάκων μέσω της τροφής δια στόματος με το πείραμα να διαρκεί 6 ημέρες. Στην τροφή τοποθετήσαμε 1 ml ιχθυελαίου και την ανακατέψαμε με τα φάρμακα τα οποία είχαν την μορφή πούδρας. Η θεραπεία κράτησε 5 ημέρες και η ημερήσια δόση τροφής ήταν 0,6 gr.

2.5 Παρασιτολογική εξέταση

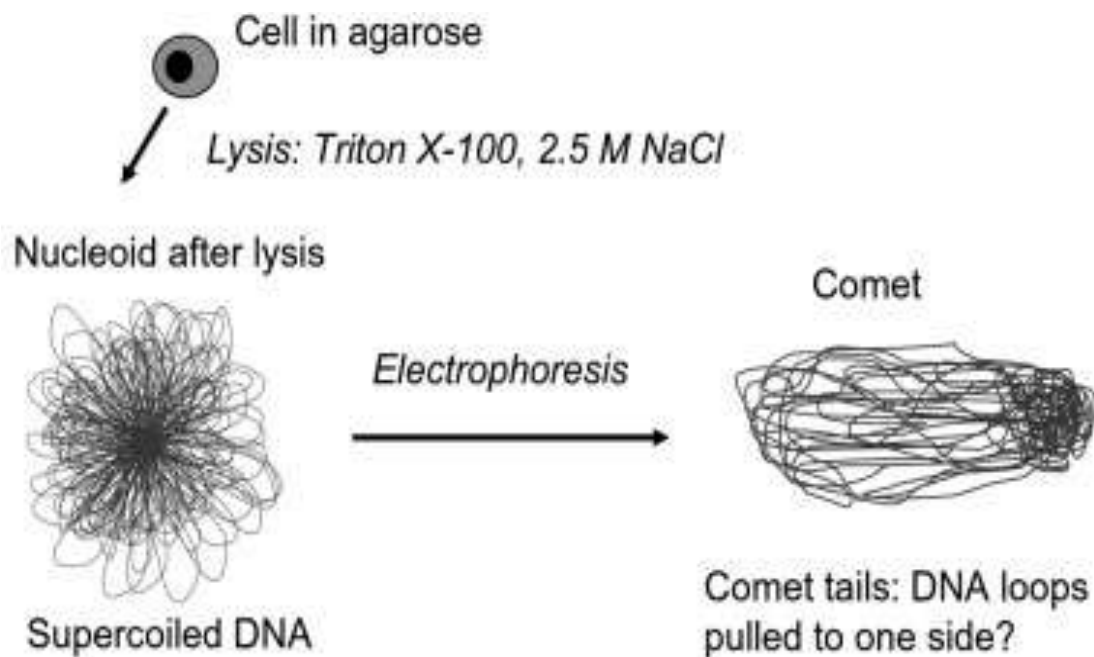
Για την παρασιτολογική εξέταση, τα νεκρά ψάρια μεταφέρονταν σε εργαστήριο και μετά από αναισθητοποίηση θανατώνονταν. Η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε πιστά για όλα τα ψάρια. Στα ψάρια πραγματοποιήθηκε παρασιτολογική εξέταση για την ανίχνευση εξωπαρασίτων. Στη συνέχεια με την χρησιμοποίηση λαβίδας και νυστεριού κόβονταν τα βραγχιακά τόξα και απομακρύνονταν από το σώμα κάθε ψαριού και ξέσματα και των δύο επιφανειών των βραγχιακών τόξων ελήφθησαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες, στις οποίες είχε ήδη τοποθετηθεί μια σταγόνα φυσιολογικού ορού και καλύφθηκαν με καλυπτρίδα. Τέλος μεταφέρονταν οι αντικειμενοφόρες πλάκες σε μικροσκόπιο για την ανάλυση των παρασίτων. Τα παράσιτα αυτά είναι της τάξης Dactylogyrida του γένους Dactylogyrus.



Εικόνα 1: Παρασιτολογική εξέταση μονογενούς τρηματώδους pseudodactylogyrus

2.6 Ανάλυση κομητών (Comet assay)

Η ανάλυση κομητών ή comet assay (ή single – cell gel) είναι μια αρκετά ευαίσθητη τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση της βλάβης του DNA σε επίπεδο απομονωμένων κυττάρων. Σ' αυτή τη τεχνική της μικρο-γέλης ηλεκτροφόρησης, ένας μικρός αριθμός κυττάρων, όπως κύτταρα που προέρχονται από καλλιέργειες ή κύτταρα που απομονώνονται από διάφορους ιστούς, τοποθετούνται με τη μορφή αιωρήματος σε λεπτό στρώμα αгарόζης πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Τα κύτταρα λύνονται από διάλυμα κορεσμένο σε άλας NaCl. Σχηματίζονται πυρήνες αποτελούμενοι από μη νουκλεοσωμικό αλλά υπερελικωμένο DNA. Ακολούθως της ηλεκτροφόρησης και της χρώσης τους με τη φθορίζουσα ουσία, βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), τα κύτταρα με βλάβη στο DNA, εμφανίζουν αυξημένη μετανάστευση του κερματισμένου χρωμοσωμικού DNA από τον πυρήνα προς την άνοδο, λαμβάνοντας το σχήμα του κομήτη (Σχήμα 1). Η εφαρμογή της μεθόδου σε αλκαλικό περιβάλλον είναι η πιο συχνή και το ποσοστό των θραυσμάτων που μεταναστεύουν, είναι ανάλογο της βλάβης του DNA. Μεταξύ των παραμέτρων που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του ποσοστού του κερματισμένου DNA, είναι η εκατοστιαία αναλογία του DNA στην ουρά του κομήτη, η εκατοστιαία αναλογία του DNA στον πυρήνα, το μήκος της ουράς, η διάμετρος του πυρήνα, το συνολικό μήκος του κομήτη και η παράμετρος TM-Tail Moment, όπου ορίζεται ως το γινόμενο του μήκους της ουράς, επί το ποσοστό του DNA στην ουρά του κομήτη και η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ως μέτρο κερματισμού το DNA.



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση του δημιουργίας κομήτη κατά το στάδιο της ηλεκτροφόρησης. Εφαρμογή της ανάλυσης κομητών (comet assay) σε ουδέτερο περιβάλλον. Από αριστερά: Απομονωμένος πυρήνας με υπερελικωμένο DNA. Μετά την έκθεση σε κορεσμένο διάλυμα άλατος (αποπεριέλιξη) επέρχεται χάλαση του DNA, με αποτέλεσμα οι βρόγχοι να εκχύνονται από τον πυρήνα και να σχηματίζουν "φωτοστέφανο". Όταν οι πυρήνες με χαλαρωμένο DNA υπόκεινται σε ηλεκτροφόρηση, αρνητικά φορτισμένα κομμάτια ή βρόγχοι φθαρμένου DNA μετακινούνται στο ηλεκτρικό πεδίο προς την άνοδο και σχηματίζεται μια εικόνα παρόμοια με κομήτη (Shaposhnikov *et al.*, 2008).

2.6.1 Επίστρωση αγαρόζης σε αντικειμενοφόρο πλάκα

Μετά την απομόνωση των ηπατικών κυττάρων, ακολούθησε η τοποθέτησή τους με τη μορφή αιωρήματος (20μL) σε λεπτή στρώση αγαρόζης πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Προηγουμένως, η αντικειμενοφόρος πλάκα είχε εμβαπτισθεί σε καθαρή αλκοόλη και στη συνέχεια τοποθετήθηκε στους -20 °C για 30 λεπτά. Πήκτωμα αγαρόζης (NMP Normal Melting Point) συγκέντρωσης 0,5% παρασκευάστηκε σε διάλυμα PBS. Μετά την ανάδυσή και την ομογενοποίηση του, το διάλυμα τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για μικρό χρονικό διάστημα (2 λεπτά) μέχρι να διαυγασθεί πλήρως. Αφού στέγνωσε η αντικειμενοφόρος πλάκα από την αιθανόλη, εμβαπτίστηκε στη ζεστή αγαρόζη (>60° C) για σύντομο χρονικό διάστημα (3-4 sec), ώστε να επικαθήσει στην κρύα και καθαρή επιφάνεια της. Αμέσως μετά, αφαιρέθηκε από την αγαρόζη, καθαρίστηκε προσεχτικά η κάτω επιφάνειά της και τοποθετήθηκε πάνω σε πάγο για να ζελατινοποιηθεί.

Ένα δεύτερο διάλυμα, αγαρόζης (LMP Low Melting Point) συγκέντρωσης 0,5% παρασκευάστηκε με τον ίδιο τρόπο, για την ανάμιξή του με το κυτταρικό αιώρημα. Όταν έφτασε σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C), 20μl κυτταρικού αιωρήματος προστέθηκαν σε 80μl αγαρόζης (LMP) και τοποθετήθηκαν στην αντικειμενοφόρο πλάκα που ήταν καλυμμένη με πήκτωμα αγαρόζης και τοποθετήθηκε η καλυπτρίδα. Η αντικειμενοφόρος πλάκα που έφερε τα κύτταρα τοποθετήθηκε σε πάγο για 15 λεπτά. Μετά τη ζελατινοποίηση και της δεύτερης στρώσης αγαρόζης, η καλυπτρίδα απομακρύνθηκε με προσοχή.

2.6.2 Λύση, ηλεκτροφόρηση και μέτρηση των κομητών

Μετά το τέλος του προηγούμενου σταδίου, η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε σε διάλυμα λύσης. Το διάλυμα περιείχε άλας NaCl συγκέντρωσης 2.5 M, EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) συγκέντρωσης 100 mM, Tris συγκέντρωσης 10 mM και τέλος προστίθενται 1% Triton – X 100 και 10% DMSO (dimethyl sulfoxide). Στη συνέχεια, το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε με συμπυκνωμένο διάλυμα HCl ή NaOH (pH 10) και τοποθετήθηκε στους 4 °C για περίπου 30 λεπτά (το κρύο διάλυμα βοηθάει στη διατήρηση της σταθερότητας της αγαρόζης) (Tice *et al.*, 2000). Στο κρύο διάλυμα λύσης, τοποθετήθηκαν οι αντικειμενοφόρες πλάκες (οι οποίες φέρουν τα ηπατικά κύτταρα) και παρέμειναν στους 4 °C για τουλάχιστον μία ώρα. Κατά το ανωτέρω χρονικό διάστημα έλαβε χώρα η λύση των κυττάρων καθώς η κυτταρική μεμβράνη λύεται και το DNA σχηματίζει πυρήνες .

Πριν την ηλεκτροφόρηση, οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό και τοποθετήθηκαν στη συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης που περιείχε 1,5 l βασικό διάλυμα (pH>12,1 & 4°C), όπου και παρέμειναν για 15 λεπτά ώστε να πραγματοποιηθεί η αποδιάταξη του DNA που είναι απαραίτητη για την ανίχνευση θραυσμάτων μονόκλωνου DNA. Το παραπάνω διάλυμα παρασκευάστηκε από 0,075 M NaOH και 1 mM EDTA σε απεσταγμένο νερό. Μετά την πάροδο των 15 λεπτών, ξεκίνησε η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης σε συνθήκες 25 V, 300 mA για χρονική διάρκεια 15 λεπτών (Mitchelmore and Chipman, 1998).

Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι αντικειμενοφόρες πλάκες εκπλύθηκαν με προσοχή σε ουδέτερο διάλυμα (διάλυμα Tris 0,4 M), ώστε το βρωμιούχο αιθίδιο να μπορεί να δράσει κατά το στάδιο της χρώσης (McKelvey-Martin *et al.*, 1993). Σε κάθε αντικειμενοφόρο, προστέθηκαν 50μl βρωμιούχου αιθιδίου συγκέντρωσης 20μg/ml. Εκατό έως εκατόν πενήντα κύτταρα συλλέχθηκαν τυχαία από κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα τα οποία αναλύθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss AxioStar plus) εφοδιασμένο με φίλτρο διέγερσης και αποκοπής στα 515-560nm 590 nm αντίστοιχα, σε μεγέθυνση 40x. Οι εικόνες καταγράφονταν από βιντεοκάμερα υψηλής ανάλυσης και προβάλλονταν σε οθόνη H/Y μέσω του λογισμικού ProgRes Capture Pro 2.1, ενώ η επεξεργασία-ανάλυση των «κομητών» έγινε με το λειτουργικό πρόγραμμα CASP (Konca *et al.*, 2002).

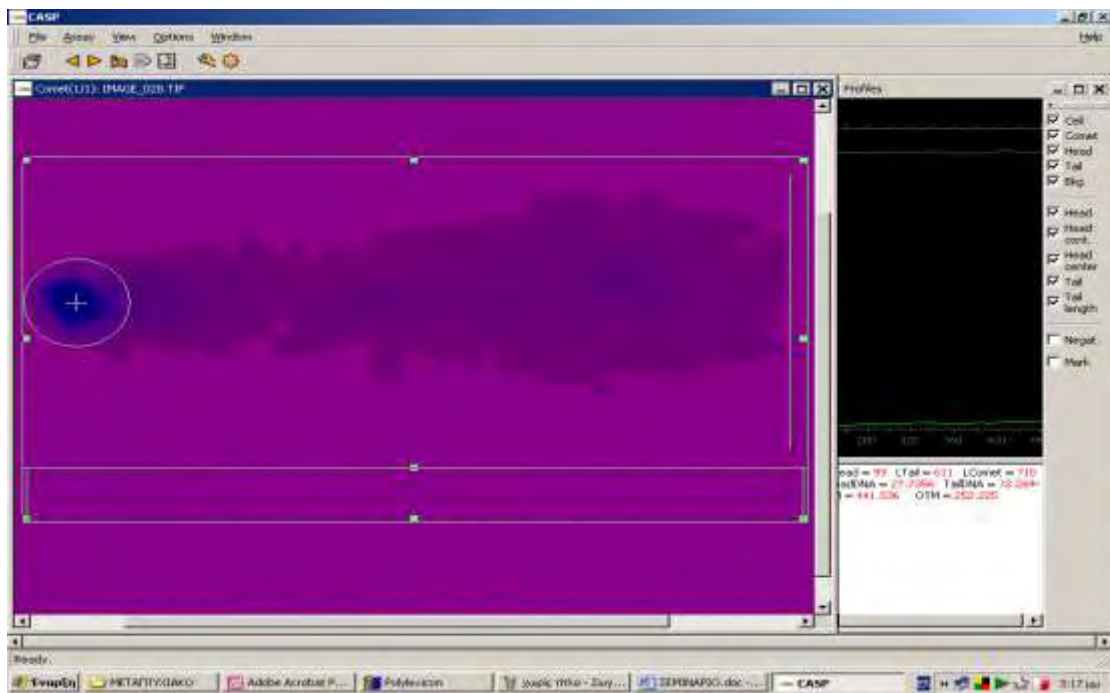
2.7 Εκτίμηση της βλάβης του DNA – Υπολογισμός της παραμέτρου TM

Όπως προαναφέρθηκε η έκταση της βλάβης του DNA εκτιμάται μετρώντας τη μετατόπιση ανάμεσα στον πυρήνα του κυττάρου ή «κεφαλή του κομήτη» και την «ουρά» η οποία προκύπτει λόγω κερματισμού του πυρηνικού DNA (Εικόνα 10). Μεταξύ των παραμέτρων που χρησιμοποιούνται είναι η εκατοστιαία αναλογία του DNA στην ουρά, η εκατοστιαία αναλογία του DNA στον πυρήνα, το μήκος της ουράς, η διάμετρος του πυρήνα και το συνολικό μήκος του κομήτη (Εικόνα 12). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος TM – Tail Moment (το γινόμενο του μήκους της ουράς επί το ποσοστό του DNA στην ουρά του κομήτη).



Εικόνα 2. Ηπατοκύτταρα χελιού (*A. anguila*) σε πήκτωμα αγαρόζης και αλκαλικό pH μετά από χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Αριστερά, φαίνονται κύτταρα με ελάχιστο βαθμό κερματισμού, με αποτέλεσμα το DNA να παραμένει στον

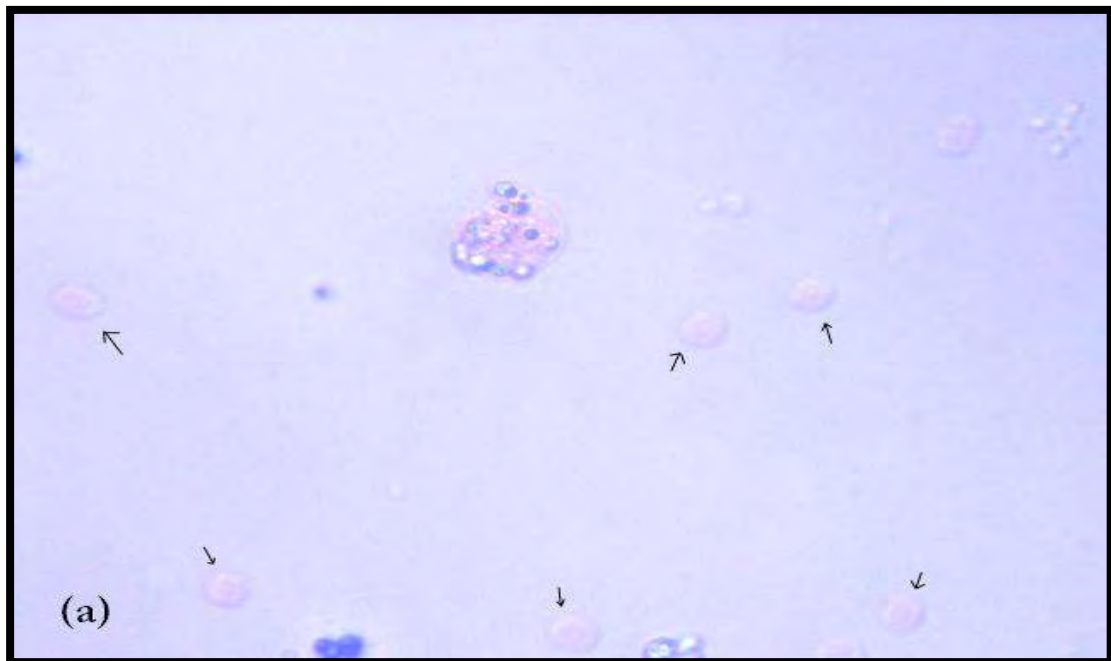
πυρήνα. Αντίθετα, στα δεξιά το κύτταρο έχει υποστεί εκτεταμένο κερματισμό, το DNA μεταναστεύει έξω από το κυτταρικό σώμα (κεφαλή του κομήτη) και μέσα στο πύκτωμα της αγαρόζης (ουρά του κομήτη).



Εικόνα 3. Υπολογισμός των παραμέτρων (εκατοστιαία αναλογία του DNA στην ουρά, εκατοστιαία αναλογία του DNA στον πυρήνα, το μήκος της ουράς, η διάμετρος του πυρήνα και το συνολικό μήκος του κομήτη) του κατακερματισμού του DNA, μέσω του λογισμικού ανάλυσης εικόνας “casp”.

2.8 Απομόνωση ηπατοκυττάρων

Για την απομόνωση των ηπατοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε χρώση με ηωσίνη για τον εντοπισμό ζώντων κυττάρων. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer (δεν δείχνεται στις εικόνες) για να υπολογιστεί το ποσοστό των ζώντων κυττάρων που έχουν παραμείνει κατά τη δειγματοληψία. Υψηλό ποσοστό θνησιμότητας οδηγεί σε σφάλμα της εκτίμησης της βλάβης στο DNA. Τα ζώντα κύτταρα φαίνονται με ερυθρό χρώμα:



Εικόνα 3 Τα ζώντα κύτταρα μόλις έχουν αρχίσει να χρωματίζονται και διακρίνεται η κυτταρική μεμβράνη και ο πυρήνας τους.

2.9 Στατιστική Ανάλυση

Τα δεδομένα επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο της Ανάλυσης της Διακύμανσης Μονής Κατεύθυνσης (one- way ANOVA) και οι διαφορές κρίθηκαν στατιστικά σημαντικές για τιμές $P < 0,05$. Ο έλεγχος των διαφορετικών διατροφικών μεταχειρήσεων έγινε με το Tukey's test. Στις περιπτώσεις όπου υπήρξαν μη παρόμοιες παραλλακτικότητες των μέσων όρων των διαφορετικών διατροφικών ομάδων (δηλαδή όταν στο Levene's test: $P < 0,05$), τα δεδομένα τροποποιήθηκαν με διάφορες αριθμητικές μεθόδους (π.χ. λογαρίθμηση, εκθετοποίηση κ.λπ.).

3 Αποτελέσματα

3.1 Ανάλυση αποτελεσμάτων

3.1.1 Ποσοστό προσβολής των παρασίτων στα χέλια (*A. anguilla*) μετά από θεραπεία με μπάνιο.

Στο Σχήμα 3.1 υπολογίστηκε το ποσοστό προσβολής των παρασίτων στα χέλια (*A. anguilla*) για τα φάρμακα, όπως υπολογίστηκε από τις δειγματοληψίες κατά την έναρξη του πειράματος ημέρα 0 έως την ημέρα 16 για κάθε φάρμακο και για τον μάρτυρα (Control). Όπως φαίνεται και από τον σχήμα, παρουσιάστηκαν παράσιτα σε όλα τα φάρμακα καθώς και στον μάρτυρα.

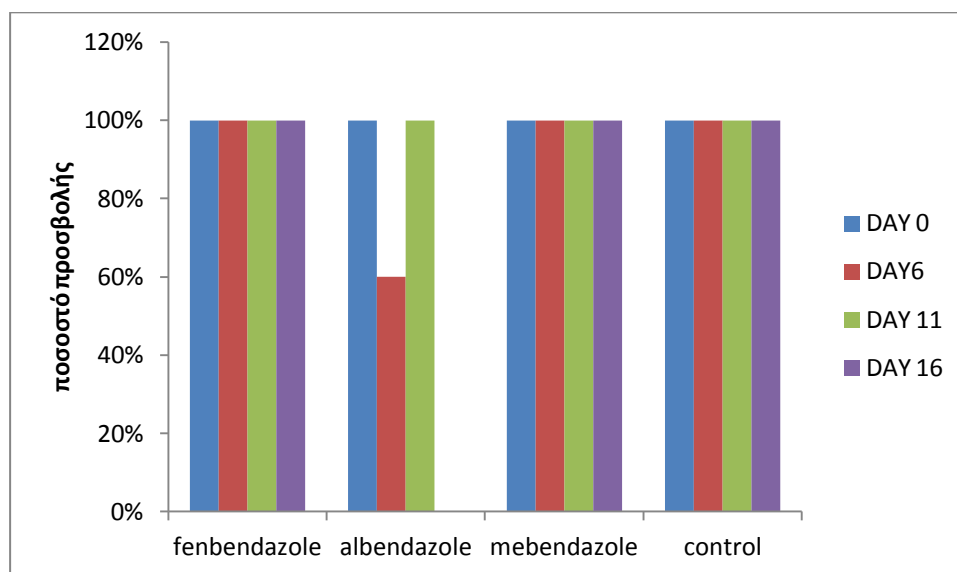
Την ημέρα 0 το ποσοστό προσβολής παρασίτων για το φάρμακο fenbedazole όπως επίσης για την albendazole και την mebendazole ήταν στο 100%.

Την ημέρα 6 της θεραπείας το ποσοστό προσβολής παρασίτων για την fenbedazole ήταν πάλι στο 100%, για την albendazole παρουσίασε μείωση (60%), ενώ για την mebendazole ήταν στο 100%. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P=0,04$).

Την ημέρα 11 τα ποσοστά προσβολής των παρασίτων για τα τρία φάρμακα και τον μάρτυρα έφτασε στο 100%.

Τέλος, την ημέρα 16 τα ποσοστά προσβολής για την fenbedazole ήταν στο 100% για την mebendazole επίσης στο 100% ενώ για το φάρμακο albendazole τα ποσοστά προσβολής από παράσιτα είχαν μηδενικό ποσοστό. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά $P<0,001$.

Τα ποσοστά προσβολής των παρασίτων για τον μάρτυρα ήταν στο 100% καθόλη την διάρκεια της θεραπείας.



Σχήμα 3.1: Ποσοστό προσβολής παρασίτων για τα φάρμακα-θεραπεία με μπάνιο

3.1.2 Μέσος όρος παρασίτων στα χέλια (*A. anguilla*) μετά από θεραπεία με μπάνιο.

Στο Σχήμα 3.2 φαίνεται ο μέσος όρος παρασίτων στα χέλια (*A. anguilla*), όπως υπολογίστηκε από τις δειγματοληψίες κατά την έναρξη του πειράματος ημέρα 0 έως την ημέρα 16 για κάθε φάρμακο και για τον μάρτυρα (Control). Όπως φαίνεται και από τον σχήμα, παρουσιάστηκαν παράσιτα σε όλα τα φάρμακα καθώς και στον μάρτυρα.

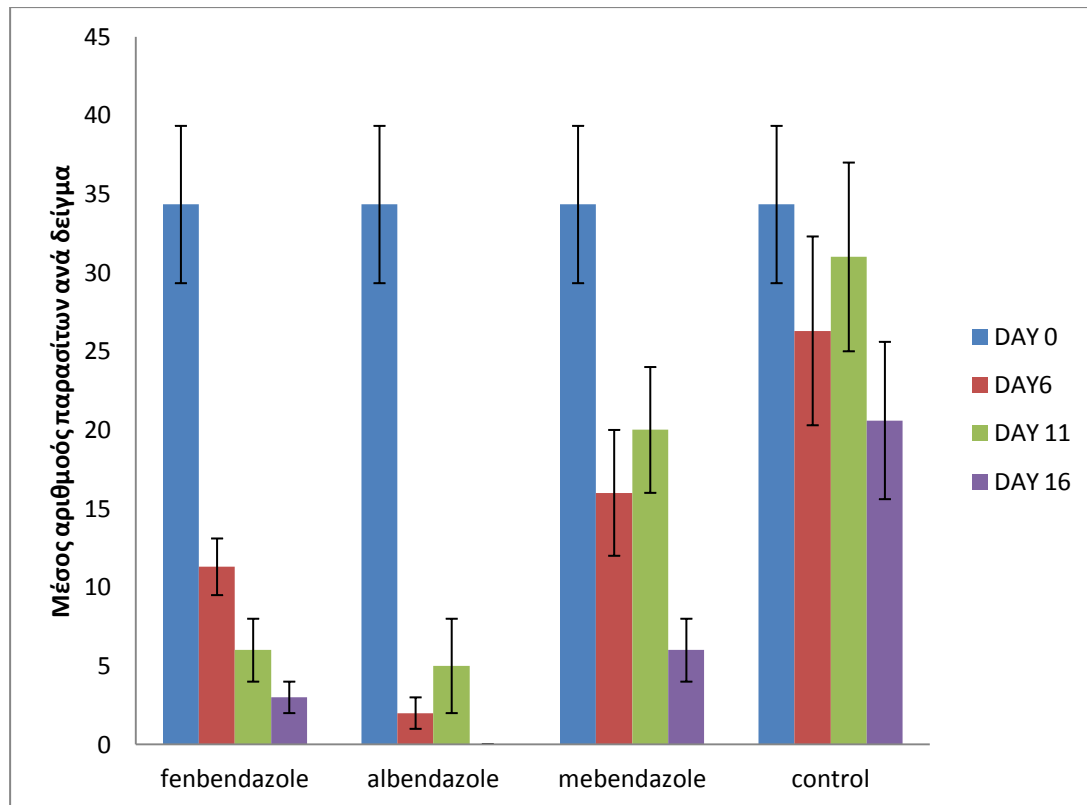
Την ημέρα 0 της θεραπείας ο μέσος όρος παρασίτων στα χέλια για το φάρμακο fenbedazole όπως επίσης για την albendazole, την mebendazole και τον μάρτυρα ήταν στο $34,33 \pm 10,9$.

Την ημέρα 6 της θεραπείας ο μέσος όρος των παρασίτων στα χέλια για το φάρμακο fenbedazole ήταν $11,3 \pm 1,8$. Για το φάρμακο albendazole ήταν 2 ± 1 , για την

mebendazole ήταν 16 ± 4 ενώ για τον μάρτυρα έφτασε στα $26,3\pm 6$. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του φαρμάκου albendazole και του μάρτυρα ίση με $P=0,01$.

Την ημέρα 11 της θεραπείας ο μέσος όρος των παρασίτων στα χέλια για το φάρμακο fenbedazole ήταν 6 ± 2 . Για το φάρμακο albendazole ήταν 5 ± 3 , για την mebendazole ήταν 20 ± 4 ενώ για τον μάρτυρα παρουσίασε αύξηση και έφτασε στα 31 ± 6 . Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του μάρτυρα και των φαρμάκων. Η διαφορά με την fenbedazole $P=0,007$, albendazole $P=0,002$. Η mebendazole διαφέρει από την albendazole $P=0,01$

Τέλος την ημέρα 16 της θεραπείας ο μέσος όρος των παρασίτων στα χέλια για το φάρμακο fenbedazole ήταν 3 ± 1 . Για το φάρμακο albendazole ήταν 0, για την mebendazole ήταν 6 ± 2 ενώ για τον μάρτυρα ήταν $20,6\pm 5$. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του μάρτυρα και όλων των φαρμάκων. Η διαφορά με την fenbedazole $P=0,08$, albendazole $P=0,03$, mebendazole $P=0,3$.



Σχήμα 3.2: Μέσος όρος παρασίτων ανά δείγμα-θεραπεία με μπάνιο

3.1.3 Μέσος όρος του μήκους ουράς των κομητών στα χέλια (*A. anguilla*) μετά από θεραπεία με μπάνιο.

Στο Σχήμα 3.3 φαίνεται ο μέσος όρος του μήκους ουράς των κομητών στα χέλια (*A. anguilla*), όπως υπολογίστηκε από τις δειγματοληψίες από την έναρξη ημέρα 0 μέχρι την ημέρα 16 για κάθε φάρμακο και για τον μάρτυρα (Control). Όπως φαίνεται και από το σχήμα,

Την ημέρα 0 της θεραπείας ο μέσος όρος του μήκους ουράς των κομητών στα χέλια και για τα 3 φάρμακα όπως επίσης και για τον μάρτυρα ήταν στο $0,2 \pm 0,02$.

Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων δεν έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών μεταχειρίσεων.

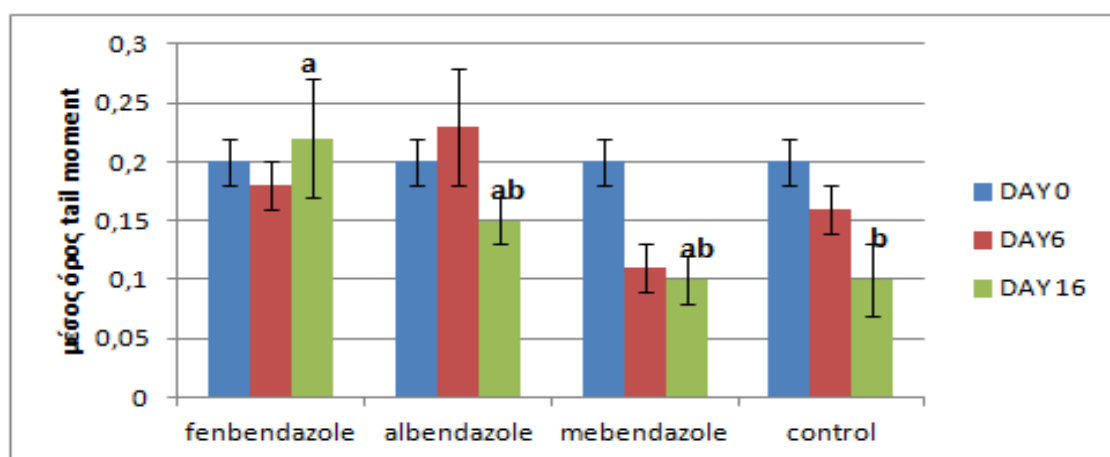
Την ημέρα 6 της θεραπείας ο μέσος όρος του μήκους ουράς των κομητών στα χέλια για το φάρμακο fenbedazole ήταν $0,18 \pm 0,02$. Για το φάρμακο albendazole ήταν

0,23±0,05,για την mebendazole ήταν 0,11±0,02 ενώ για τον μάρτυρα έφτασε στο 0,16±0,02.

Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων δεν έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών μεταχειρίσεων.

Την ημέρα 16 της θεραπείας ο μέσος όρος του μήκους ουράς των κομητών στα χέλια για το φάρμακο fenbedazole ήταν 0,22±0,05. Για το φάρμακο albendazole ήταν 0,23,±0,02 για την mebendazole ήταν 0,1±0,02 και για τον μάρτυρα επίσης 0,1±0,03.

Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων έδειξε σημαντικές διαφορές ($P<0,05$) μεταξύ των διατροφικών μεταχειρίσεων. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ fenbendazole και του μάρτυρα ($P =0,04$). Η βλάβη που προκλήθηκε στο DNA μειωνόταν καθώς με το πέρασμα των ημερών, το μήκος της ουράς των κομητών είχε μικρότερες τιμές.



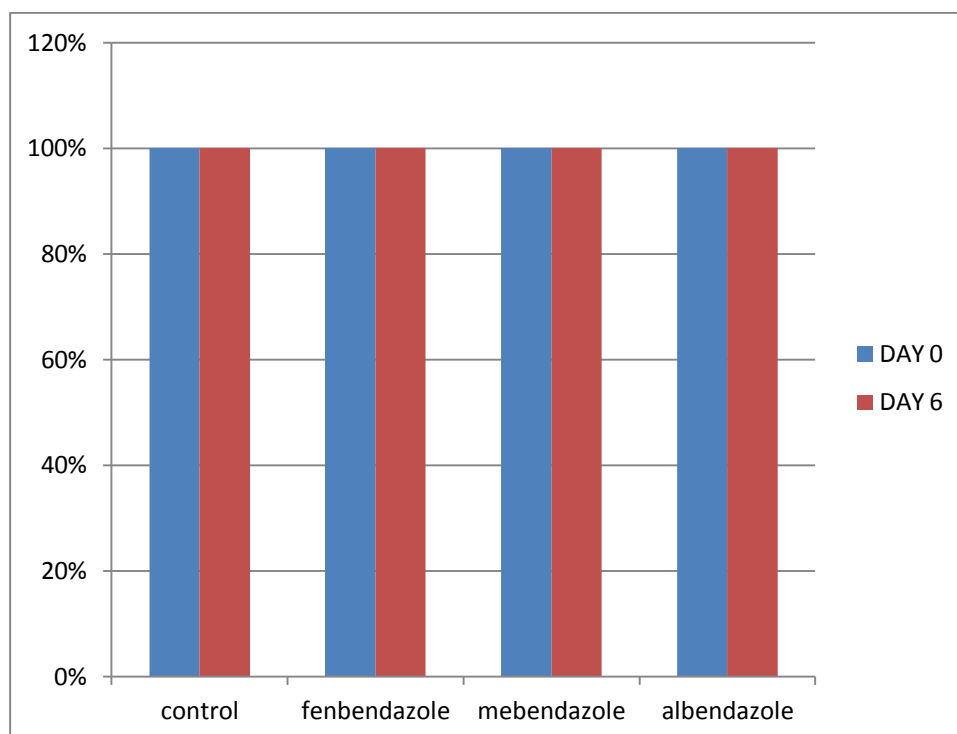
Σχήμα 3.3: Μέσος όρος tail moment για τα φάρμακα και τον μάρτυρα-Θεραπεία με μπάνιο
a, b: τα διαφορετικά γράμματα (οριζόντια διάταξη) δείχνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P<0,05$).

3.1.4 Ποσοστό προσβολής των παρασίτων στα χέλια (*A. anguilla*) μετά από θεραπεία δια στόματος.

Στο Σχήμα 3.4 φαίνεται το ποσοστό προσβολής των παρασίτων στα χέλια (*A. anguilla*), όπως υπολογίστηκε από τις δειγματοληψίες για κάθε φάρμακο και για τον μάρτυρα. Όπως φαίνεται και από τον σχήμα, παρουσιάστηκαν παράσιτα σε όλα τα φάρμακα καθώς και στον μάρτυρα.

Την ημέρα 0 το ποσοστό προσβολής παρασίτων για το φάρμακο fenbedazole όπως επίσης για την albendazole και την mebendazole ήταν στο 100% όπως επίσης και για τον μάρτυρα.

Την ημέρα 6 της θεραπείας το ποσοστό προσβολής παρασίτων για την fenbedazole ήταν πάλι στο 100%, όπως επίσης για την albendazole και την mebendazole και τον μάρτυρα.



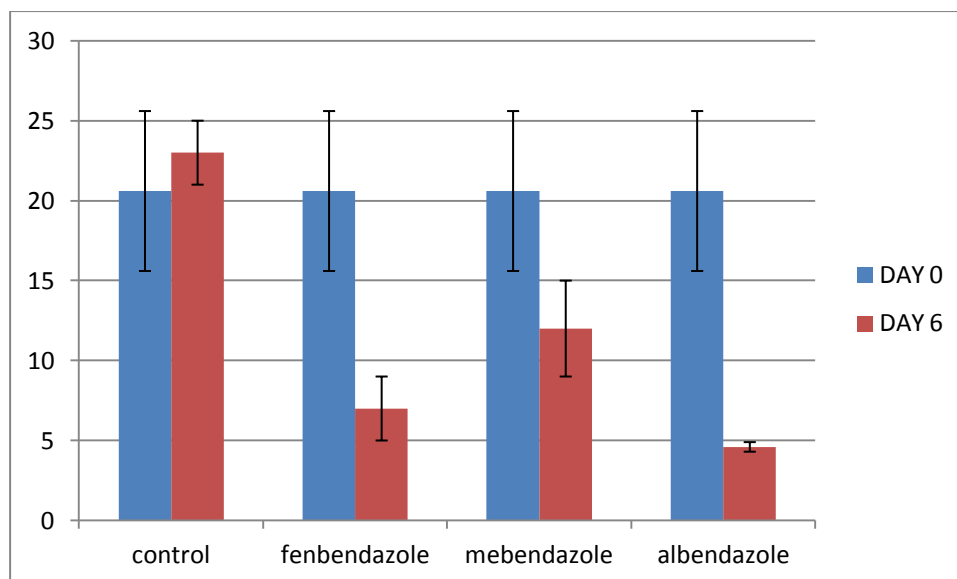
Σχήμα 3.4: Ποσοστό προσβολής παρασίτων μεταξύ των φαρμάκων-θεραπεία δια στόματος

3.1.5 Μέσος όρος των παρασίτων στα χέλια (*A. anguilla*) μετά από θεραπεία δια στόματος.

Στο Σχήμα 3.5 φαίνεται ο μέσος όρος παρασίτων στα χέλια (*A. anguilla*), όπως υπολογίστηκε από τις δειγματοληψίες μεταξύ των φαρμάκων και του μάρτυρα. Όπως φαίνεται και από τον σχήμα, τα παράσιτα μειώθηκαν την ημέρα 6 στα 3 φάρμακα καθώς επίσης και στον μάρτυρα.

Την ημέρα 0 της θεραπείας ο μέσος όρος παρασίτων στα χέλια για το φάρμακο fenbedazole, την albendazole, την mebendazole και τον μάρτυρα ήταν στο $20,6 \pm 5$.

Την ημέρα 6 της θεραπείας ο μέσος όρος των παρασίτων στα χέλια για το φάρμακο fenbedazole ήταν 7 ± 2 . Για το φάρμακο albendazole ήταν $4,6 \pm 0,3$, για την mebendazole ήταν 12 ± 3 ενώ για τον μάρτυρα έφτασε στα 23 ± 2 . Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων δεν έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων.



Σχήμα 3.5: Μέσος όρος παρασίτων μεταξύ των φαρμάκων-Θεραπεία δια στόματος

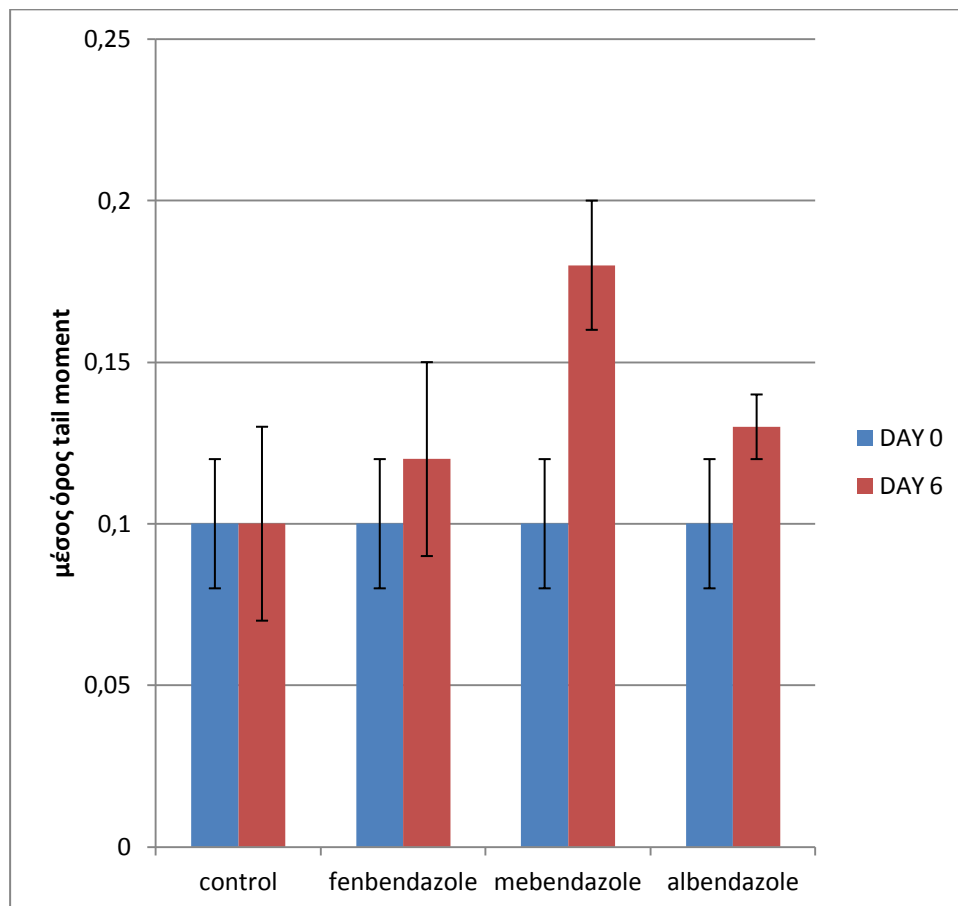
3.1.6 Μέσος όρος του μήκους ουράς των κομητών στα χέλια (*A. anguilla*)

μετά από θεραπεία δια στόματος.

Στο Σχήμα 3.6 φαίνεται ο μέσος όρος του μήκους ουράς των κομητών στα χέλια (*A. anguilla*), όπως υπολογίστηκε από τις δειγματοληψίες από την έναρξη ημέρα 0 μέχρι την ημέρα 16 για κάθε φάρμακο και για τον μάρτυρα.

Την ημέρα 0 της θεραπείας ο μέσος όρος του μήκους ουράς των κομητών στα χέλια για τα 3 φάρμακα όπως επίσης και για τον μάρτυρα ήταν στο $0,1 \pm 5$. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων δεν έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών μεταχειρίσεων.

Την ημέρα 6 της θεραπείας ο μέσος όρος του μήκους ουράς των κομητών στα χέλια για το φάρμακο fenbedazole ήταν $0,12 \pm 2$. Για το φάρμακο albendazole ήταν $0,13 \pm 0,3$, για την mebendazole ήταν $0,18 \pm 3$ ενώ για τον μάρτυρα έφτασε στο $0,1 \pm 2$. Η στατιστική επεξεργασία των δειγμάτων δεν έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των διατροφικών μεταχειρίσεων.



Σχήμα 3.6: Μέσος όρος tail moment μεταξύ των φαρμάκων δια στόματος

4. Συζήτηση

4.1 Θεραπείες των ψαριών από μονογενή τριματώδη

- Οι ασθένειες των ψαριών που οφείλονται σε παράσιτα είναι ιδιαίτερα σημαντικές, καθώς τα είδη των παρασίτων που ζουν σε βάρος εμπορικών ψαριών είναι χιλιάδες, ενώ ενδέχεται στο μέλλον να ανακαλυφθούν και άλλα (Φώτης & Αγγελίδης, 2003).
- Τα μονογενή είναι τα πιο κοινά και πολυπληθή εξωπαρασιτικά τριματώδη των ψαριών, με μεγαλύτερη ποικιλότητα ειδών να προκύπτει στις τροπικές σε σύγκριση με τις εύκρατες περιοχές του πλανήτη (Ramasamy *et al.*, 1995). Είναι εξωτερικά παράσιτα και παρατηρούνται σε όλες τις ομάδες ψαριών, αλλά έχουν μακράν μεγαλύτερη ποικιλότητα στους οστεϊχθύες, ενώ μόνο οχτώ οικογένειες έχουν καταγραφεί στους χονδριχθύες (Cribb *et al.*, 2002). Σύμφωνα με τους Euzet & Combes (1998) εκτιμάται ότι περισσότερο από το 95% των μονογενών απαντώνται ως παρασιτικές μορφές στο δέρμα και τα βράγχια των ψαριών. Οι παθολογικές αλλαγές που παρατηρούνται στον ξενιστή βασίζονται σε υπερπλασία της μεμβράνης των βραγχίων αλλά και σε νέκρωση και αποσύνθεση των ιστών στα σημεία όπου τα παράσιτα εισάγουν τα όργανα προσκόλλησης με τους ξενιστές.
- Στις ιχθυοκαλλιέργειες, οι ειδικές περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η υψηλή θερμοκρασία σε συνδυασμό με υψηλή ιχθυοφόρτιση και η κακή διαχείριση της εκτροφής ευνοούν εξάρσεις παρασιτισμού με αποτέλεσμα υψηλές θνησιμότητες.

4.2 Εφαρμογές της τεχνικής «ανάλυσης κομητών»

Κύριες εφαρμογές της μεθόδου είναι: α) η μελέτη του μηχανισμού βλάβης του DNA και της βιολογικής σημασίας αυτής, η καταγραφή των μεταλλαξιγόνων και των καρκινογόνων ουσιών *in vivo* και *in vitro*, ο έλεγχος της δράσης των αντιοξειδωτικών ουσιών, και ο συνδυασμός των παραπάνω για την εκτίμηση του στρες σε ζωντανούς οργανισμούς.

Ειδικότερα η μελέτη της επίδραση τοξικών ουσιών στο DNA υδρόβιων οργανισμών είναι σημαντική και συνδέεται με την καρκινογένεση. Μια διαδικασία η οποία περιλαμβάνει τη συσσώρευση πολλών γενετικών ανωμαλιών και οδηγεί στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επιπρόσθετα, μέσω των γενετικών κυττάρων, η υψηλή δραστηριότητα των τοξικών ουσιών συνεισφέρει στη δημιουργία κληρονομικών ανωμαλιών, στην τερατογένεση και επηρεάζει την προσαρμοστικότητα των ατόμων στο φυσικό τους περιβάλλον. Στους υδρόβιους εκτρεφόμενους οργανισμούς τα προβλήματα αναπαραγωγής είναι σημαντικότερα από τα προβλήματα που προκαλούνται λόγω καρκινογένεσης (Mitchelmore and Chipman, 1998) κυρίως για οικονομικούς λόγους, αλλά και για λόγους υγείας των καταναλωτών.

Ορισμένες εποχικές μεταβολές όπως για παράδειγμα, οι περιβαλλοντικές συνθήκες, η διαίτα και τα επίπεδα ορμονών στα άτομα είναι γνωστό ότι επηρεάζουν σημαντικά του ενζυμικούς μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την αποτοξίνωση τους. Η αξιολόγηση της τοξικότητας γενικά στους υδρόβιους οργανισμούς, είτε στο εργαστήριο, είτε στο πεδίο, γίνεται σε επίπεδο μορίων ή χρωμοσωμάτων. Η επίπτωση

μιας μετάλλαξης στο DNA είναι δύσκολο να προβλεφθεί εκτός αν αναλυθεί και μελετηθεί λεπτομερώς και επισταμένως η συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος. Επιπλέον η φύση των μεταλλαξιογόνων παραγόντων είναι δύσκολο να προσδιοριστεί. Από την άλλη, συγκεκριμένες καρκινογόνες – μεταλλαξιογόνες ουσίες είναι δυνατό να ανιχνευτούν με την χρήση αντισωμάτων. Αυτή η πληροφορία είναι ενδεικτική για τη μεταβολή στο DNA, αλλά μόνο υποθέσεις μπορούμε να κάνουμε για τις επιπτώσεις που θα επακολουθήσουν, βασιζόμενοι στις γνώσεις που έχουμε για την καρκινογένεση. Εξειδικευμένη ανίχνευση των μεταλλαξιογόνων ουσιών είναι δύσκολο να γίνει στο πεδίο, λόγω της πληθώρας των τοξικών ουσιών και των περιορισμένων γνώσεων που διαθέτουμε για το σύνολό τους (Mitchelmore and Chipman, 1998).

Για πολλά χρόνια ήταν γνωστό ότι έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες οδηγεί σε απώλεια της ακεραιότητας του DNA, και επομένως είναι σημαντικός ο υπολογισμός των θραυσμάτων των κλώνων του μορίου, ως δείκτη τοξικότητας (L. Shugart, 1990). Η δημιουργία θραυσμάτων συσχετίζεται με τις μεταλλαξιογόνες και καρκινογόνες ιδιότητες διαφόρων τοξικών ρυπαντών.

Οι μηχανισμοί που προκαλούν τη θραύση του μονόκλωνου ή δίκλωνου DNA, είναι πολλοί και διαφορετικοί. Όπως προαναφέρθηκε κερματισμός του DNA προκαλείται εκτός από την ιονίζουσα ακτινοβολία και στις ευαίσθητες σε αλκαλικό περιβάλλον περιοχές του DNA, με την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας, του ενεργού οξυγόνου, και άλλων δραστικών ενδιάμεσων χημικών προϊόντων. Επιπλέον είναι συχνή η δημιουργία θραυσμάτων κατά την επιδιόρθωση εκτομής. Κατά συνέπεια η μέτρηση των θραυσμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέσο εκτίμησης της τοξικότητας ενός ευρέως φάσματος τοξικών ουσιών που δρουν με τελείως διαφορετικούς τρόπους. Είναι σημαντική η παρατήρηση, ότι θραύσματα μπορούν να

δημιουργηθούν μέσω μηχανισμών που δε σχετίζονται απευθείας με την τοξικότητα των παραγόντων. Η ενεργοποίηση ενζύμων όπως οι ενδονουκλεάσες και οι τοποϊσομεράσες (μέσω της ενδοκυτταρικής αύξησης του ελεύθερου ασβεστίου [McConkey *et al.*, 1988]) ενδέχεται να προκαλούν τη θραύση του DNA. Το ίδιο αποτέλεσμα μπορεί να προκληθεί και από την αύξηση της συγκέντρωσης ενδογενών δραστικών ουσιών, όπως υπεροξειδία και μονοξειδίο του αζώτου.

Η ευαισθησία και το μεγάλο εύρος εφαρμογής της μεθόδου ανεξάρτητα της φύσης των τοξικών παραγόντων, σε πολλούς τύπων κυττάρων και σε όλους τους οργανισμούς από τα βακτήρια ως τον άνθρωπο, μπορεί να φανεί χρήσιμη και πρακτική δίνοντας της το συγκριτικό πλεονέκτημα σε σχέση με τις υπόλοιπες τεχνικές όπως π.χ. τη micronucleus assay (μικροπυρηνική ανάλυση).

4.3 Φάρμακα και αποτελεσματικότητα

Όσον αφορά την θεραπεία με μπάνιο, κατά την έναρξη του διατροφικού πειράματος, ο μέσος όρος παρασίτων και στα 3 διαφορετικά φάρμακα καθώς επίσης και στον μάρτυρα ήταν 34,33. Μέχρι την ημέρα 16 η ένταση των παρασίτων παρουσίασε μείωση ενώ για το φάρμακο albendazole τα παράσιτα εξαλείφθηκαν. Ο (Kang J. 2002) στην έρευνα του για την αντιμετώπιση τους παρασίτου scuticociliatosis, χρησιμοποίησε το φάρμακο albendazole για το ψάρι *Paralichthys olivaceus* έχοντας παρόμοια αποτελέσματα.

Το ποσοστό προσβολής των παρασίτων για το φάρμακο fenbendazole ήταν 100% καθόλη την διάρκεια του πειράματος. Ο (Park, 2009) που μελέτησε την επίδραση του αντίστοιχου φαρμάκου στην αντιμετώπιση του παρασίτου *trichostrongylus tenuis* για το βατράχι *Cophixalus riparius* κατέληξε στο συμπέρασμα ότι βοηθά στην μείωση των παρασίτων.

Ο μέσος όρος του μήκους ουράς των κομητών στα χέλια (*A. anguilla*) για την θεραπεία με μπάνιο δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών και μόνο την ημέρα 16 υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ του μάρτυρα και των φαρμάκων Mebendazole και Albendazole .Αυτό υποδηλώνει ότι η έκθεση στα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν για στην θεραπεία των παρασίτων δεν δημιούργησαν προβλήματα γενετοξικότητας στα χέλια. Στα ίδια συμπεράσματα κατέληξε και ο Weerd για έρευνα που πραγματοποίησε το 1998 για το χρόνιο stress των ψαριών.

Ο μέσος όρος του μήκους ουράς των κομητών στα χέλια (*A. anguilla*) δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών. Ο Tojo σε έρευνα που πραγματοποίησε το 1993, απέδειξε ότι το φάρμακο toltrazuril δεν απέδωσε έναντι των μονογενών παρασίτων δια στόματος καθώς η προσβολή παρέμεινε υψηλή. Σε αντίστοιχη έρευνα που πραγματοποίησε ο Goven το 1991 χρησιμοποιώντας nitroscanate δια στόματος, τα αποτελέσματα ήταν θετικά σε δόση 0,7 mg/l.

Ο Καθάριος το 2008 σε έρευνα για την αντιμετώπιση μονογενών παρασίτων σε εκτρεφόμενα ψάρια σε κλωβούς και δεξαμενές στην Κρήτη χρησιμοποιώντας μεμπενταζόλη και φορμόλη μείωσε τον αριθμό παρασίτων με πιο αποτελεσματική έρευνα αυτή της φορμόλης σε δοσολογία 200 ppm.

Ο Kim το 2000 σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε για την επίδραση του praziquantel στο παράσιτο *Microcotyle sebastil* για το ψάρι *Sebastes schlegeli* βρήκε ανάλογα αποτελέσματα όταν η δόση είναι στα 100 ppm.

Σε έρευνα για την αντιμετώπιση παρασίτων στην ιριδίζουσα πέστροφα *Oncorhynchus mykiss*, χρησιμοποιήθηκαν 5 φάρμακα (flubendazole, mebendazole, oxibendazole, parbendazole και triclabendazole) με πιο αποτελεσματικό την mebendazole (Szekely et.al, 1990) η οποία ήταν αποτελεσματική σε ποσοστό 100%.

4.3 Συμπεράσματα

Από την παρούσα έρευνα προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Το φάρμακο Albendazole αποδείχθηκε το πιο αποτελεσματικό μεταξύ των φαρμάκων στην μείωση των παρασίτων.
- Το φάρμακο Albendazole είναι υδατοδιαλυτό
- Το DMSO χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης στα φάρμακα mebendazole και fenbendazole.
- Η έκταση της βλάβης του DNA που προκλήθηκε σε όλες τις μεταχειρίσεις δε διέφερε από τον μάρτυρα
- Η θεραπεία είναι πιο αποτελεσματική ως μπάνιο παρά δια στόματος
- Η έκταση της βλάβης του DNA που προκλήθηκε σε όλες τις μεταχειρίσεις δε διέφερε από τον μάρτυρα.

4.4 Abstract

The fish that has been used in this study was the European eel (*Anguilla Anguilla*). For the needs of dietary experiment they've been used 82 eels (*Anguilla anguilla*) from unit intensive rearing eel. The fry were medium weight 9,68 g and transferred to the experimental station of the Department of Agriculture, Ichthyology and Aquatic Environment. Then they were placed in 4 glass capacity tanks (80L). The fish were feeding one time a day and were siphoning water for cleaning their excretions. In this experiment mortality and counting the number of dead fish parasites has been countered and then transferred into an airtight plastic bag. The treatments included five days bath with the respective drug, 5 days stopping and feeding only the control food and then sampling 5 fish for measuring parasites, blood and comet assay. The last piece of the experimental part was the administration of drugs through food by mouth with experiment lasts six days. In this food it has been placed 1 ml fish oil and shuffled with drugs which had the form of powder. Treatment lasted six days and consumed 0.6 feed gr. In conclusion, Albendazole medicine proved to be the most effective among the drugs in reducing parasites. DMSO was used as solvent drug for mebendazole and fenbendazole. The extent of the DNA caused in all treatments damage did not differ from control. The treatment with bath is more effective than oral bathroom. The extent of DNA damage caused in all the treatments did not differ from control.

5 Βιβλιογραφία

5.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., and Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175:184–191.2).
- Sauvaigo, S., Serres, C., Signorini, N., Emonet, N., Richard, M. J., and Cadet, J. (1998). Use of the single cell gel electrophoresis assay for the immunofluorescent detection of specific DNA damage. *Analytical Biochemistry*, 259:1–7.
- Collins, A. R., Duthie, S. J., and Dobson, V. L. (1993). Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14:1733–1735.
- Pfuhrer, S. and Wolf, H. U. (1996). Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27:196–201.
- Olive, P. L. (1989). Cell proliferation as a requirement for development of contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiation Research*, 117:79–92.

- Munger C., Hare L., Craig A. and Charest P-M. (1999). Influence of exposure time on the distribution of cadmium within the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. *Aquatic Toxicology*, 44:195-200.
- Mitchelmore CL, Chipman JK. (1998). DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research*, 399: 135–147.
- Merk, O. and Speit, G. (1998). Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 32:260–268.
- McKelvey-Martin V.J., Green M.H.L., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., De Meo M.P. and Collins A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research*, 288 :47-63.
- McConkey D.J., Hartzell P., Nicotera P., Wyllie A.H., Orrenius S. (1988). Stimulation of endogenous endonuclease activity in hepatocytes exposed to oxidative stress, *Toxicology Letters*, 42:123–130.
- Hartmann, A., Herkommer, K., Glóck, M., and Speit, G. (1995). The DNA-damaging effect of cyclophosphamide on human blood cells in vivo and in vitro studied with the single cell gel test (SCG). *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 25:180–187.

- Fuscoe, J. C., Afshari, A. J., George, M. H., et al. (1996). In vivo genotoxicity of dichloroacetic acid: evaluation with the mouse peripheral blood micronucleus assay and the single cell gel assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27:1–9.
- Dennog, C., Hartmann, A., Frey, G., and Speit, G. (1996). Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy. *Mutagenesis* 11: 605–609.
- Santos, S. J., Singh, N. P., and Natarajan, A. T. (1997). Fluorescence in situ hybridization with comets. *Experimental Cell Research*, 232:407–411.
- Deedler C.L 1984.Synopsis of biological data on the eel *Anguilla Anguilla*.FAO Fish Synop.(80 Rev.1) 73 p.
- Wirth T.&L. Bernatchez 2001.Genetic evidence against panmixia in the European eel.Nature 409 (6883):1037-1039.
- McCleave,J.D.,P.J.Brickley 1998.Do leptocephali of the European eel swim to reach continental waters?Status of the question J.Mar.Biol.Assoc.U.K78(1):4-11
- Noga E.2000,Fish Disease,Diagnosis and Treatment,Blackwell Publishing,North Carolina.
- Schnick RA, Gingerich WH, Dawson VK, Stehly GR, Griffin BR (1995). *Approval of Drugs for Public Fish Production. International Association of*

Fish and Wildlife Agencies (IAEWA) Project. Study No. 5: Sarafloxacin, IAFWA, 1995.

- Stephen C, Iwama G (1998). *Salmon Aquaculture Review*. Fish Health Discussion Paper. Part C. Environmental Assessment Office (EAO). University of British Columbia, Canada.
- Stoffregen DA, Bowser PR, Babish JG (1996). Antibacterial Chemotherapeutants for Finfish Aquaculture: A Synopsis of Laboratory and Field Efficacy and Safety Studies. *Journal of Aquatic Animal Health*, 8: 181-207.
- Barson MI, M. Atridah, N. Hwitiwa, Tamuka Investigation of a parasitic outbreak of *Lernaea cyprinacea* Linnaeus (Crustacea: Copepoda) in fish from Zimbabwe, 2008
- Blair B, Method of treatment of protozoan infections in fish, (2003),
- Weerd J.H. & Van Komen J. (1998). The effects of chronic stress on growth in fish: A critical appraisal. *Comparative Biochemistry and Physiology* 120: 107-112.

- Szekely C. Molnar K (1990) Treatment of *Ancylostoides vistulensis* monogenean infestations of the European catfish (*Silurus glanis*). Bull Eur Assoc Fish Pathol 10 (3):74-77
- Tojo JL. Santamarina MT. Ubeira FM, Estevez J, Leiro J. Sanmartin ML (1993a) Efficacy of anthelmintic drugs against gyrodactylosis In rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Bull Eur Assoc Fish Pathol 13(2): 45-58
- Goven BA, Amend DF (1982) Mebendazole/trichlorfon combination: a new anthelmintic for removing monogenetic trematodes from fish. J Fish Biol 20(4):373-378
- Schneider J (1994). Problems related to the usage of veterinary drugs in aquaculture-a review. *Quimica Analytica*, Suppl. 1 : S34-S42.
- Ruitter A, Scherpenisse P, Hajee CAJ. (1996). *Analysis of Drug Residues in Fish*. In Haagsma N, Ruitter A, Czedik-Eysenberg PB, (eds). Proceedings of the EuroResidue III Conference, Veldhoven, The Netherlands, pp 87-98.
- Sarusic G. Preliminary report of infestation by isopod *Ceratohoa oestroides* (Risso, 1826) in marine cultured fish. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 1999, 19(3): 110-112.

- Schnick RA, Gingerich WH, Dawson VK, Stehly GR, Griffin BR (1995). *Approval of Drugs for Public Fish Production. International Association of Fish and Wildlife Agencies (IAEWA) Project. Study No. 5: Sarafloxacin*, IAFWA, 1995.
- Stephen C, Iwama G (1998). *Salmon Aquaculture Review*. Fish Health Discussion Paper. Part C. Environmental Assessment Office (EAO). University of British Columbia, Canada.
- Stoffregen DA, Bowser PR, Babish JG (1996). Antibacterial Chemotherapeutants for Finfish Aquaculture: A Synopsis of Laboratory and Field Efficacy and Safety Studies. *Journal of Aquatic Animal Health*, 8: 181-207.
- Ramasamy, P., Brennan, G.P., Halten, D.W. (1995). Ultrastructure of the Surface Structures of *Allodiscocotyla diacanthi* (Polypisthocotylea: Monogenea) from the Gills of the Marine Teleost Fish, *Scomberoides tol*, 25: 43-54.
- Ramasamy, P., Ramalingam, K., Hanna, R.E.B. & Halton, D.W. (1985). Microhabitats of gill parasites (Monogenea and copepoda) of Teleosts (*Scomberoides* spp.). *International Journal for Parasitology*, 15 (4): 385-397.
- Cribb, T.H., Chisholm, L.A. & Bray, R.A. (2002). Diversity in the Monogenea and DigeneaQ does lifestyle matter?. *International Journal of Parasitology*, 32: 321-328.

- Thoney, D. A., and Hargis, W. J., 1991. Monogenea (Platyhelminthes) as hazards for fish in confinement. *Annual Review Fish Diseases*, 133-153.
- Euzet, L. & Combes, C. (1998). The selection of habitats among the monogenea. *International Journal for Parasitology*, 28: 1645-1652.
- Kang J., Dong S., Evaluation of treatment efficacy of doxycycline and albendazole against scuticociliatosis in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) *Volumes 416–417*, 5 December 2013, Pages 192–195

5.2 Ελληνική βιβλιογραφία

- EMEA (2002). *Informal consolidation of the Annexes I to IV to Council Regulation (EEC) No 2377/90*. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines Evaluation Unit, 24 January 2002.
- ΕΟΦ (2001). *Φάρμακα νοσημάτων των ιχθύων. Κεφάλαιο 14. Κτηνιατρικό Συνταγολόγιο. Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων*. Pharmametrika Prinshop, σελ. 281-282.
- Πνευματικάτου Η., 1996 *Ιχθυοτροφία και Ιχθυοπαθολογία*, Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.

- Καθάριος Παντελής, Παπανδρουλάκης Νίκος, Craig Hayward, Ασδέρης Μιχάλης, Divanach Pascal Παρασιτικοί Μονογενείς σε καλλιεργούμενα ψάρια στην Κρήτη. Τρόποι αντιμετώπισης. Ινστιτούτο Υδατοκαλλιεργειών, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε
- Φώτης, Γ. & Αγγελίδης, Π. (2003). Ιχθυοπαθολογία: Παρασιτικά νοσήματα Ιχθύων. Στο: Εκτροφή και Παθολογία Ιχθύων. Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη: 1-430
- Τυρπένου ΑΕ (2002). Υδροχρωματογραφικός προσδιορισμός των καταλοίπων της υδροχλωρικής σαραφλοξακίνης μετά από χορήγηση αυτής με την τροφή σε εκτρεφόμενες τσιπούρες. Διδακτορική διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Σχολή Γεωτεχνικών Επιστήμων. Τμήμα Κτηνιατρικής- Τομέας Υγιεινής και Τεχνολογίας Τροφίμων Ζωικής Προελεύσεως.
- Κλαουδάτος Σπύρος (2005)., Πανεπιστημιακές Παραδόσεις του Μαθήματος Υδατοκαλλιέργειες Ι, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Γεωπονίας Ζωικής Παραγωγής και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Βόλος

