

RIJKSINSTITUUT VOOR VISSERIJONDERZOEK

Haringkade 1 - Postbus 68 - 1970 AB IJmuiden - Tel.: +31 2550 64646

Afdeling: Aquakultuur

Rapport: AQ 91 - 08

Een overzicht van het onderzoek naar de bestrijding van de zwemblaasworm, *Anguillicola crassus*, in aalmesterijen.

Auteur: A. Kamstra

Project: 60.026 Bestrijding aalparasiet
Projectleider: Ir. A. Kamstra
Datum van verschijnen: oktober 1991

INHOUD

blz

1	Inleiding.....	1
2	De huidige stand van zaken met betrekking tot de zwemblaasworm in aalmesterijen	1
3	Samenvatting en conclusies.....	2
4	Literatuur.....	2

- Bijlage 1 A. Kamstra. *Anguillicola* in Dutch eel farms; current state. (8 pag.)
Bijlage 2 O.L.M. Haenen, L. Grisez, D. De Charleroy, C. Belpaire en F. Ollevier. Experimentally induced infections of European eel *Anguilla anguilla* with *Anguillicola crassus* (Nematoda, Dracunculoidea) and subsequent migration of larvea. (5 pag.)
Bijlage 3 L. Grisez. Bestrijdingsproeven op *Anguillicola crassus*. (11 pag.)
Bijlage 4 G. Geets en E.W. Liewes. Verslag *Anguillicola* onderzoek bij Texvis BV. (38 pag.)
Bijlage 5 J.W. Resink. Onderzoek naar mogelijke orale behandelingsmethoden van de zwemblaasnematode (*Anguillicola crassa*) bij kweekaal. (21 pag.)

1. INLEIDING

De problemen die in 1987 op enkele aalmesterijen werden gesignaleerd met de zwemblaasworm, *Anguillicola crassus*, waren toendertijd aanleiding voor de oprichting van een 'ad hoc' werkgroep door het RIVO waarin de mogelijkheden tot bestrijding van de zwemblaasworm in aalmesterijen zijn bestudeerd. In de werkgroep zijn een aantal onderzoekslijnen uitgezet die door de verschillende instituten en bedrijven verder zijn uitgewerkt. De grote lijnen en de deelnemers aan het betreffende onderzoek zijn onderstaand vermeld:

- *biologie van de parasiet, interactie aal-parasiet*
 - . Centraal Diergeneeskundig Instituut (CDI)
 - . Universiteit van Leuven
 - . Landbouwniversiteit Wageningen (LUW)
- *bestrijding zwemblaasworm middels anthelmintica*
 - . Texvis BV (zeewater, badbehandelingen)
 - . Trouw & Co (zoetwater, via voer)
 - . Janssen Farmaceutica
- *bestrijding tussengastheer*
 - . Catvis
 - . Palingkwekerij Kerkdriel
 - . Duphar
 - . Rijksinstituut voor Visserijonderzoek (RIVO)

Het onderzoek is financieel ondersteund door het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij.

De resultaten van het onderzoek zijn reeds naar de sector doorgesluisd via lezingen (NGvA) en publikaties in vaktijdschrijften (zie Aquacultuur nieuws 4(2)). Een aantal engelstalige stukken en deelrapporten zijn echter pas onlangs verschenen. Om aan de recente vraag om informatie tegemoet te komen en om één en ander formeel af te ronden, is besloten deze bundeling van deelrapportages uit te geven.

In een aantal gevallen is er enige overlap tussen de verschillende bijlagen. Zo is bijlage 1 een gedeeltelijke samenvatting van de bijlagen 4 en 5. Zoals gezegd zijn de belangrijkste resultaten reeds in verkorte vorm gepubliceerd.

Naast de deelrapporten is tevens een lijst bijgevoegd met relevante literatuur.

Tevens is een korte inventarisatie gemaakt van de huidige stand van zaken met betrekking tot de zwemblaasworm.

In hoofdstuk 3 worden de belangrijkste resultaten en conclusies nog eens samengevat.

2. DE HUIDIGE STAND VAN ZAKEN MET BETREKKING TOT DE ZWEMBLAASWORM IN AALMESTERIEN.

De zwemblaasworm, *Anguillicola crassus*, werd in 1985 voor het eerst in Nederland aangetroffen door Van Banning *et al* (1985) in natuurlijke aalpopulaties. Omdat op dat moment 4 van de 6 aalmesterijen met pootvis afkomstig uit het binnenwater werkten, kon de parasiet zich ook naar aalmesterijen verspreiden. Vrij snel na de besmetting zijn een aantal mesterijen met zwemblaasworm om diverse redenen gestopt terwijl één mesterij volledig ontsmet is. De afgelopen jaren is het gebruik van wilde pootaal praktisch volledig verdrongen door opkweek van pootvis vanuit glasaal. Omdat de glasaal die wordt geïmporteerd in principe 'schoon' is, wordt de parasiet in gekweekte pootvis niet aangetroffen.

Recentelijk is de parasiet, voor zover wij kunnen overzien, toch op een vijftal aalmesterijen geïntroduceerd middels besmette pootvis. De parasiet is waarschijnlijk via grotere gepigmenteerde aal, die met de glasaal wordt meegevangen, geïmporteerd.

Helaas is er binnen de sektor bijzonder weinig openheid over de hele gang van zaken, waardoor de omvang van het probleem (als dat er al is) moeilijk valt te beoordelen. De effecten op groei en voederconversie lijken gering, ook al gezien het feit dat de parasiet vaak bij toeval wordt ontdekt. Over het algemeen wordt de parasiet en/of tussengastheer bestreden volgens in het verleden ontwikkelde methoden. Over de effectiviteit van de bestrijding is momenteel niets te zeggen. Er is momenteel een commerciële cocktail van middelen verkrijgbaar waar bevredigende resultaten mee zijn geboekt (Blom, pers. meded.).

In Denemarken zijn momenteel slechts 5 van de in totaal 50 aalmesterijen met zwemblaasworm besmet (Hendriksen pers. meded.). Deze besmettingen zijn traceerbaar naar één pootvis-leverancier en ook hier waarschijnlijk tot stand gekomen via grotere aal tussen de glasaal. Om de verspreiding van de parasiet tegen te gaan, worden met name zout-behandelingen (0.5-1.0 %) voor een duur van enkele maanden toegepast. Door deze methode wordt het aantal tussengastheren (copepoden) sterk beperkt, waardoor naar verluidt de prevalentie van de parasiet sterk afneemt. In Denemarken wordt de parasiet momenteel dan ook niet als een probleem gezien.

3. SAMENVATTING EN CONCLUSIES.

- Er zijn tot nu toe geen aanwijzingen dat *Anguillicola* via glasaal in aalmesterijen geïntroduceerd kan worden. Grotere gepigmenteerde exemplaren die gelijk met de glasaal worden ingenomen zijn waarschijnlijk dragers.
- Controle van aangekochte glasaal en pootvis blijft veelvuldig achterwege, waardoor de parasiet in een aantal mesterijen, waar in principe vanuit glasaal wordt gewerkt, in Nederland en Denemarken is geïntroduceerd. Er zijn geen aanwijzingen dat de parasiet daar significante schade veroorzaakt. In het verleden zijn slechts bij zeer zware besmettingen negatieve gevolgen voor de aal geconstateerd.
- *Anguillicola* kan zich in aalmesterijen snel vermenigvuldigen middels de veelvuldig voorkomende tussengastheer *Paracyclops fimbriatus*. De volledige cyclus van *Anguillicola* kan zich binnen 2 maanden voltrekken.
- Aangetoond is dat *Anguillicola* in de zwemblaas met name bestreden kan worden met Levamisole (via voer of bad). Hoewel duidelijke effecten van Levamisole op de parasiet gemeten kunnen worden is volledige afdoding en verwijdering van de parasiet uit de zwemblaas niet aangetoond.
- Afdoding van de vrijzwemmende larve is problematisch door de goede bescherming die de larve geniet door een chitineuze wand en het feit dat ze geen voedsel opneemt. Door verhoogde saliniteit en temperatuur kan de levensduur van de larve echter sterk bekort worden.
- Bestrijding van de tussengastheer is mogelijk langs chemische weg (diflubenzuron), hoewel dit niet de voorkeur geniet vanwege residu-vorming. Een langdurige zoutbehandeling lijkt een interessant alternatief waar beter naar gekeken zou moeten worden. Door aanpassingen in het systeem (filtratie) en management ('schoonhouden' van systeem) kan de hoeveelheid copepoden eveneens beperkt worden.

4. LITERATUUR

- Belpaire, C., De Charleroy, D., Grisez, L., Ollevier F. (1989a). Spreading mechanisms of the swim bladder nematode *Anguillicola crassus* in the European eel *Anguilla anguilla*, and its distribution in Belgium and Europe. European Inland Fisheries Advisory Commission (FAO). Working Party on Eel. Porto, Portugal, May 29th - June 3rd 1989.
- Belpaire, C., De Charleroy, D., Thomas, K., Van Damme, P., Ollevier, F. (1989b). Effects of eel restocking on the distribution of the nematode *Anguillicola crassus* in Flanders, Belgium. J. appl. Ichthyol. 5(3): 151-154.

- Boon, J.H., Augustijn, H., Cannaerts, V.M.H., Lokin, C.J.A., Machiels, M.A.M. en Ollevier, F. (1990). The suitability of experimental inoculations with infective larvae of Anguillicola crassus and their effects on the growth and mortality of the European eel (Anguilla anguilla). *Aquaculture*, 87: 111-120.
- Boon, J.H., Cannaerts, V.M.H., Augustijn, H., Machiels, M.A.M., De Charleroy, D. and Ollevier, F., 1990. The effect of different infection levels with infective larvae of Anguillicola crassus on haematological parameters of European eel (Anguilla anguilla). *Aquaculture*, 87: 243-253.
- Boon, J.H., Lokin, C.J.A., Ceusters, R. and Ollevier, F., 1989. Some properties of European eel (Anguilla anguilla) and the possible relationship with Anguillicola crassus infestations. *Aquaculture*, 76: 203-208.
- Canestri-Trotti, G. (1987) Occurrence of the nematode Anguillicola crassa, Kuwahara, Niimi & Itagaki, 1974 in eels from the Po delta, Italy. *Bull. Eur. Ass. Fish. Path.* 7(5): 109-111.
- Cannaerts, V. (1989). Interactie van Anguillicola crassus, met enkele typische reservoir-gastheren en de eindgastheer, Anguilla anguilla. M. Sc. dissertation. Catholic University of Leuven, Belgium.
- De Charleroy, D., (1986). Parasitologisch onderzoek van de Europese paling Anguilla anguilla L. M. Sc. dissertation. Catholic University of Leuven, Belgium.
- De Charleroy, D., Grisez, L., Thomas, K., Belpaire, C., Ollevier, F. (1989). The life cycle of Anguillicola crassus (Kuwahara, Niimi and Itagaki). *Proceedings F.H.S./A.F.S. International Fish Health Conference, Vancouver*. *J. Aquat. Anim. Health*: (in press).
- De Charleroy, D., Thomas, K., Belpaire, C. (1987). Problems concerning the species determination, biology and diagnostic methods of Anguillicola, a swim bladder nematode in the European eel (Anguilla anguilla L.). *European Inland Fisheries Advisory Commission (FAO). Working Party on Eel*. Bristol, UK, April 13-16 1987.
- De Charleroy, D., Thomas, K., Belpaire, C., Ollevier, F. (1989). The viability of the free living larvae of Anguillicola crassus. *J. appl. Ichthyol.* 5(3): 154-156.
- Dekker, W. (1989). Anguillicola crassus in de Nederlandse binnenwateren. *Aquacultuur* 4(2): 14-20.
- Dekker, W. and Van Willigen, J., 1987. Short note on the distribution and abundance of Anguillicola in The Netherlands. *European Inland Fishery Advisory Commission (FAO), Report Eel Working Group*, Bristol, April 1987 (mimeogr. rep), 9 pp.
- Dupont, F., Petter, A.J. (1988). Anguillicola, une épizootie plurispécifique en Europe. Apparition d'Anguillicola crassa (Nematoda, Anguillicolidae) chez l'Anguille européenne (Anguilla anguilla) en Camargue, Sud de la France. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 308: 38-41.
- Grisez, L. (1988). Studie van de parasitaire zwemblaasnematode Anguillicola crassus, bij de Europese paling, Anguilla anguilla. M. Sc. dissertation. Catholic University of Leuven, Belgium.
- Geets, A., Liewes, E.W., Ollevier, F. The efficacy of some anthelmintics against Anguillicola crassus, a swimbladder nematode of eel. (in press).
- Haenen, O.L.M. en Van Banning P., (1990). Detection of larvae of Anguillicola crassus (an eel swimbladder nematode) in freshwater fish species. *Aquaculture*, 87: 103-109.
- Haenen, O.L.M. en Van Banning P., (1990). Aspecten van de zwemblaasworm Anguillicola crassus. *Dier- en -arts juni/juli 1990*: 147-152.
- Haenen, O.L.M. en Van Banning P., (1991). Experimental transmission of Anguillicola crassus (Nematoda, Dracunculoidea) larvae from infected prey fish to the eel Anguilla anguilla. *Aquaculture* 92: 115-119.
- Haenen, O.L.M., Grisez, L., De Charleroy, D., Belpaire, C., Ollevier, F. (1989). Experimentally induced infections of the European eel (Anguilla anguilla) with Anguillicola crassus (Nematoda, Dracunculoidea) and subsequent migration of

- Haenen, O.L.M., Grisez, L., De Charleroy, D., Belpaire, C., Ollevier, F. (1991). Artificial infection of the European eel, Anguilla anguilla L., with L-III larva of Anguillicola crassus (Nematoda, Dracunculoidea). Proc. FHS/AFS Int. Fish Health Conf., July 18-21, Vancouver. J. Aquatic Animal Health, 1991 (in press).
- Hirose, H., Sekino, T. and Egusa, S., 1976. Notes on the egg deposition, larval migration and intermediate host of the nematode Anguillicola crassus parasitic in the swimbladders of eels. Fish. Pathol., 11: 27-31 (in Japanese with English summary).
- Kamstra, A. (1989). Bestrijding van Anguillicola crassus in aalmerstrijen. Aquacultuur 4(2): 33-38.
- Kamstra, A. (1990). Anguillicola in Dutch eel farms; current state. Int. Revue ges. Hydrobiol. 75(6): 867-874.
- Koops, H. (1986). Untersuchungen zum Befall von Farmaalen mit Anguillicola. Inf. Fischwirt 4: 174-177.
- Koops, H. and Hartman, F., 1989. Anguillicola infestations in Germany and in German eel imports. J. Appl. Ichthyol., 1: 41-45.
- Kuwahara, A., Niimi, A., Itagaki, H., (1974). Studies on the nematode parasitic in the air bladder of eel. I. Description of Anguillicola crassa n. sp. (Philometridea, Anguillicolidae). Jap. J. Parasit. 23: 275-279.
- Liewes, E.W., Schaminee-Main, S. (1987). Onderzoek aalparasiet vordert. Aquacultuur, 2^e jaargang, 4: 5-17.
- Liewes, E.W., Schaminee-Main, S. (1987). Onderzoek naar de effecten van de parasiet Anguillicola crassa op de ontwikkeling van de paling (Anguilla anguilla) in een zout water palingmerstrij. Internal report, Texvis BV, Den Burg, Texel, The Netherlands.
- Moravec, F., Taraschewski, H. (1988). Revision of the genus Anguillicola Yamaguti, 1935 (Nematoda: Anguillicolidae) of the swimbladder of eels, including descriptions of two new species, A. novaezelandiae sp. n. and A. papernai sp. n. Folia Parasitol. (Prague) 35: 125-146.
- Neumann, W. (1985). Schwimmblasenparasit Anguillicola bei Aalen. Fischer und Teichwirt 11: 322.
- Paggi, L., Orecchia, P., Minervini, R., Matiucci, S. (1982). Sulla comparsa di Anguillicola australiensis Johnston et Mawson 1940 in Anguilla anguilla del Lago di Bracciano. Parasitologia, Leningrad 24: 139-144.
- Peters, G., Hartmann, F. (1986). Anguillicola, a parasitic nematode of the swim bladder spreading among eel populations in Europe. Dis. aquat. Org. 1: 229-230.
- Puqin, W. en Yuru, Z. (1980). Observations on the life history of Anguillicola globiceps (Nematoda, Anguillicolidae). Acta zool. sin. 26: 243-249.
- Taraschewski, H., Moravec, F., Laham, T. and Anders, K., 1987. Distribution and morphology of two helminths recently introduced into European eel populations: Anguillicola crassus (Nematode, Dracunculoidea) and Paratenuisentis ambiguus (Acanthocephala, Tenuisentidae). Dis. Aquat. Org., 3: 167-176.
- Taraschewski, H., Renner, C., Melhorn, H. (1988). Treatment of fishes 3. Effects of Levamisole-HCl, Metrifonate, Febendazole, Mebendazole and Ivermectin on Anguillicola crassus (Nematoda) pathogenic in the air bladder of eels. Parasitology Research 74: 281-289.
- Thomas, K. (1987). Aspekten van de levenscyclus, soortproblematiek en verspreiding van Anguillicola sp. in Vlaanderen, 139 pag. Eindverhandeling, KULeuven, België.
- Thomas, K. (1989). De levenscyclus van Anguillicola crassus. Aquacultuur 4(2): 6-10.
- Thomas, K. en Ollevier, F. (1989). Aspects of the life cycle of Anguillicola crassus. IV European Association of Fish Pathologists International Conference. Santiago de Compostela, Spain. September 24-28.

- Thomas, K. en Ollevier, F. (1991). Epidemiology in Belgian waters of the swimbladder nematode Anguillicola crassus, parasitic in the European eel (Anguilla anguilla L.). Third International Symposium on problems of Fish Parasitology, Petrozavodsk, USSR, August 14-21, 1991.
- Sarti, M. Georgetti, G. en Brisinelle, W., 1985. A new problem for intensive eel rearing in Italy: Anguillicola australiensis. Proc. E.A.F.P. Congress, Montpellier, September 1985, p. 95.
- Van Banning, P. and Haenen, O.L.M., 1990. Effects of the swimbladder nematode Anguillicola crassus in wild and farmed eel Anguilla anguilla. In: F.O. Perkins and T.C. Cheng (Editors), Pathology in Marine Science: Proc. 3rd Int. Coll. on Pathology in Marine Aquaculture, Gloucester Point, USA, Oct. 1988. Academic Press, New York, NY, pp. 317-330.
- Van Banning, P., Heermans, W., Van Willigen, J.A. (1986). Anguillicola crassa, een nieuwe aalparasiet in de Nederlandse wateren. Visserij 38: 237-240.
- Wang, P., Zhao, Y. (1980). Observations on the life history of Anguillicola globiceps (Nematoda: Anguillicolidae). Acta zool. sin. 26: 243-249.

Int. Revue ges. Hydrobiol.	75	1990	6	867-874
----------------------------	----	------	---	---------

A. KAMSTRA

Netherlands Institute for Fisheries Investigations (RIVO). Postbus 68, 1970 AB IJmuiden.
The Netherlands

Anguillicola in Dutch Eelfarms; Current State

key words: *Anguillicola crassus*, eelfarms, pathology, intermediate host, treatment

Abstract

Anguillicola crassus was introduced into Dutch eelfarms by infected stocking material originating from inland fisheries. Within farms, suitable intermediate hosts for transmission of the parasite are available and uninfected stock becomes rapidly infected. In farming situations, only very heavy infections with the parasite can cause significant damage to fish, mainly by secondary infections. Treatment of fish infected with *A. crassus* is possible with L-Levamisole as a bath treatment or mixed with the feed, which results in complete immobilisation of the nematode. Transmission of the infection within farms can be controlled by keeping populations of copepods low. This can be accomplished by avoiding accumulations of organic matter within systems and/or control with chemical means. It can be stated that *Anguillicola crassus* does not pose the threat to intensive eel culture it once seemed to be.

1. Introduction

The swimbladder parasite, *Anguillicola crassus*, was first reported in Dutch eel-stocks by VAN BANNING *et al.* (1985) in 1985. Since 4 out of 6 eelfarms at that time were using fingerling eel caught by fishermen as stocking material, this parasite was rapidly introduced into eelfarms. Farms trying to change to uninfected stocking material soon noticed that these fish were rapidly contaminated by infected fish at the farm itself. In the beginning of 1987 eelfarms infected with *A. crassus* reported serious damage caused by this parasite (LIEWES, 1987). Therefore a research programme was initiated by RIVO in which several research groups and eelfarms participated. The programme was aimed at finding practical means to control the parasite in eelfarms, within a short period of time. This paper reports on the effects of *A. crassus* on eelfarming and secondly on treatment of infected fish and control of transmission of the parasite within eelfarms.

2. Pathology and Effects of Infection with *A. crassus* on Eelfarms

EGUSA (1979) first described the effects of *A. crassus* on European eel (*Anguilla anguilla*). He noted that European eel in Japanese pond culture is very sensitive for this parasite. At heavy infection levels, of more than 30 nematodes per fish, fish showed loss of appetite and became emaciated. SAROGLIA (1985) reported on problems with this parasite after introduction into Italian eelfarms.

LIEWES (1987) reported elevated mortalities of 10 to 20 % and a loss of growth of 20 to 30 % in infected stocks. It must be noticed however, that reports of loss of growth are very hard to validate. Quality and performance of "wild caught" fingerlings is by its nature very unpredictable and even perfectly healthy stocks can give a bad growth performance for unknown reasons.

The experiments with treatment of infected fish, on which we will report in more detail in the following pages, show (Table 2) even in untreated control batches growth rates of 1 %/day. Of these fish about 80 % were infected with *A. crassus* and belonged to infection stage 2 or 3 (stages described below).

LIEWES (1987) described several stages of the infection with *A. crassus* in eel based on observations in an eelfarm with a seawater recirculation system:

- stage 1. Swimbladder normal and without nematodes.
- stage 2. Swimbladder normal but containing a few nematodes.
- stage 3. Swimbladder enlarged and partly filled with red-brown fluid. Swimbladder wall can be inflamed.
- stage 4. Swimbladder much enlarged and filled with red-brown fluid. In this stage actively moving nematode larvae (L_2) can be noticed.
- stage 5. Rupture of the swimbladder wall or ductus pneumaticus which is highly irritated. Secondary infections of surrounding tissues are externally visible as a swollen and inflamed abdomen.
- stage 6. In this stage the swimbladder wall (possibly after rupture) is replaced by a thick layer of connective tissue. In the swimbladder remainders of the nematodes can be found.
- stage 7. The swimbladder is replaced by a hard brown-black mass in which remainders of the nematodes can be found.

The sequence between the different stages is not completely clear. The stages 1 to 4 are probably in the right order. Stage 5 can be, very likely, followed by death. In the stages 1 to 4 the fish are still feeding. LIEWES (1987) noted that from stage 3 on all infected fish show pale livers. These findings could be confirmed by VAN BANNING (unpublished results) in samples from a freshwater eelfarm.

Risks of secondary infection are high under conditions of intensive culture. This may explain why, under intensive culture conditions, the course of this infection can show such serious signs that are normally not encountered in wild eel stocks.

From the evidence mentioned above it can be concluded that results thus far indicate that significant reductions of growth are not to be expected as long as fish are feeding and external signs of infection, like a swollen abdomen or an inflamed anal region, are lacking.

At the moment 3 out of a total of 14 eelfarms have fish infected with *A. crassus*. These farms with infected stock are still using "wild-caught" fingerlings and have infrequently imported infected fish into their systems. The percentage of fish infected is generally below 25 % and no adverse effects are noted at the moment. With the means described below farmers with infected stock are able to control transmission of the nematode within their farm.

3. Treatment of Infected Fish

The research to find effective treatment for infected fish has been directed at the testing of several antihelmintics developed for veterinary use with cattle. These medicines need to have the following characteristics:

- effective against bloodsucking nematodes,
- easily resorbed by the fish and giving substantial levels in the blood,

- leave no residues,
- have no toxicity for fish.

Research on the treatment of infected fish has been performed at the eelfarm "Texvis" in seawater and by the feedmanufacturer Trouw & Co in freshwater.

The treatments tested at Texvis were generally applied by a bath treatment. The advantage of this method is that the medication reaches all individuals and not only the individuals feeding. At Texvis the medication tested was first screened with small batches of eel on toxicity for the fish.

Subsequently, batches of 10 to 20 eels were treated while an untreated batch of fish was also examined. At a later stage larger samples had to be used because the percentage of infected fish started to decline at the farm. Some of the more promising treatments were tested on a larger scale. At the end of the experiments fish were weighed, examined for any pathological signs and number, stage and condition of the nematodes were recorded.

Motility of the nematodes was tested by putting an individual into a petri-disk which was slowly heated on the underside. Table 1 gives the tested treatments and their results.

Table 1. Treatments tested at Texvis with the results

Treatment	Method	Conc.	Duration days	Effect on <i>A. crassa</i>	Toxicity LC-50
Ivermectine	bath	0.18 µg/l	—	—	30 h
Safewormer	bath	0.8 g/l	5	none	—
"	"	2.4 g/l	5	none	—
Oxfendazole	bath	1.4–22.7 mg/l	5	±	—
"	"	20 mg/l	1	±	—
"	"	20 mg/l	6.5	±	—
Masoten	bath	0.5 mg/l	1	none	—
"	"	0.5 mg/l	6.5	none	—
Closantel	bath	2.5 mg/l	—	—	24 h
Closantel Drench 5 %	feed	10 mg/kg BW	1	10 % imm.	—
L-Levamisole	bath	19.2 mg/l	9	95 % imm.	—
"	"	29.5 mg/l	9	95 % imm.	—
"	"	59 mg/l	9	95 % imm.	—
"	"	10 mg/l	1.5	80 % imm.	—
"	"	20 mg/l	1	85 % imm.	—
"	"	20 mg/l	6.5	100 % imm.	—

±: elevated level immobilised

Table 1 shows that Ivermectine and Closantel are too toxic for eel and cannot be used safely. Only the series of treatments with L-Levamisole show significant effects on *A. crassus*. The effects consist of a total paralysation of the parasite which does however not disappear from the swimbladder lumen. Experiments in which fish were examined a month after treatment did not show an elevated level of lysis of the nematodes. Clear effects could only be noted on adult and pre-adult individuals. Prolonged treatment over 6 days proved to be most effective and resulted in immobilisation of 95 to 100 % of the nematodes. Larval stages (L_1 and L_2), however, which are not feeding in the swimbladder lumen seemed to be hardly affected by any treatment.

Medication tested by Trouw & Co was applied in the paste which was fed to the fish for a period of 9 weeks. Fish were weighed at the start and at the end of the

Table 2. Treatments tested by Trouw & Co with the results

Treatment	Conc. g/kg feed	Effect on <i>A. crassa</i> (% immobilised)			Growth of eel %/day
		after 3 weeks	after 6 weeks	after 9 weeks	
Control		5	19	50	1.03 ± 0.15
Banminth	4	13	0	—	0.61
Droncit	2.7	0	15	—	0.98
Fasinex	8	0	—	—	0.86
Ivomec	10	23	63	—	0.84
Mebenvet	10	13	15	50	0.33
Panacur	5	0	62	—	0.53
Piperazinecitr.	6	0	33	—	0.40
Rintal	8	0	58	—	0.55
Synanthic	8.8	14	17	16	0.60
Levamisole	2.5	43	100	—	0.67
"	5	100	100	—	0.90
"	15	100	100	100	0.72
"	40	100	100	100	0.67

The treatment was applied continuously over a period of 9 weeks in the feed (paste) which was given at a rate of 1 % of the body weight daily. Doses are based on concentrations used for treatment of worms in cattle.

experimental period which yielded useful data on growth of infected fish. After 3, 6 and 9 weeks about 20 fish from each experimental unit were examined generally the same way as mentioned above. Table 2 gives the applied treatments and concentrations and their results.

Again it is clearly demonstrated that, of all the treatments tested, only L-Levamisole gives any significant results. In these experiments treatment with L-Levamisole resulted again in complete immobilisation of the nematodes. None of the treatments results in improved growth rates. On the contrary: growth in the untreated control group is the highest. Since the treatments were applied in only one replicate this evidence is not conclusive however.

These results are in agreement with TARASCHEWSKI *et al.* (1988) who found satisfying results with Levamisole. The dose of 1 mg/l Levamisole for 24 hour used by TARASCHEWSKI *et al.* (1988) is however very low compared to our studies but this author nevertheless finds severe histological damage in the nematode caused by treatment with Levamisole. There is, however, still an open question as to whether treated fish are able to get rid of immobilised nematodes. Results thus far indicate that immobilised nematodes do not disintegrate and disappear from the swimbladder lumen soon.

Data on residues of Levamisole in treated fish are not available at the moment. Mammals are able to metabolise and evacuate Levamisole very rapidly but for fish this is still an open question.

4. Control of Contamination within Eelfarms

Eelfarmers importing uninfected batches of fish into their farm soon discovered that these fish rapidly became infected with *A. crassus*. In the only farm in The Netherlands using seawater this contamination of uninfected fish has never been

observed. This seems reasonable since DE CHARLEROY *et al.* (1987) showed that the free-living L₂ larvae are unable to survive for prolonged periods in water of high salinity. Suitable intermediate hosts for transmission of *A. crassus* in seawater also seem to be lacking.

On the other side, in eelfarms using freshwater, recycle systems there can be large populations of copepods suitable for transmission of *A. crassus*. In the farm (Palingkwekerij Kerkdriel) where the experiments on control of transmission of *A. crassus* were executed, the population of copepods consisted of *Paracyclops fimbriatus*, the same species that is frequently used for infection experiments at the University of Leuven. In these copepods L₃ larvae could be observed frequently.

Although it has been shown that transmission of the parasite is possible by direct uptake of infected fish (DE CHARLEROY, pers. comm.) this mode of transmission (cannibalism) can only be of minor importance at eelfarms.

In order to control transmission of *A. crassus* within farms it is therefore necessary to suppress the population of copepods. At first several drugs have been tested on a small scale in aquaria for effectiveness against copepods. In those experiments the toxicity of the treatments for eel was also tested. Table 3 gives the treatments and their results.

Table 3. Overview of treatments tested against copepods

Product	Conc. mg/l	Duration hours	Effect on copepods	Toxicity for eel
Neguvon	1	3 to 4	100 % †	no effect
Malachitegreen	8	0.5	100 % †	toxic
Formaline	1500	0.5	100 % †	toxic
Dimilin*)	0.015		juv. stages†	no effect

*) only one application

Table 3 shows that most treatments are effective against copepods in concentrations also toxic for the fish and are therefore not useful. Most of these compounds are also toxic for biological filtration units. Dimilin however, with the active ingredient diflubenzuron (DFB), is effective at very low concentrations which are not dangerous for fish. The LC-50 (96 h) for Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) is 140 ppm (WORTHING, 1983). DFB is an insect growth regulator and inhibits synthesis of chitin. It therefore stops moulting of the target organism which subsequently dies.

In order to treat systems effectively against copepods one has to know the distribution of these organisms in the system. At several places in the system therefore, watersamples (1.5–3 m³) were taken in which the number of copepods was determined. Although it is very hard to obtain representative samples under farming conditions, there are strong indications that large populations of copepods exist mainly near accumulations of sludge and other organic material and that these populations continuously deposit individuals towards the rearing tanks. Accumulations of organic material in recycle systems exist mainly on the bottom of clarifiers and pump sumps and it is there that the highest densities of copepods are found. Control of the population size of copepods can therefore to some extent be exerted by keeping systems free from deposits of sludge. Systems using mechanical filtration can keep population densities of copepods naturally low because adult copepods cannot pass the mesh sizes of 80 to 140 micron, frequently used in these filters.

Finally a full scale experiment with DFB was executed at eelfarm Kerkdriel in which a single dose of DFB (10 ppb) was applied. The change over time of the con-

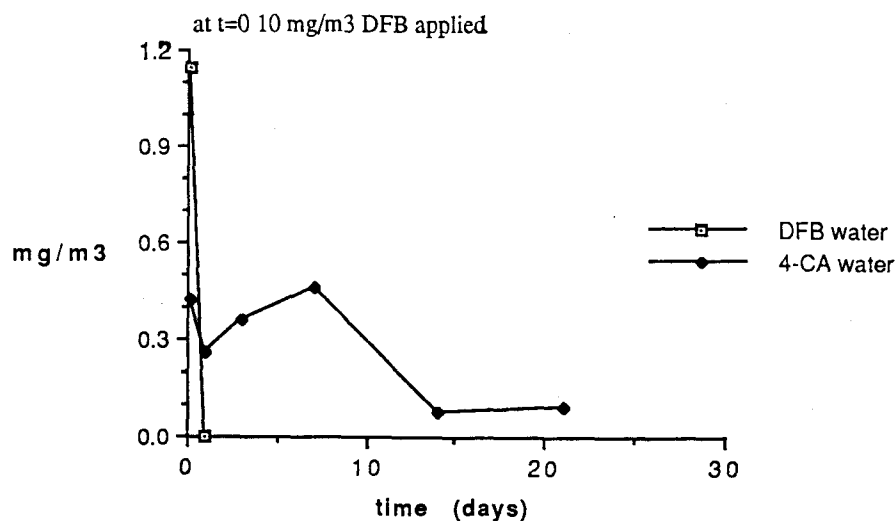


Figure 1. The concentration DFB and 4-CA over time after a single administration of 10 ppb DFB.

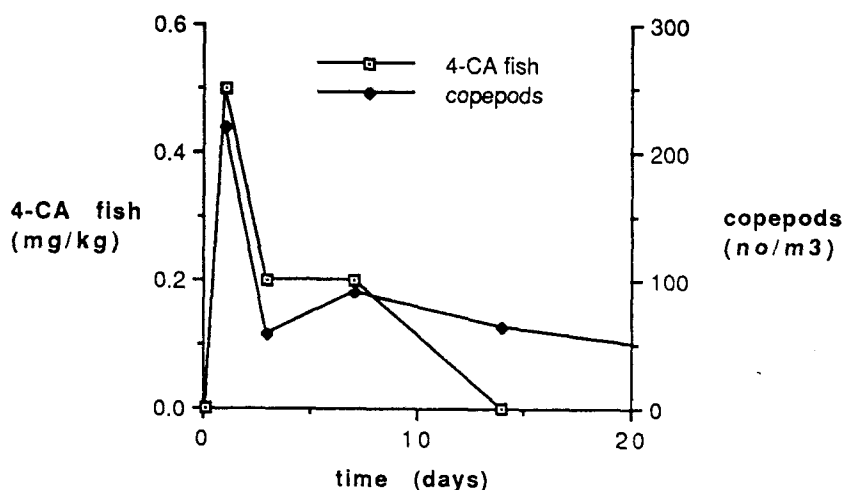


Figure 2. Concentration of 4-CA in the fish and density of copepod population over time after a single administration of 10 ppb DFB.

centration of DFB, its main breakdown product (4-Cl Aniline) and the population density of the copepods was recorded. Residues of 4-Cl Aniline (4-CA) in the eel were also analysed over time. Figures 1 and 2 show the results of this experiment.

At $t=0$, 10 ppb DFB was applied in the primary clarifier. As can be seen in Figure 1, DFB disappears very rapidly out of the system water. Three hours after application only 10% of the initial concentration can be detected! Diflubenzuron is, however, known to be readily absorbed by organic matter which is abundantly available in recycle systems.

The concentration of 4-CA in the water fraction shows a maximum after a week and disappears rapidly afterwards. The concentration of 4-CA in the fish generally follows the same pattern but on a much higher level.

The population density of the copepods shows a rapid decline after application but after a week the population starts to recover. The subsequent decline is probably due to a sampling error. This fast recovery of copepod populations after exposure to DFB is also reported by other authors (COLWELL and SHEAFFER, 1980; CUNNINGHAM,

1986). This means that for an effective control of copepods treatments have to be applied about every week. In this case there is however a serious chance of a build-up of residues and caution should be taken.

Complete eradication of copepods is virtually impossible even if high doses of DFB are used (DE CHARLEROY, personal communication).

In theory, transmission of *A. crassus* can be controlled by killing the free-swimming stages of the parasite (L_2) when they leave the fish. GRISEZ (1988) has shown that these stages are relatively insensitive to any treatment and that this way of controlling the infection gives little perspectives.

5. Summary

Anguillicola crassus was introduced into Dutch eelfarms by infected stocking material originating from inland fisheries. Within farms, suitable intermediate hosts for transmission of the parasite are available and uninfected stock becomes rapidly infected. In farming situations, only very heavy infections with the parasite can cause significant damage to fish, mainly by secondary infections. Treatment of fish infected with *A. crassus* is possible with L-Levamisole as a bath treatment or mixed with the feed, which results in complete immobilisation of the nematode. Transmission of the infection within farms can be controlled by keeping populations of copepods low. This can be accomplished by avoiding accumulations of organic matter within systems and/or control with chemical means. It can be stated that *Anguillicola crassus* does not pose the threat to intensive eel culture it once seemed to be.

6. Acknowledgements

The research was supported by a grant from the Ministry of Agriculture and Fisheries. The work was executed by a working group consisting of: Texvis B.V., Trouw & Co, Janssen Pharmaceutica, Catvis B.V., Palingkwekerij Kerkdriel, Duphar B.V., the Catholic University of Leuven, the Agricultural University of Wageningen and the Institute for Veterinary Research.

7. References

- COLWELL, A. E., and C. H. SCHAEFER, 1980: Diets of *Ictalurus nebulosus* and *Pomoxis nigromaculatus* altered by diflubenzuron.—Can. J. Fish. Aquat. Sci. **37**: 632–639.
- CUNNINGHAM, P. A., 1986: A review of toxicity testing and degradation studies used to predict the effects of diflubenzuron (Dimilin) on estuarine crustaceans.—Environmental Pollution (Series A) **40**: 63–86.
- DE CHARLEROY, D., K. THOMAS and C. BELPAIRE, 1987: Problems concerning the species determination, biology and diagnostic methods of *Anguillicola*, a swim-bladder nematode in the European eel (*Anguilla anguilla* L.).—EIFAC Working Party on Eel, Bristol, England.
- EGUSA, S., 1979: Notes on the culture of the European eel (*Anguilla anguilla* L.) in Japanese eel-farming ponds.—In: Eel research and management (Ed. F. THUROW), Rapp. P. v. Réunion. Cons. int. Explor. Mer. **174**: 51–58.
- GRISEZ, L., 1988: Studie van de parasitaire zwemblaasnematode *Anguillicola crassa* bij de Europese paling (*Anguilla anguilla* L.).—Eindverhandeling KU Leuven (not published).
- LIEWES, E. W. en S. SCHAMINEE-MAIN, 1987: Onderzoek aalparasiet vordert.—Aquacultuur **2**: 5–17.
- SAROGLIA, M. G., 1985: Eel production in Italy: Problems and perspectives.—EIFAC (FAO) Working Party on eel, Perpignan, September 17–18, 5 pp.

- TARASCHEWSKI, H., C. RENNER and H. MEHLHORN, 1988: Treatment of fishes 3. Effects of Levamisole-HCL, Metrifonate, Febendazole, Mebendazole and Ivermectin on *Anguillicola crassa* (Nematoda) pathogenic in the air bladder of eels. — *Parasitology Research* **74**: 281–289.
- VAN BANNING, P., W. HEERMANS, en J. A. VAN WILLIGEN, 1985: *Anguillicola crassa*, een nieuwe aalparasiet in de Nederlands wateren.—*Visserij* **38** (6–7): 237–240.
- WORTHING, C. R., 1983: *The Pesticide Manual*; 7th edition; page 198. British crop protection council.

A. KAMSTRA

Netherlands Institute for Fisheries Investigations (RIVO)
Postbus 68, 1979 AB IJmuiden
The Netherlands

Experimentally induced infections of European eel *Anguilla anguilla* with *Anguillicola crassus* (Nematoda, Dracunculoidea) and subsequent migration of larvae

O. L. M. Haenen¹, L. Grisez², D. De Charleroy², C. Belpaire², F. Ollevier²

¹Central Veterinary Institute, PO Box 65, 8200 AB Lelystad, The Netherlands

²Zoological Institute, Naamsestraat 59, Leuven 3000, Belgium

ABSTRACT: Migration pattern of third-stage *Anguillicola crassus* larvae, and pathogenesis of the lesions induced by third-stage larvae, was investigated in European eel *Anguilla anguilla* L. Young elvers (1g) were fed infected *Paracyclops fimbriatus* (Copepoda). Eel samples were collected and examined histologically at varying intervals during the 6 mo post-infection period. Third-stage larvae (L-III) migrated directly through the intestinal wall and body cavity to the swimbladder within 17 h post-infection. L-IV larvae were detected 3 mo post-infection, and immature adults were detected within 4 mo post-infection. The parasites occasionally showed aberrant migration paths. Pathological effects caused by the parasite were less severe after experimentally induced infections than those detected in some natural infections.

INTRODUCTION

The parasitic nematode *Anguillicola crassus* (Kuwahara et al. 1974, Moravec & Taraschewski 1988) originates from eastern Asia where it infects the Japanese eel *Anguilla japonica*, but does not cause serious pathological changes (Egusa 1979). In contrast to Japanese eels, European eels *Anguilla anguilla* L. develop pathological effects from *A. crassus* infections (Egusa 1979, Liewes & Schaminee-Main 1987, van Banning & Haenen 1989).

The life cycle of *Anguillicola* spp. in Japanese eels has been described by Egusa (1979) and Puqin & Yuru (1980). The adult resides in the swimbladder lumen of the eel. After the female has copulated, the fertilized eggs are released through the vulva and, according to Egusa (1979), also by rupture of the female parasite. First-stage larvae (L-I) moult into second-stage larvae (L-II) while still within the egg. The eggs pass via the pneumatic duct through the digestive tract and out of the eel into the water. After hatching, the L-II larvae are eaten by copepods which serve as intermediate hosts. Inside the copepod the L-II larvae migrate to the haemocoel and moult into L-III larvae in 10 d. When these copepods are eaten by eels the L-III larvae migrate through the wall of the digestive tract to the

swimbladder wall, where, according to Puqin & Yuru they moult into L-IV larvae 4 to 5 mo later. Immature adult and adult nematodes reside in the swimbladder lumen and feed actively on eel blood. The total life cycle of *Anguillicola* spp. in the Japanese eel has been estimated at 1 yr (Egusa 1979, Puqin & Yuru 1980).

The life cycle of *Anguillicola crassus* in European eels was studied recently by De Charleroy et al. (1989), who demonstrated that, under optimal conditions, the life cycle of *A. crassus* in European eels takes less than 2 mo.

In 1980 Puqin & Yuru proposed a direct migration route of third-stage larvae of *Anguillicola globiceps* through the intestinal wall and body cavity into the swimbladder wall of Japanese eel *Anguilla japonica*.

This report describes the migration of L-III larvae of *Anguillicola crassus* in the European eel and the pathological effects induced by these parasites in an experimentally induced infection.

MATERIALS AND METHODS

Eggs of *Anguillicola crassus*, containing L-II larvae, were collected from the swimbladder fluid of an infected eel. These eggs were released into fresh water

at 20°C, where they hatch within a few hours (De Charleroy et al. 1989). The intermediate host, the copepod *Paracyclops fimbriatus*, was cultured at 20°C in the laboratory and fed with the newly hatched L-II larvae (estimated equal numbers of larvae and copepods). The mean infection level of the copepods, after 9 d infection, was 1.2 larvae copepod⁻¹. Three hundred unparasitised European elvers, each weighing ca 1 g, were fed with the infected copepods (1 exposure of about 4 times as many copepods as eels). Afterwards, the elvers were kept in water at 20°C and fed with commercial pellet food, at a rate of 2 % of body weight per day.

After this single infection, 60 % of the eels were found to be infected with *Anguillicola crassus* larvae (infection level varying from 1 up to more than 20 larvae; dependent on the individual feeding behaviour of the eels).

At 28 different time intervals, samples of 10 eels were collected, anaesthetized and fixed in Bouin Hollande

for histological examination ($t = 0$ and 1 h post-infection [p.i.]; every 4 h during the first 3 d; at 4, 7 and 8 d p.i.; and at 1, 2, 3, 4 and 6 mo p.i.). Histological sections of 4 µm were stained with hematoxylin and eosin or trichrome, according to the method of Pollack (1944).

RESULTS

One hour after feeding the eels with the infected copepods, L-III larvae of *Anguillicola crassus* were detected in the stomachs of the eels. The swimbladder was still uninfected (Fig. 1). At 5 h p.i., L-III larvae were detected in the different layers of the digestive tract, especially in the submucosa, and in the body cavity. Tunnels were detected in the wall of the digestive tract (Fig. 2), as well as haemorrhages with numerous mononuclear phagocytes (Fig. 3). Until 17 h p.i. this situation did not change. At 17 h p.i., L-III larvae were detected for the first time in the swimbladder wall (Fig. 4); they



Fig. 1. *Anguilla anguilla*. Copepods (C) containing L-III larvae of *Anguillicola crassus* in the stomach (S) of eel, 1 h p.i. The swimbladder (SB) is not yet infected. BC: body cavity. H&E, 100 ×, cross section



Fig. 2. *Anguilla anguilla*. L-III larvae of *Anguillicola crassus* migrating directly through the submucosa (SM) of the stomach (S) to the body cavity (BC) and causing tunnels (T), 5 h p.i. Protein (P), a sign of haemorrhages, is visible in the body cavity. The swimbladder (SB) is not yet infected. Trichrome, 100 ×, cross section

were situated in the subserosa and had not yet fed on eel erythrocytes. This situation remained unchanged until 3 mo p.i. At 3 mo p.i. L-IV larvae were detected for the first time, in the swimbladder wall; eel erythrocytes were detected within the parasite's intestine (Fig. 5). At 4 mo p.i. immature adults, full of eel erythrocytes and developing gonads, were detected within the swimbladder lumen (Fig. 6). At 6 mo p.i. this was again seen. No adult parasites were found at all. A summary of the results is given in Table 1. No pathological effects, such as inflammations or fibrosis of the swimbladder, were detected.

Occasionally, L-III larvae were detected migrating aberrantly, for instance in the ventral musculature (Fig. 7).

DISCUSSION

In this study the artificially induced infection of *Anguilla anguilla* with *Anguillicola crassus* was successful. We could detect the migration patterns of the parasitic larvae.

The 17 h period between feeding with infected copepods and the first appearance of L-III larvae in the swimbladder wall is remarkably short. The L-III larvae were detected mostly in the submucosa of the digestive tract, where they apparently reside some time before passing the denser muscularis. What attracts the larvae to the swimbladder is not known. Some larvae migrated aberrantly, but most of the L-III larvae migrated to the swimbladder.

L-IV larvae were detected in the swimbladder wall at 3 mo p.i., earlier than was reported for Japanese eels

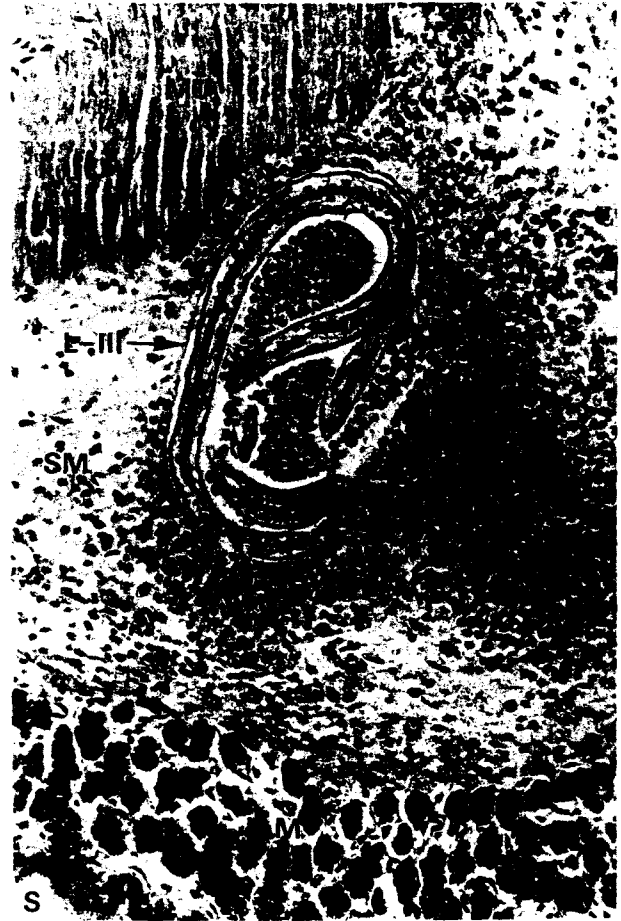


Fig. 3. *Anguilla anguilla*. Longitudinal section of L-III larvae of *Anguillicola crassus* situated in the submucosa (SM) of the eel stomach (S). Inflammatory cells (I) (mainly mononuclear phagocytes and erythrocytes) are visible. M: mucosa; MU: muscularis. Trichrome, 200 ×

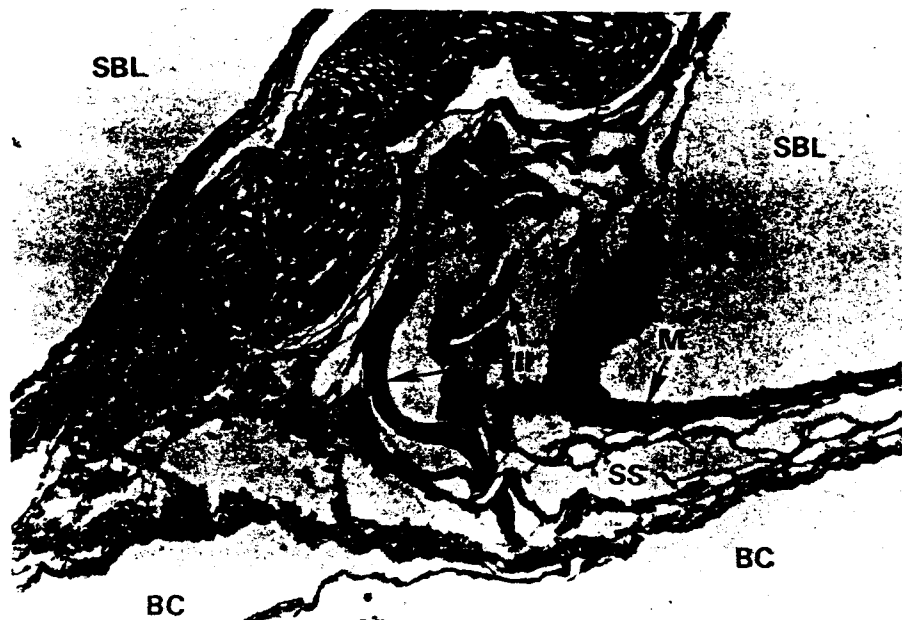


Fig. 4. *Anguilla anguilla*. Longitudinal section of eel showing L-III larvae of *Anguillicola crassus* situated in the swimbladder subserosa (SS), 17 h p.i. M: mucosa; RM: rete mirabile, gas organ; SBL: swimbladder lumen; BC: body cavity. Trichrome, 100 ×



Fig. 5. *Anguilla anguilla*. Detail of L-IV larva of *Anguillicola crassus* situated in the swimbladder wall (SBW), 3 mo p.i. Eel erythrocytes (EE) are visible within the parasite. Trichrome, 200 ×

(Puqin & Yuru 1980). These larvae had already been feeding on eel erythrocytes.

Since immature adults were detected in the swimbladder at 4 mo p.i., the life cycle of the nematode in European eels is considerably shorter than that described for Japanese eels (1 yr) (Egusa 1979, Puqin & Yuru 1980). The life cycle seems longer however, than that reported for European eel by De Charleroy et al. (1989), of 2 mo. This is probably related to the different detection methods used in the experiments. De Charleroy et al. examined whole swimbladders of fresh eels for *Anguillicola crassus*, whereas we only examined a few histological sections. Therefore, eels in our experi-

ments may actually have contained older larval stages at earlier times, which we missed.

Although we are aware of no reports that *Anguillicola crassus* migrates aberrantly in the Japanese eel, our study revealed that the nematode does on occasion migrate aberrantly in the European eel.

In a previous study of naturally occurring infections (van Banning & Haenen 1989), we demonstrated that *Anguillicola crassus* caused pathological changes in eels. In contrast, the infections experimentally induced in the present study did not cause severe pathological changes. Eels living under natural conditions may be continuously exposed to nematode infections and thus

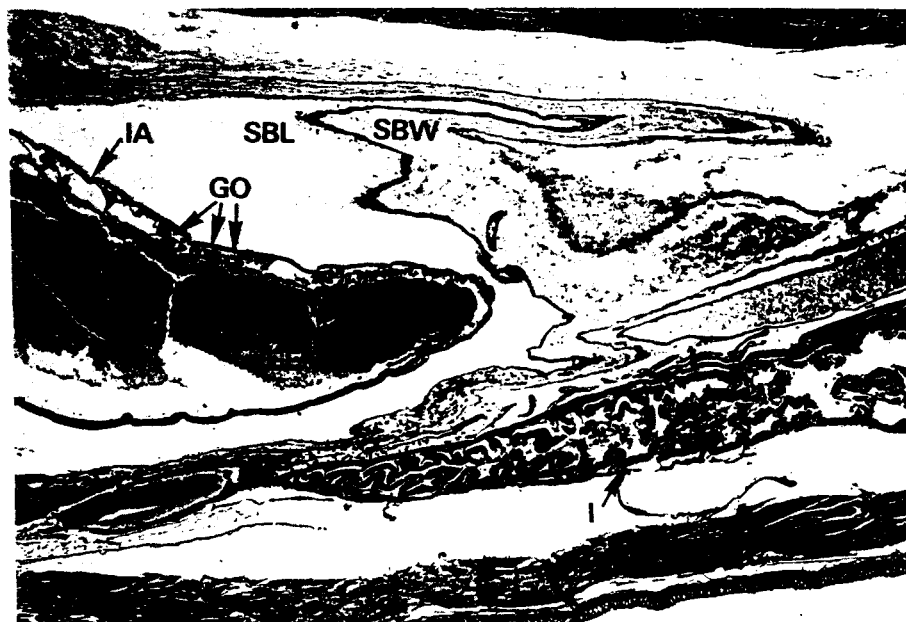


Fig. 6. *Anguilla anguilla*. Immature adults (IA) of *Anguillicola crassus* situated in the swimbladder lumen (SBL) of the eel, 4 mo p.i. The gut (G) of the parasite is filled with eel erythrocytes (EE). GO: Early development stage of gonads; SBW: swimbladder wall; I: intestine. Trichrome, 20 ×

Table 1. *Anguillicola crassus* in *Anguilla anguilla*. Location of parasite larvae in the European eel after experimentally induced infection

Location	Time p.i.				
	1 h	5 h	17 h	3 mo	4 mo
Intestinal lumen	L-III	L-III	L-III	L-III	L-III
Intestinal wall		L-III	L-III	L-III	L-III
Body cavity		L-III	L-III	L-III	L-III
Swimbladder wall			L-III	L-III & L-IV	L-III & L-IV
Swimbladder lumen					IA
IA: immature adult					

may suffer more severe lesions than the experimentally infected eels, which were exposed only once to the parasites. Therefore, future studies on the pathological changes induced by *A. crassus* on European eels should include repeated experimentally induced infections.

LITERATURE CITED

- Banning, P. van, Haenen, O. L. M. (1989). Effects of the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* in wild and farmed eel *Anguilla anguilla*. In: Perkins, F. O. (ed.) Proceedings PAMAQ III-Conference, Gloucester Point, USA. Academic Press, New York, in press
- De Charleroy, D., Grisez, L., Thomas, K., Belpaire, C., Ollevier, F. (1989). The life cycle of *Anguilla crassa* (Kuwahara, Niimi and Itagaki). Proceedings F.H.S./A.F.S. International Fish Health Conference, Vancouver. J. Aquat. Anim. Health: (in press)
- Egusa, S. (1979). Notes on the culture of the European eel (*Anguilla anguilla*) in Japanese eel farming ponds. In: Thurow F. (ed.) Eel research and management. Rapp. P.-v. Réun. Cons. int. Explor. Mer 174: 51-58
- Kuwahara, A., Niimi, A., Itagaki, H. (1974). Studies on a nematode parasitic in the air bladder of the eel. I. Description of *Anguillicola crassa* n. sp. (Phimetricidae, Anguillicolidae). Jap. J. Parasit. 23(5): 275-279
- Liewes, E. W., Schaminee-Main, S. (1987). Onderzoek naar de effecten van de parasiet *Anguillicola crassa* op de ontwikkeling van de paling (*Anguilla anguilla*) in een zout water palingmesterij. Internal report, Texvis B.V., Den Burg, Texel, The Netherlands
- Moravec, F., Taraschewski, H. (1988). Revision of the genus *Anguillicola* Yamaguti, 1935 (Nematoda: Anguillicolidae) of the swimbladder of eels, including descriptions of two new species, *A. novaezealandiae* sp. n. and *A. papernai* sp. n. Folia Parasitol. (Prague) 35: 125-146
- Pollack, O. J. (1944). A rapid trichrome stain. Arch. Path., 37: 294
- Puqin, W., Yuru, Z. (1980). Observations on the life history of *Anguillicola globiceps* (Nematoda, Anguillicolidae). Acta zool. sin. 26: 243-249

Responsible Subject Editor: Professor W. Körting, Hannover, F.R. Germany

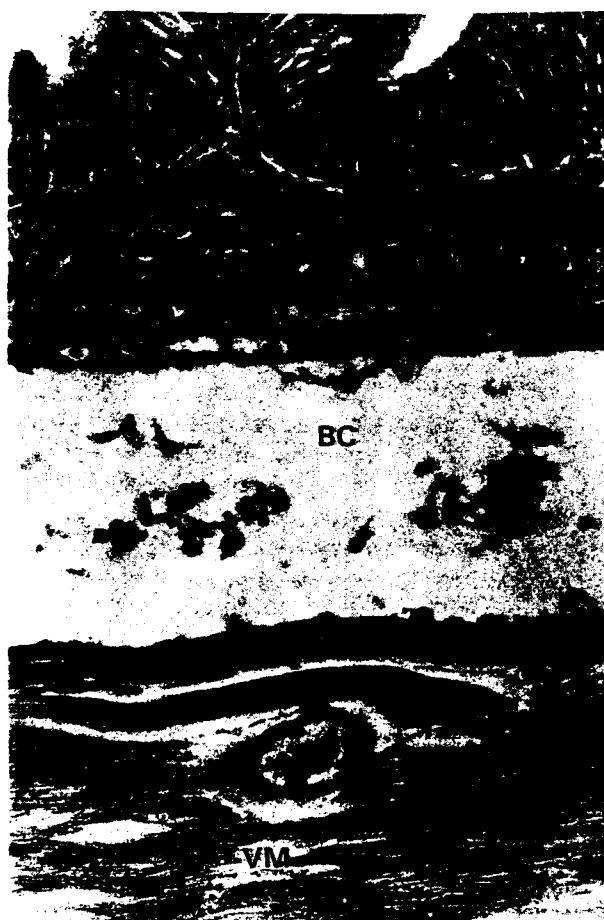


Fig. 7. *Anguilla anguilla*. L-III larva of *Anguillicola crassus* aberrantly migrating through the ventral musculature (VM) of the eel. BC: body cavity. H&E, 400 ×

Manuscript first received: January 27, 1989
Revised version accepted: August 1, 1989

Bijlage 3

Grisez, L. (1988). Studie van de parasitaire zwemblaasnematode *Anguillicola crassus*, bij de Europese paling, *Anguilla anguilla*. M. Sc. dissertation. Catholic University of Leuven, Belgium.

HOOFDSTUK 12 : BESTRIJDINGSPROEVEN OP *ANGUILLICOLA CRASSA*.

12.1 Inleiding

Dit gedeelte van het onderzoek kadert in een proevenprogramma uitgaande van de werkgroep *Anguillicola*, waar naast het Laboratorium voor Ekologie (K.U.L.) ook het Centraal Diergeneeskundig Instituut (Ned.), de Landbouwuniversiteit van Wageningen (Ned.), Het Rijksinstituut voor Visserijonderzoek (Ned.), de farmaceutische bedrijven Duphar en Janssens en Nederlandse palingkwekerijen, Texvis, Catvis en palingmesterij Kerkdriel in betrokken zijn. Binnen deze werkgroep worden de gevolgen van een *Anguillicola* besmetting nagegaan en wordt gezocht naar een doelmatige bestrijding van deze parasiet in palingkwekerijen.

Na een overzicht van de resultaten gedurende dit jaar behaald door de andere partners in deze werkgroep, wordt de methode en de resultaten van ons onderzoek naar voor gebracht.

12.2 Bestrijding van *Anguillicola* in de zwemblaas van paling.

Tabel 13 : Overzicht van de Antihelminthica-testen uitgevoerd door leden van *Anguillicola* werkgroep Nederland.

PRODUCT	PRODUCENT	TOEDIENING	CONCENTRATIE	TIJDSDUUR	EFFECT (op A.C.)
Syntex	Syntex Int.	Bad	2g./5 kg. BW.	1 a 2 uur	weinig effect
Oxfendazole	Syntex Int.	Bad	1.4-22.7 ppm.	5 dagen	redelijk effect
Oxfendazole	Syntex Int.	Bad	20 ppm.	24 uur	twijfelachtig
Oxfendazole	Syntex Int.	Bad	20 ppm.	6,5 dagen	twijfelachtig
Save-Wormer	Dr. Blom	Bad	2 %	2 min.	geen effect
Ivermectine	MSD-AGVET	Bad	0,00018 ppm.	30 uur	palingsterfte
Closantel	Janss. Ph.	Bad	2,5 ppm.	42 uur	palingsterfte
Closantel 5%	Janss. Ph.	voeder	10 ppm.	1 malig	redelijk effect
L.Levamisole	Janss. Ph.	injectie	5 mg./kg. BW.	1 malig	--
L.Levamisole	Janss. Ph.	Bad	19.2 ppm.	8 dagen	effectief
L.Levamisole	Janss. Ph.	Bad	29.5 ppm.	8 dagen	effectief
L.Levamisole	Janss. Ph.	Bad	59.0 ppm.	8 dagen	effectief
L.Levamisole	Janss. Ph.	Bad	20 ppm.	24 uur	85% effectief
L.Levamisole	Janss. Ph.	Bad	20 ppm.	6,5 dagen	zeer effectief
Masoten	Bayer	Bad	0,5 ppm.	24 uur	geen effect
Masoten	Bayer	Bad	0,5 ppm.	6,5 dagen	geen effect

Uit deze tabel blijkt dat het beste of het enige werkzame produkt tegen adulte *Anguillicola*'s in de zwemblaas, Levamisole is (Janssens Pharmaceutica). Dit komt overeen met de gegevens uit de literatuur, namelijk TARASHEWSKI et al. (1987) prijzen Levamisole ook aan als best werkzame produkt. Wat er gebeurt met de afgedode volwassen nematoden en hoe de paling reageert op de aanwezigheid van dode *Anguillicola*'s in de zwemblaas, is nog niet duidelijk. Ook het effect van de antiwormmiddelen op larvestadia in de zwemblaas is nog onopgelost.

12.3 Bestrijding van de intermediaire gastheer

Bestrijding van de cyclopoida, die als intermediaire gastheer voor *Anguillicola* fungeren, wordt bij palingkwekers vaak gezien als de eenvoudigste methode om niet geïnfecteerde paling te bekomen en te behouden, op voorwaarde dat men beschikt over *Anguillicola* vrije pootpaling. Indien men immers de cyclopoida in recirculatie systemen afdoodt is de levenscyclus van *Anguillicola* doorbroken en kan hij zich niet tot adulte nematode ontwikkelen.

Tot dusver heeft in Nederland het Visteeltkundig Ingenieursbureau Catvis zich hiermee beziggehouden. Zij testen in samenwerking met N.V. DUPHAR (Pharmaceutisch bedrijf) het produkt Dimilin (actief bestanddeel Diflubenzuron). Bij een concentratie van 0.015ppm actief bestanddeel trad na 10 uur een sterfte op van de jongste ontwikkelingsstadia van de cyclopoida op. Zij merkten echter op dat de cyclopoida populatie zich snel herstelde.

Tijdens het eigen onderzoek, waarbij de groei van artificieel besmette palingen vergeleken werd met infectie vrije paling, waren we op een gegeven ogenblik genoodzaakt om de copepoden (*Paracyclops fimbriatus*) te gaan bestrijden. Hiertoe werd per liter water 0.15mg (dit is 10x meer dan de concentratie gebruikt bij Catvis) Diflubenzuron (P.C. 90%) (opgelost in aceton) toegevoegd aan elk systeem, en dit om de drie en een halve dag. Op deze wijze werd een mogelijke infectie van de niet geïnfecteerde palingen uitgesloten. De gebruikte concentratie is zeer hoog en over het mogelijk accumuleren van dit produkt in de paling en in het systeem (afbreekbaarheid van het produkt) zijn nog geen gegevens bekend. De genomen palingstalen moeten toelaten paling residubepalingen van Diflubenzuron in het palingweefsel uit te voeren.

12.4 Bestrijding van het vrijlevende L₂-stadium van *Anguillicola* .

12.4.1 Inleiding

Een andere mogelijkheid om de levenscyclus van *Anguillicola* te doorbreken is trachten een onleefbaar klimaat te creëren voor de vrijlevende larven. Vorig jaar werd door THOMAS (1987) het effect van verschillende zoutconcentraties en van verschillende temperaturen op dit stadium uitgetest. Hieruit bleek dat de larven in hypersalinen (50g/l) en salinen (35g/l) water na 3 à 4 dagen dood waren. Bij een temperatuur van 30°C waren alle larven na 11 dagen dood.

Onder normale omstandigheden, -temperatuur 4-20°C en zoet water (tot fysiologische zoutoplossing)- blijven de larven gedurende ruim 25 dagen in leven.

12.4.2 Uittesten van een aantal antihelminthica op de L₂-larven

12.4.2.1 Methode

Om het effect van een aantal antihelminthica op de L₂-larven na te gaan werd gepoogd zo gestandaardiseerd mogelijk te werken. De methode gebruikt voor het testen van produkten is opgesteld aan de hand van de internationale norm voor toxiciteitstesten met Daphnia (1506301-1982) de standaard handleiding voor acute toxiciteitstesten met vissen, macroinvertebraten en amfibieën (ASTM. E 789-80) de TNO uitgave over toxiciteitstesten van 1980, en Manual of methods in aquatic environment research part 10 : Short-term static bioassays (REISH en OSHIDA, 1987).

12.4.2.2 Recipiënten

De testen worden uitgevoerd in 24 well platen (NUNC LON) die gebruikt worden voor in vitro celkweek (NUNC MULTIDISH). Deze platen werden volgens de voorgeschreven manier (REISH en OSHIDA, 1987) gereinigd :

1. afwassen met een detergent
2. 5x spoelen met water
3. gedurende 24h in een 10% HCl oplossing onderdompelen
4. 5x spoelen met water
5. 5x spoelen met A.D.
6. drogen in een stofvrije ruimte

12.4.2.3 Verdunningswater

De larven werden vanuit de zwemblaas overgebracht in synthetisch verdunningswater.

Samenstelling :

a. Stamoplossingen :

- * $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 11.76g oplossen in A.D.en aanlengen tot 1 l.
- * $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.93g oplossen in A.D.en aanlengen tot 1 l.
- * Na_2CO_3 2.59g oplossen in A.D.en aanlengen tot 1 l.
- * KCl 0.23g oplossen in A.D.en aanlengen tot 1 l.

b. Synthetisch verdunningswater :

- Meng 25ml van elk van de vier stamoplossingen met A.D. en vul aan tot 1 liter.
- Belucht tot het zuurstofgehalte overeenkomt met de verzadigingswaarde voor lucht.
- De pH controleren en zonodig bijstellen met NaOH of HCl op 7.9 ± 0.3 .
- Het aldus verkregen verdunningswater gedurende ongeveer 12 uur laten staan, verder beluchten is overbodig..

In dit verdunningswater leefden de L₂-larven evenlang als in leidingwater (± 25 dagen) en was hun bewegingsfrequentie en intensiteit niet verschillend van larven die in leidingwater gehouden werden.

12.4.2.4 Verdunningen

Er was vooropgesteld, zoals gebruikelijk is met toxiciteitstesten, om eerst een "Range-finding" test uit te voeren.. Vanuit een stockoplossing die twee grootte ordes sterker gekoncentreerd is dan de hoogste experimentele concentratie worden de uit te testen concentraties volgens een decimale reeks van 0.001 tot 100mg/l bereid.

De verdunningen van de uitgeteste chemicaliën worden eveneens met het bovenvermelde synthetisch water bereid.

Na deze eerste oriënterende proef wordt dan gewoonlijk een verfijnde test uitgevoerd met concentraties die oplopen volgens een logaritmische schaal, en begrepen liggen tussen de concentratie waarin enerzijds geen en anderzijds alle testorganismen stierven. Uit de resultaten van de oriënterende "range-finding" test bleek deze laatste verfijnde test niet nodig te zijn (zie verder)

12.2.4.5 Proefomstandigheden

De 24 well platen met de verschillende concentraties per well werden in een "vochtige kamer" geplaatst zodat er geen verdamping van water uit de testoplossingen mogelijk was (dit werd voorafgaandelijk gecontroleerd). Dit geheel werd op een constante temperatuur van 20°C ±1°C, op een beschaduwde plaats gehouden gedurende het verloop van de test.

12.2.4.6 Proeforganismen

Bij dissektie van een met adulte *A.crassa* besmette zwemblaas vindt men er duizenden *Anguillicola* eitjes in. Deze zwemblaas wordt na dissektie in het verdunningswater gespoeld zodat alle eitjes hierin overgezet worden. Vervolgens wordt er gewacht tot alle larven uitgeslopen zijn en hun bewegingsfrequentie wordt vergeleken met een controle groep die in leidingswater werd overgeplaatst. Als er tussen deze groepen geen verschil in bewegingspatroon merkbaar is, worden de L₂-larven voor de testen gebruikt.

Bij deze micronematoden was het, praktisch niet haalbaar om een exakt en bepaald aantal in de welletjes over te brengen. Daarom werd 10ul van de "larvenoplossing" (larven in verdunningswater) in elke well overgebracht. Met deze 1023ul rekening gehouden bij het maken van de testoplossingen.

12.4.2.7 Observaties

In normale omstandigheden slingeren de larven hun lichaam heen en weer in het water, wat zoals eerder aangehaald, predatie door copepoden zou bevorderen. Deze bewegingsperioden worden afgewisseld met korte perioden van rust. Wanneer er met de petrischaal, waarin de larven zitten, licht geschud wordt neemt de bewegingsfrequentie en intensiteit normaal toe.

Als criterium voor de testen werd bewegingsloosheid gehanteerd bij 15 seconden observatie en na eventueel licht schudden van het testrecipiënt.

Het tellen van de nematoden larven (beweeglijk-bewegingsloos) gebeurt onder een binoculaire loupe (vergroting 25x). De registratie gebeurt met een mechanische teller. Om het tellen eenvoudiger te maken, en foutieve tellingen zoveel mogelijk te voorkomen wordt elk welletje in kwadranten onderverdeeld.

Tellingen gebeuren na 24h, 48h, 72h en 96h. Uit de absolute getallen bekomen bij de tellingen, wordt de procentuele bewegingsloosheid uitgerekend per concentratie en dit na 24, 48, 72 en 96h.

De testen werden tweemaal uitgevoerd (2.3.'88 en 14.3.'88). Ter controle werd op beide data een blanco meegenomen. Enkel die testen werden als geldig aangenomen waar de mortaliteit in de blanco minder dan 10% bedraagt..

12.4.2.8 Geteste produkten

THIABENDAZOLE

- MERCK SHARP en DOHME B.V.
- Antihelminticum tegen maag-darminematoden bij runderen en vogels
- zuiverheid : lot nr. NRM 499 - assay 99.1%
- watersuspendeerbaar
- LC 50 (7 dagen in badvorm) bij goudvis : 17.3µg/ml

IVERMECTINE

- MERCK SHARP en DOHME B.V.
- Antihelminticum tegen maag-darm- en longwormen en ectoparasieten.
- zuiverheid : lot nr. NBA 080- assay 90.66%
- oplosbaar in propyleenglycol
- LC 50 (96h) badvorm bij Bleugill Sunfish : 5.3µg/l
regenboogforel : 3.3µg/l

PROPYLEENGLYCOL

- N.V. DE KELPER
- veel gebruikt oplosmiddel in therapeutische bereidingen
- totale zuiverheid : lot nr. 16784- assay 100%
- mengbaar met water
- LD 50 orale toediening bij de rat 30g/kg B.W. (RUCKENBUSH et al., 1981).

LEVAMISOLE HCl

- JANSSENS PHARMACEUTICA
- werkzaam tegen gastro intestinale nematoden en longwormen bij runderen
- zuiverheid : assay 99.1%
- wateroplosbaar

NEGUVON

- BAYER
- werkzaam tegen endo- en, ectoparasieten
- zuiverheid : handelsprodukt : oplossing van Metrifonat. 97g en Acid.silicic.colloid.q.s.pro. 100g pulv.un.
- wateroplosbaar

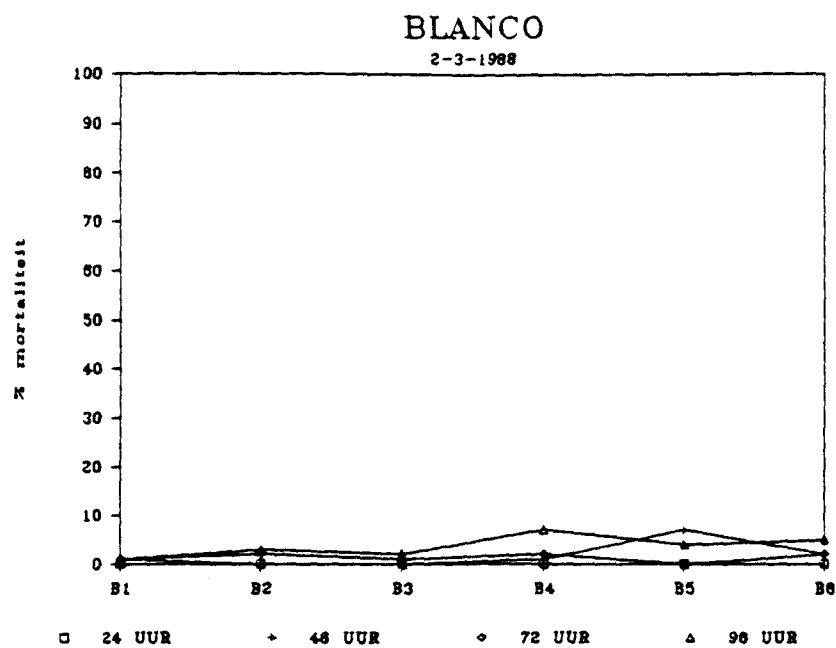


Fig. 49

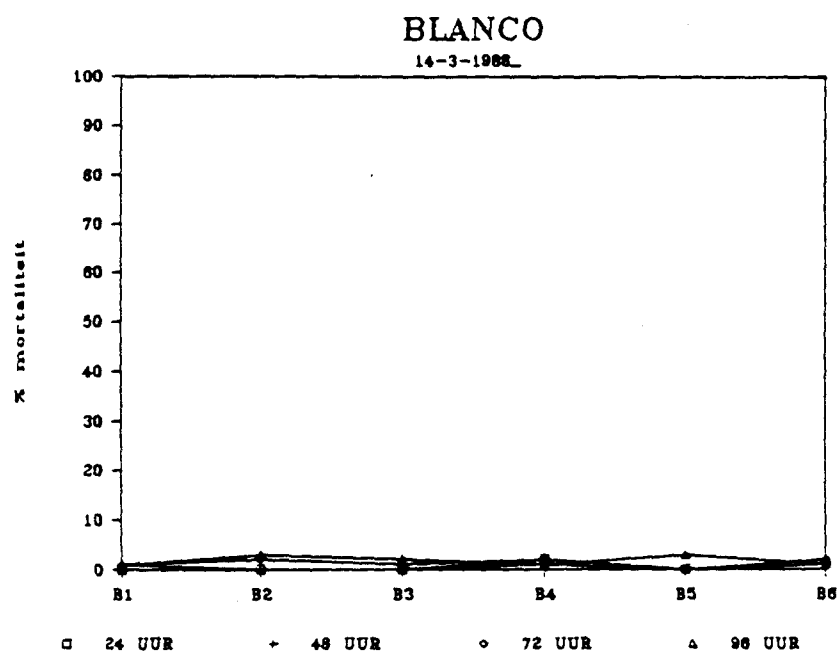


Fig. 50

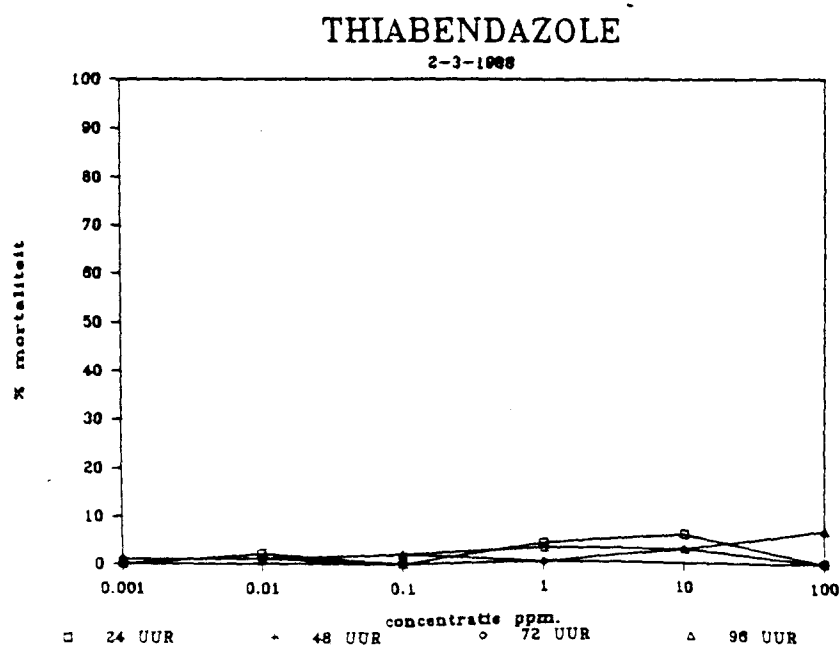


Fig. 51

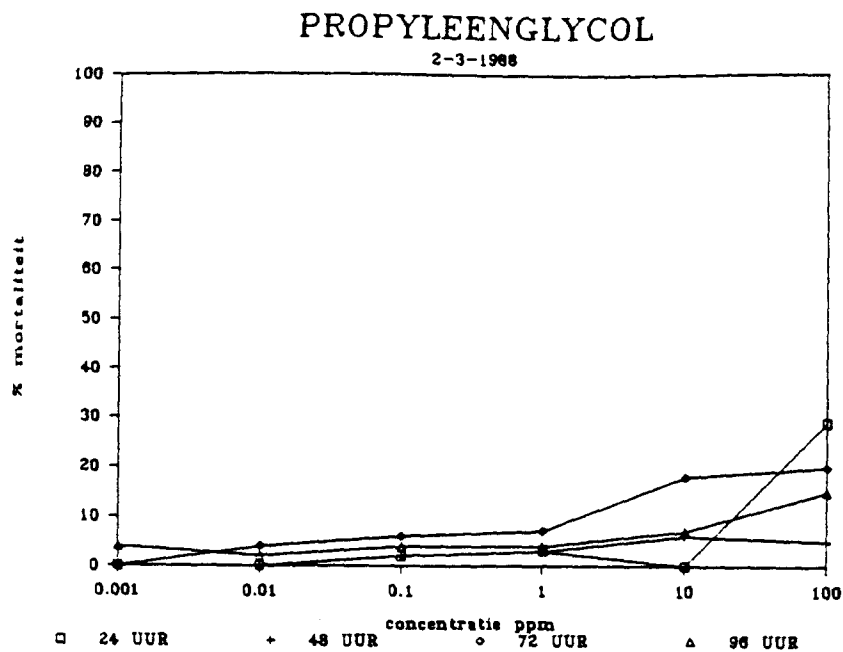


Fig. 52

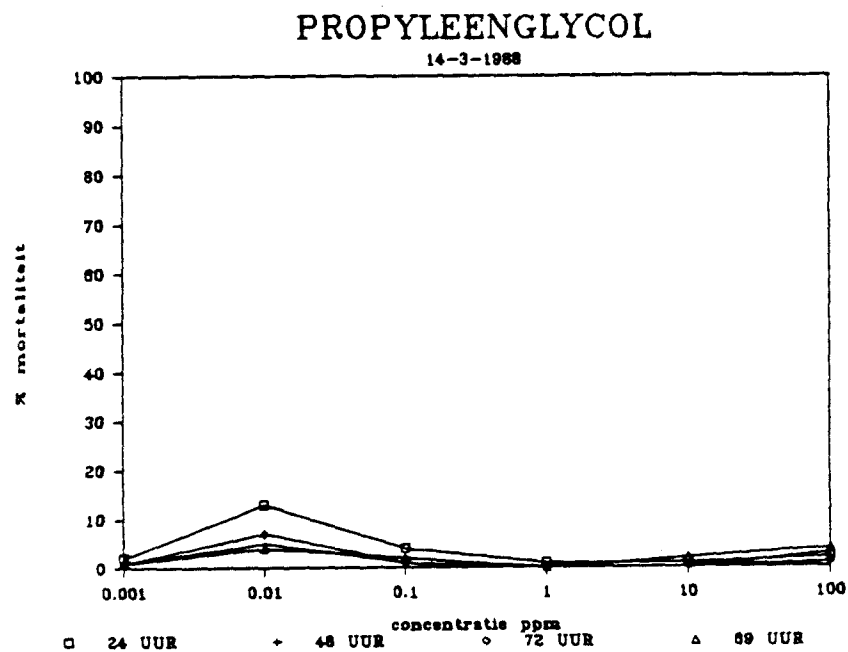


Fig. 53

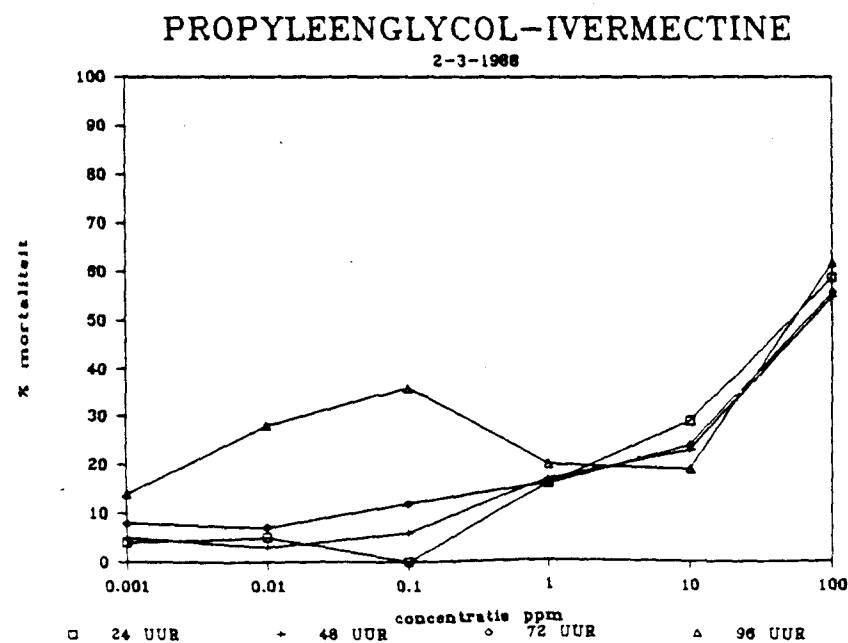


Fig. 54

ROPYLEENGLYCOL-IVERMECTINE

14-3-1988

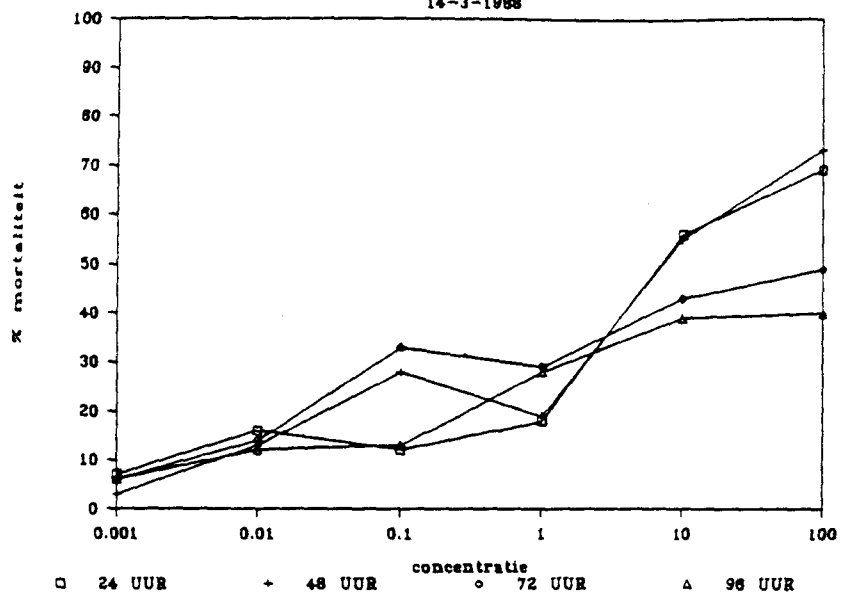


Fig. 55

LEVAMISOLE

2-3-1988

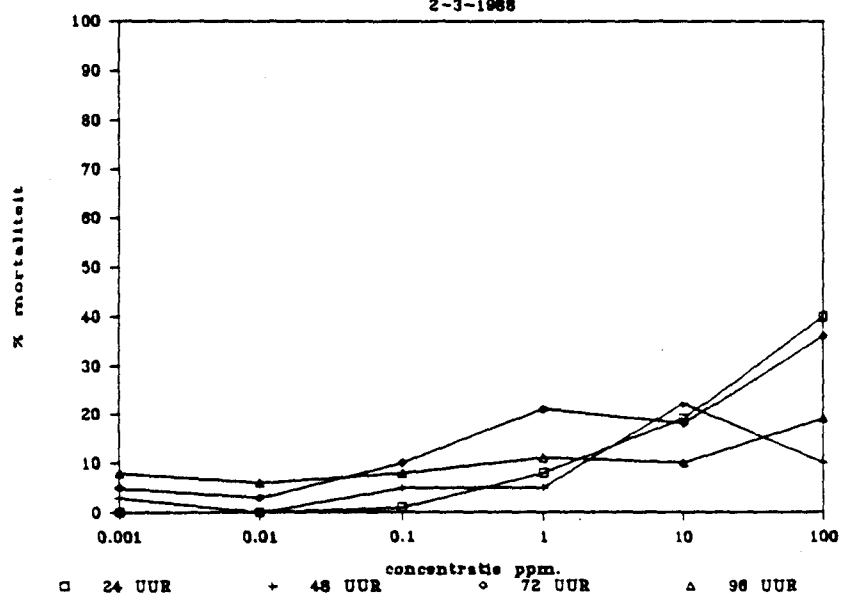


Fig. 56

LEVAMISOLE

14-3-1988

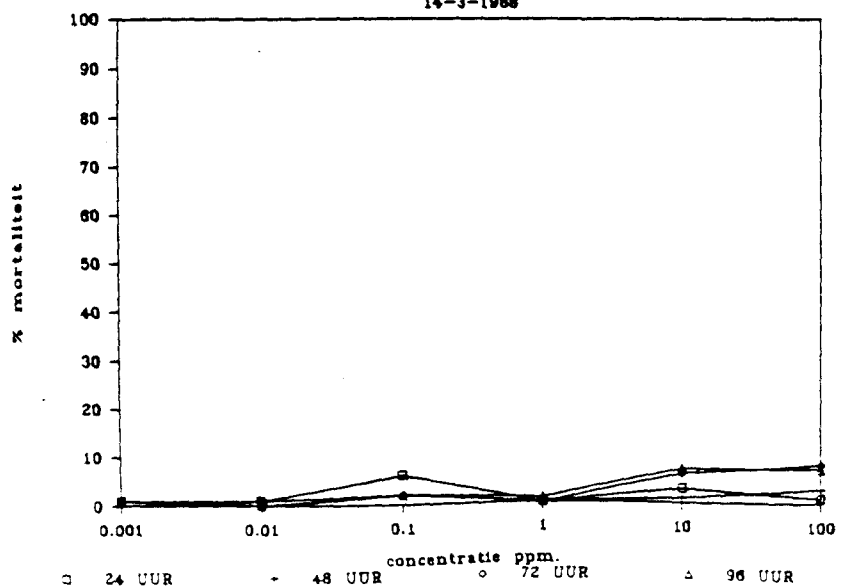


Fig. 57

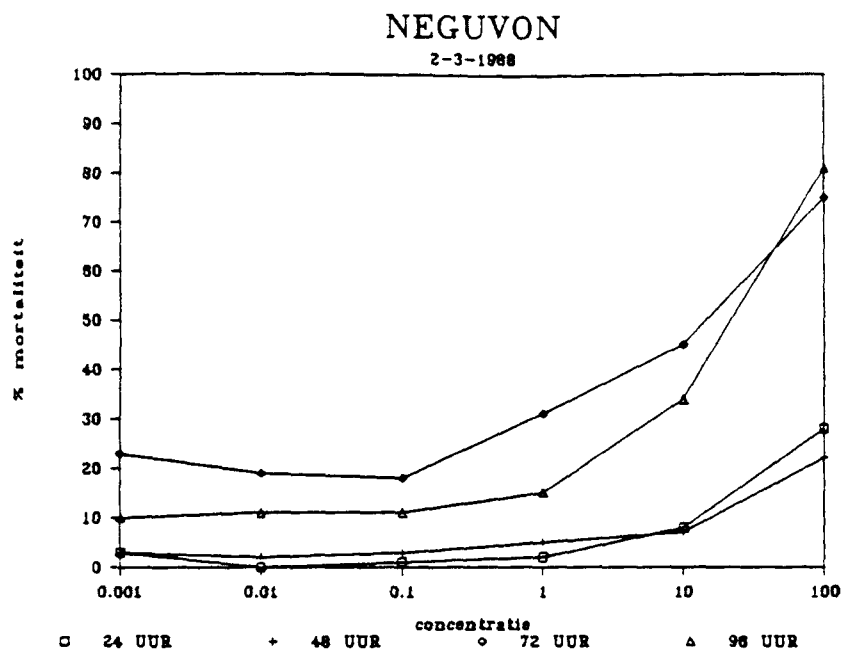


Fig. 58

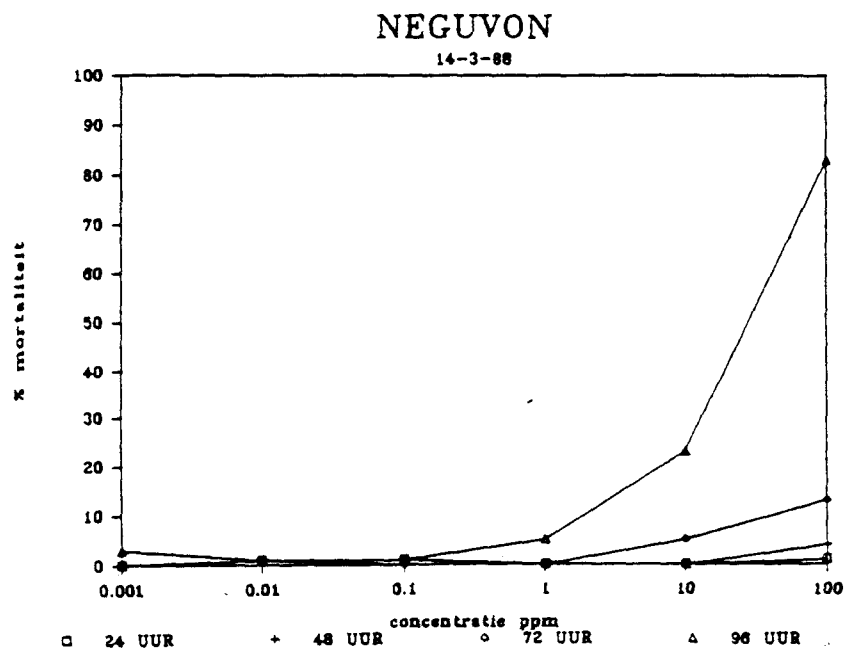


Fig. 59

Blanco fig. 49 en 50 : In geen van beide blanco's oversteeg de bewegingsloosheid de 10%, de testen mogen dus als acceptabel beschouwd worden.

12.4.2.10 Bespreking .

* Thiabendazole (Fig. 51) blijkt niet efficiënt in te werken op deze tweede stadium larven. Zelfs bij concentraties van 100mg/l en na 96h wordt geen "mortaliteit" hoger dan 10% bereikt. Deze mortaliteit ligt niet hoger dan bij de blankogroep. (Aangezien Thiabendazole niet werkzaam is tegen L₂-larven werd dit produkt slechts 1x uitgetest).

* Propyleenglycol (Fig.52 en 53)

Propyleenglycol werd gebruikt als oplosmiddel voor Ivermectine. Hierdoor was het aangewezen propyleenglycol op zich ook uit te testen. Bij de test van het antihelminticum (Ivermectine) mag de concentratie van het oplosmiddel (propyleenglycol) niet boven de 0.5ppm stijgen (REISH en OSHIDA, 1987). De mortaliteit geobserveerd met propyleenglycol, bij de hoogste concentraties (10 en 100ppm) is bij de eerste test verhoogd, bij de herhaling echter niet, de reden hiervoor is onbekend. De lichte stijging van de mortaliteit bij 0.01ppm zowel bij 24, 48, 72 en 96h kon evenmin verklaard worden. Vermits propyleenglycol gebruikt wordt in een concentratie van 0.5ppm, kan besloten worden dat het als oplosmiddel voor Ivermectine geen bijkomende mortaliteit van de L₂-larven veroorzaakt.

* Ivermectine en propyleenglycol (Fig. 54 en 55)

Ivermectine blijkt één van de best werkzame produkten te zijn. De mortaliteit stijgt gestadig met toenemende concentratie. Een logisch verband met de duur van de test komt echter bij het merendeel van de geteste concentraties niet duidelijk naar voor. De stijging te zien bij concentraties 0.01 en 0.1ppm bij 96h is mogelijks te wijten aan een telfout. LC 50 voor de nematoden overstijgt sterk de LC 50 voor de Bluegill Sunfish en de regenboogforel en is (vermoedelijk) daarom (ook) niet bruikbaar in recirkulatiesystemen ter bestrijding van het vrijlevend tweede stadium van *A. crassa*. In dit verband zou het nuttig zijn te weten wat de toxiciteit (LC 50) van Ivermectine voor paling is.

Levamisole HCl (Fig.56 en 57)

Alhoewel Levamisole als best werkzame produkt op adulte nematoden beschreven wordt bij testen in vivo bij besmette paling, blijkt Levamisole niet bruikbaar te zijn op de L₂ stadia van *Anguillicola*. Bij 100ppm worden na 72h slechts 35% van de L₂ larven geïmmobiliseerd..

* Neguvon (Fig.58 en 59)

Bij Neguvon wordt na 96h en een concentratie van 100ppm een hoge immobiliteit van de micronematoden waargenomen. Deze concentratie overschrijdt waarschijnlijk de lethale concentratie voor paling zodat Neguvon ook niet bruikbaar is voor het afdoden van de *Anguillicola* larven in recirkulatiesystemen. Uit de resultaten blijkt wel duidelijk het effect van de concentratie (mortaliteit groter bij grotere concentratie) en het effect van de duur van de test (mortaliteit groter bij langere duur).

11.4.3 Algemeen besluit.

Zoals in Hoofdstuk 3 aangehaald zijn de vrijlevende tweede stadium larven van vele nematoden waaronder *Anguillicola*, omgeven door hun eerste vervellingshuid (CHITWOOD en CHITWOOD, 1950). Deze tweede beschermingslaag naast hun eigen cuticula en het feit dat het tweede stadium waarschijnlijk geen voedsel opneemt, maakt hen bijzonder goed aangepast aan ongunstige omstandigheden van het uitwendig milieu. Het is dan ook niet verwonderlijk dat de uitgeteste middelen in het beste geval slechts bij zeer hoge concentratie effect hadden op deze larven.

Bijlage 4

^xKath. Universiteit Leuven
Zoölogisch Instituut
Naamsestraat 59
3000 Leuven (België)

^{xx}HVA
Fish Farming Development
Dalsteindreef 125
1112 XC Diemen

INHOUDSOPGAVE

I. OVERZICHT VAN DE GEVOLGDE ONDERZOEKSSTRATEGIE.

1. INLEIDING EN DOELSTELLING
2. TERMINOLOGIE, LEVENSCYCLUS VAN *ANGUILLICOLA*, INFECTIEVERLOOP
3. MATERIAAL EN METHODEN

II. EXPERIMENTEN

1. IVERMECTINE

- 1.1. Badexperiment : LC50 proef

2. SAFEWORMER

- 2.1. Badexperiment met verschillende concentraties

3. CLOSANTEL

- 3.1. Badexperiment : toxiciteitsproef.
- 3.2. Badexperiment met Flukiver : Invloed op *Anguillicola*.
- 3.3. Dwangvoederproef met Closantel Drench 5 %

4. MASOTEN

- 4.1. Badexperiment : dosis-effect relatie : korte t.o.v. lange behandelingsduur.

5. OXFENDAZOLE

- 5.1. Badexperiment : toxiciteitstest en dosis-effect relatie.
- 5.2. Badexperiment : dosis-effect relatie : korte t.o.v. lange behandelingsduur.

6. L-LEVAMISOLE.HCl

- 6.1. Injectieproef met L-Ripercol.
- 6.2. Preliminair badexperiment met verschillende concentraties L-Levamisole.HCl.
- 6.3. Grootschalig badexperiment met L-Levamisole.HCl (10 ppm, 36 uur)
- 6.4. Badexperiment : dosis-effect relatie : korte t.o.v. lange behandelingsduur.
- 6.5. Badbehandeling met verschillende concentraties L-Levamisole
- 6.6. Grootschalige badbehandeling met L-Levamisole.HCl (20 ppm, 6 dagen)

7. FLUBENDAZOLE

- 7.1. Grootschalige vergelijkende proef met Flubendazole en Levamisole toegediend via het voer.

III. SAMENVATTING EN CONCLUSIES

IV. KORTE SAMENVATTING

V. LITERATUURLIJST

TEXVIS B.V. PALINGMESTERIJ EEL FARM TEXEL THE NETHERLANDS

VERSLAG : *ANGUILLICOLA* ONDERZOEK BIJ TEXVIS.

Door : Gonda Geets en Evert Liewes

Datum : 28-4-1988

I. OVERZICHT VAN DE GEVOLGDE ONDERZOEKSSTRATEGIE.

1. INLEIDING EN DOELSTELLING.

In 1984 en 1985 werd door Van Banning (1985) een parasiet in de zwemblaas van de Nederlandse paling (*Anguilla anguilla*) aangetroffen nl. *Anguillicola crassa*. Deze zwemblaasnematode is reeds geruime tijd bekend in de Japanse aal (Yamaguti, 1935) en waarschijnlijk met importeren van paling uit het Verre Oosten in Europa terecht gekomen. Reeds in 1985 werd in Italiaanse palingmesterijen melding gemaakt van infecties met deze zwemblaasparasiet (Saroglia, 1985). Deze Italiaanse kwekerijen kampen ten gevolge van de infectie met een verhoogde uitval en groeivertragingen. Ook in de Nederlandse palingmesterijen, welke wilde pootaal als uitgangsmateriaal gebruiken, maken melding van verhoogde sterfte en groeivertraging (Liewes, 1986; Liewes en Schaminee-Main, 1987).

De problemen van de Nederlandse palingmesters en -visseren hebben voor de Directie Visserijen van het Ministerie van Landbouw en Visserij in 1987 de aanleiding gevormd om het RIVO te verzoeken nader onderzoek naar de pathologie en bestrijding van deze parasiet te verrichten. Het RIVO heeft hiertoe een werkgroep opgezet waarbinnen de deskundigen uit verschillende onderzoeksinstellingen en bedrijven hun researchinspanningen hebben gebundeld. Binnen deze opzet heeft het onderzoeksteam van Texvis zich geconcentreerd op het ontwikkelen van een in de praktijk toepasbare behandelingsmethode voor de bestrijding van de zwemblaasnematode *Anguillicola crassa*.

Hierbij werd uitgegaan van reeds bij landbouwhuisdieren gebruikte antiwormmiddelen die aan volgende vereisten moesten voldoen :

- A) Werkzaam zijn tegen hematofage nematoden,
- B) Een duidelijke bloedspiegel opleveren,
- C) Een gemakkelijke toedieningswijze hebben,
- D) Goed geresorbeerd worden,
- E) Weinig of geen residus in het lichaam vormen.
- F) Een geringe visticiteit bezitten.

2. TERMINOLOGIE, LEVENSCYCLUS VAN *ANGUILLICOLA*, INFECTIEVERLOOP

In eerdere publicaties van Liewes en Schaminee-Main (1987) en de voortgangsverslagen I en II van het *Anguillicola*-onderzoek bij Texvis (Geets en Liewes, 1988) geven een globale beschrijving van de levenscyclus van *Anguillicola*. In dit rapport vatten we enkel de voornaamste stadia van de ontwikkeling samen en geven een mogelijk verloop van de infectie weer.

2.1. Terminologie

Vooreerst worden in het kort de termen gedefinieerd die we tijdens ons onderzoek en tijdens de verslaggeving gebruikten :

Anguillicola :

Adulte nematoden : met het blote oog zichtbaar, donker bruin tot zwart gekleurd, meestal mogelijk om het geslacht te bepalen.

Pre-adulte nematoden : niet of moeilijk met het blote oog te zien, op te sporen met binoculaire loupe, weinig of geen bloed in het spijsverteringssysteem, geen differentiatie van de geslachtsorganen.

Larvestadia 2 : microscopisch opsporen, zitten niet meer in een eimembraan, langgerekt met spits staartuiteinde, meestal erg beweeglijk (zie figuur 1.)

Larvestadia 1 : microscopisch op te sporen, nog omgeven door een eimembraan. Tot deze groep werden ook de eistadia gerekend waarin nog geen duidelijke larve te zien was (zie figuur 1.)

2.2. Levenscyclus

De levenscyclus van *Anguillicola* kunnen we in het kort als volgt samenvatten :

In het *Anguillicola crassa* vrouwtje ontwikkelen eitjes die afgezet worden in het lumen van de zwemblaas. Deze eitjes bevatten dan reeds de zogenaamde L 1 stadia larven die binnen het eimembraan reeds volledig als nematoden herkenbaar zijn.

Deze larven ontwikkelen verder tot L 2 stadia waarbij ze door het eimembraan breken en de typische langgerekte vorm met een spits staartuiteinde krijgen. Als L 2 stadia larven migreren ze via de Ductus pneumaticus naar de darm en komen vervolgens met de faeces in het water terecht.

Daar worden ze door hun tussengastheren (Copepoda) opgenomen, en boren zich door de darmwand naar het haemocoel, waar ze tot L 3 stadia ontwikkelen (De Charleroy et al, 1987). Kleine vissen (winde, stekelbaars,...) kunnen ook als stapelgastheer dienst doen (De Charleroy, pers. med). Wanneer de geïnfecteerde tussengastheer door de paling wordt opgenomen, komen de L 3 stadia vrij en dringen door de darmwand heen en migreren naar de zwemblaas, waar ze verder ontwikkelen tot adulte nematoden (zie figuur 2.).

2.3. Infectieverloop

Het infectieverloop is reeds uitgebreid beschreven door Liewes en Schaminee-Main (1987). In deze publicatie werd een voorstel gedaan om het verloop van de zwemblaasinfectie in stadia in te delen. Door nieuwe bevindingen is deze verdeling in infectiestadia iets aangepast en hieronder weergegeven:

Zwemblaas infectiestadia:

Stadium 1: De zwemblaas is volledig normaal en zonder parasitaire nematoden.

Stadium 2: De zwemblaas bevat enkele nematoden, ziet er verder normaal en niet gezwollen uit. In de zwemblaas zijn geen vochtophopingen of ontstekingsprocessen met het blote oog waar te nemen.

Stadium 3 : In dit stadium bevat de zwemblaas soms enkele zeer grote of een groot aantal kleine nematoden. De zwemblaas is iets gezwollen en is gedeeltelijk gevuld met een rood-bruine vloeistof. Soms vertoont de zwemblaaswand tekenen van ontstekingen en is een deel van de Ductus pneumaticus gevuld met een troebele vloeistof.

Stadium 4 : De zwemblaas is nu duidelijk sterk vergroot en ontstoken. De hele zwemblaas is gevuld met een rood-bruine vloeistof. De Ductus pneumaticus is sterk gedillateerd en geheel gevuld met een troebele vloeistof. Veelal bevat een zwemblaas in dit stadium bijna altijd een aantal grote, blijkbaar volwassen nematoden en kunnen in de zwemblaas en soms in de darm actief bewegende nematodenlarven worden waargenomen.

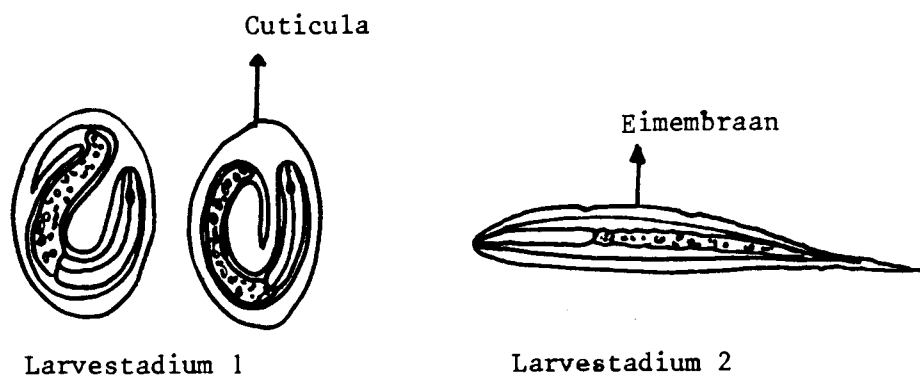
Stadium 5 : Dit stadium kenmerkt zich door een ruptuur van de sterk vergrote en geirriteerde zwemblaas zoals omschreven in stadium 4. De ruptuur kan optreden in zowel de ductus pneumaticus als in de zwemblaas. Veelal is de buikwand van palingen in dit stadium ontstoken en treedt verkleving van de ingewanden op. De grote zwemblaasnematoden die buiten de zwemblaas geraken lyseren doorgaans. Palingen met dit stadium van zwemblaasaantasting hebben van buitenaf zichtbaar een sterk verdikt en ontstoken abdomen.

Stadium 6 : In dit stadium is de ontstoken zwemblaas (mogelijk na ruptuur) geheel verbindweefsel. De zwemblaas zelf wordt omgeven door een soort schuimig weefsel. Binnenin zit vaak een heldere, soms wat rode vloeistof en kunnen soms resten van afgestorven wormen worden aangetroffen.

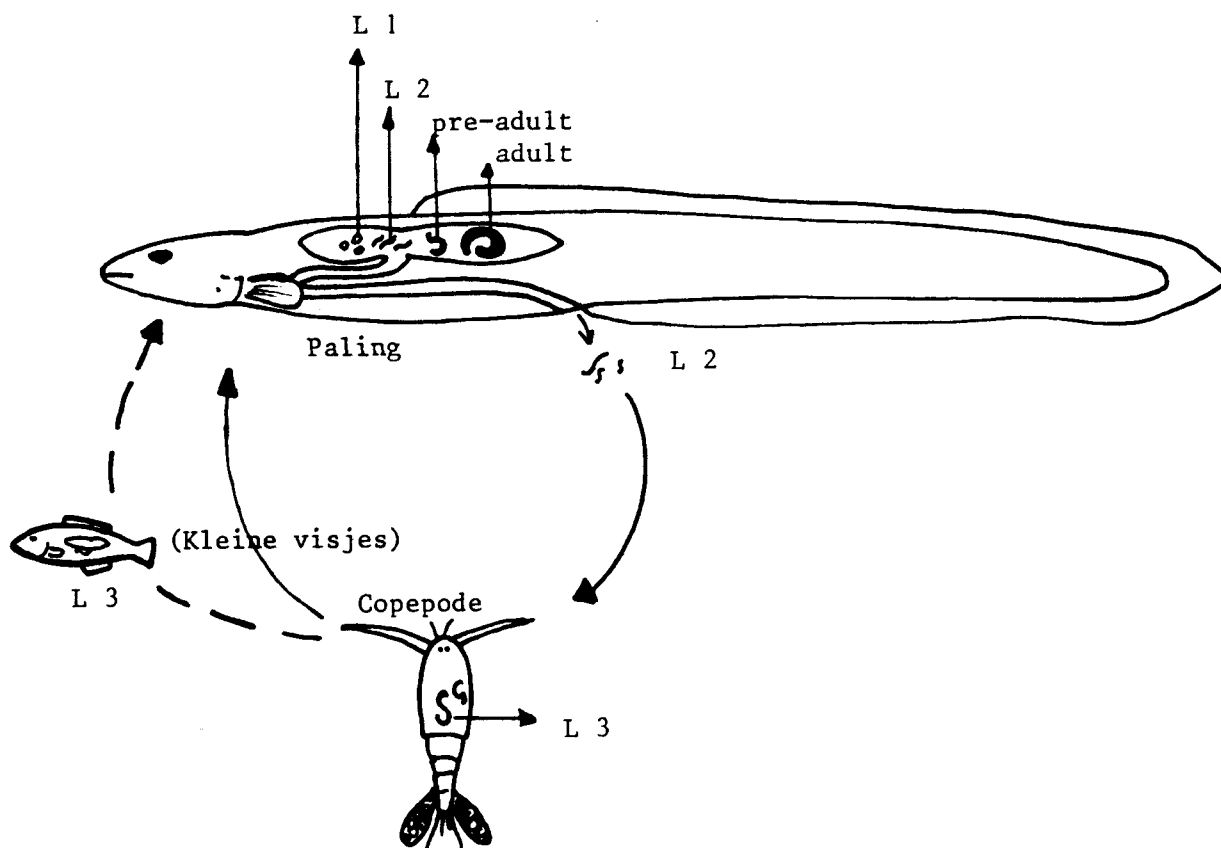
Stadium 7 : De plaats waar de zwemblaas zich zou moeten bevinden wordt nu geheel of gedeeltelijk ingenomen door een bruin-zwarte harde massa. Soms zijn daarin nog resten van wormen terug te vinden en (meestal) onbeweeglijke larvestadia.

Zowel bij stadium 6 als 7 werd in de gegevens een arbitrair getal toegekend voor het aantal nematoden, daar het juiste aantal meestal niet meer te bepalen was.

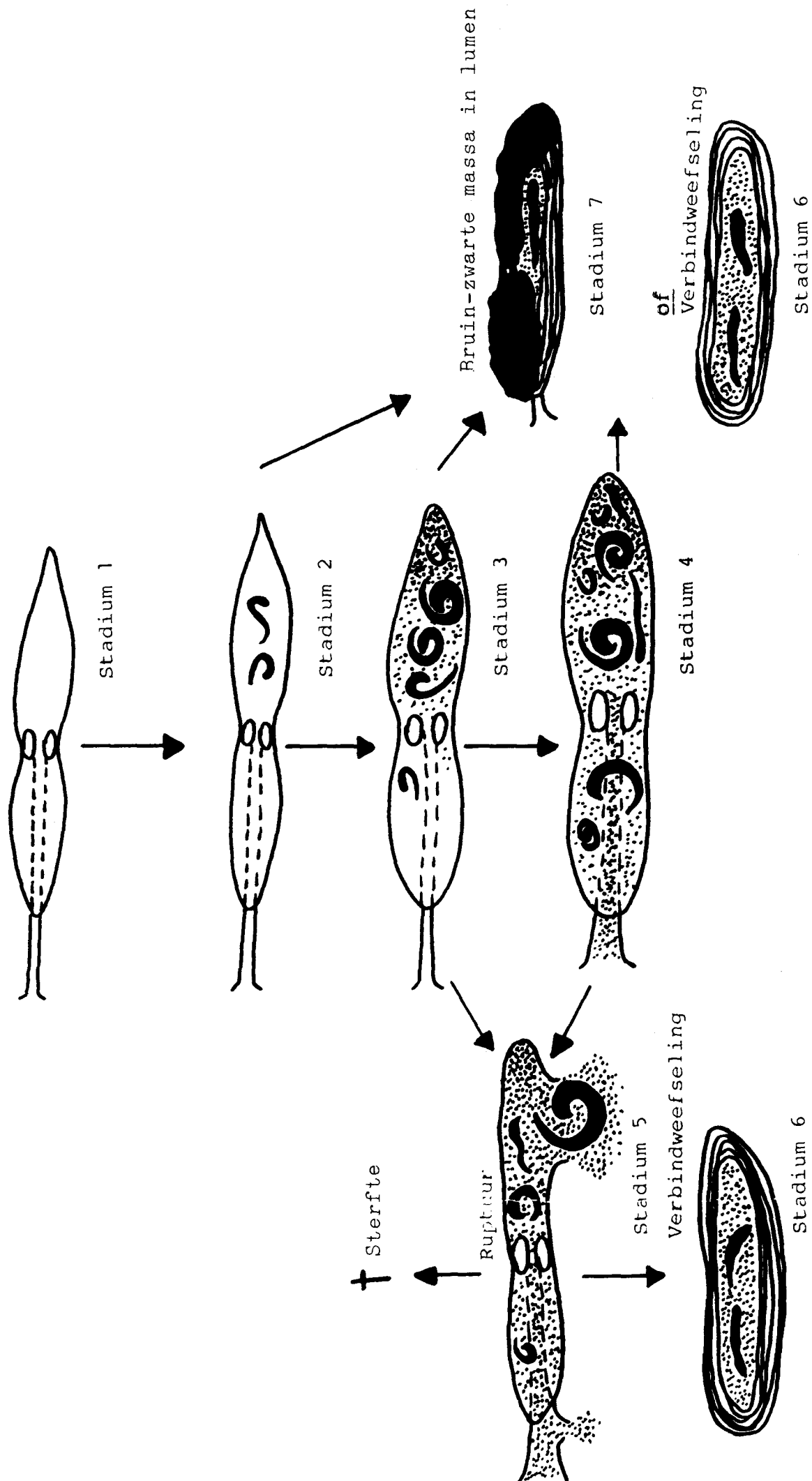
De juiste opeenvolging van deze verschillende infectiestadia is nog niet volledig duidelijk (zie figuur 3.) Stadium 1 tot en met 4 volgen elkaar waarschijnlijk op. Stadium 5, waarin een ruptuur van de zwemblaas kan plaatsvinden zou een vervolg kunnen zijn van een infectie zoals beschreven in stadium 4. Het is echter niet uitgesloten dat de ruptuur ook reeds na vroegere infectiestadia (stadium 3) kan optreden. De ruptuur kan een verbindweefseling of de dood tot gevolg hebben.



Figuur 1. : Larvale stadia 1 en 2 van Anguillicola crassa.



Figuur 2. : Levenscyclus van Anguillicola crassa.



Figuur 3. : Mogelijk klinisch verloop van de zwemblaasinfectie met Anguillicola crassa bij de Europese aal (Anguilla anguilla).

Stadium 6 en 7, waarin verbindweefseling en vorming van de bruin-zwarte massa in het lumen optreden, werden eerst als een logisch gevolg van de ruptuur (stadium 5) beschreven, maar verder onderzoek en onderlinge contacten met andere onderzoekers wijst steeds meer in de richting van een mogelijke verbindweefseling van de zwemblaas, kort na het binnendringen van *Anguillicola* (dus aansluitend op stadium 2 of 3). De verbindweefseling zou aldus een verdere infectie tegengaan. Verder onderzoek zal dit moeten uitwijzen.

3. MATERIAAL EN METHODEN.

3.1. Materiaal.

A. Proefdieren.

Als testmateriaal voor de experimenten werden in 1987 aangekochte wilde pootaal uit het IJsselmeer gebruikt. Wel dient opgemerkt dat in de loop van 1987 (Liewes en Schaminee-Main, 1987) en 1988 de infectiegraad met *Anguillicola* gestadig afnam (van ca. 70 - 90% tot 30 - 40 %) vooral t.g.v. vissterfte en 'veroudering' van de infectie (zie grafiek 1). Daar de geschikte tussengastheren afwezig zijn en de L2-stadia van *Anguillicola* niet kunnen overleven in een marien milieu (30 pro mille) (Thomas, 1987) treedt er binnen het Texvis zoutwater recirculatiesysteem geen herinfectie met *Anguillicola* larven op. Dit heeft tot gevolg dat het aantal palingen geïnfecteerd met zowel adulte-, pre-adulte-, en larvestadia steeds verder afneemt door 'veroudering' van de infectie. Grafiek 2 geeft hiervan een duidelijk beeld.

Alle gegevens van het *Anguillicola* onderzoek werden per maand samengevat vanaf juli 1987 tot en met maart 1988. Hierdoor kregen we een globaal beeld van het verloop van de infectie en het voorkomen van de verschillende stadia van *Anguillicola* in de loop van die periode.

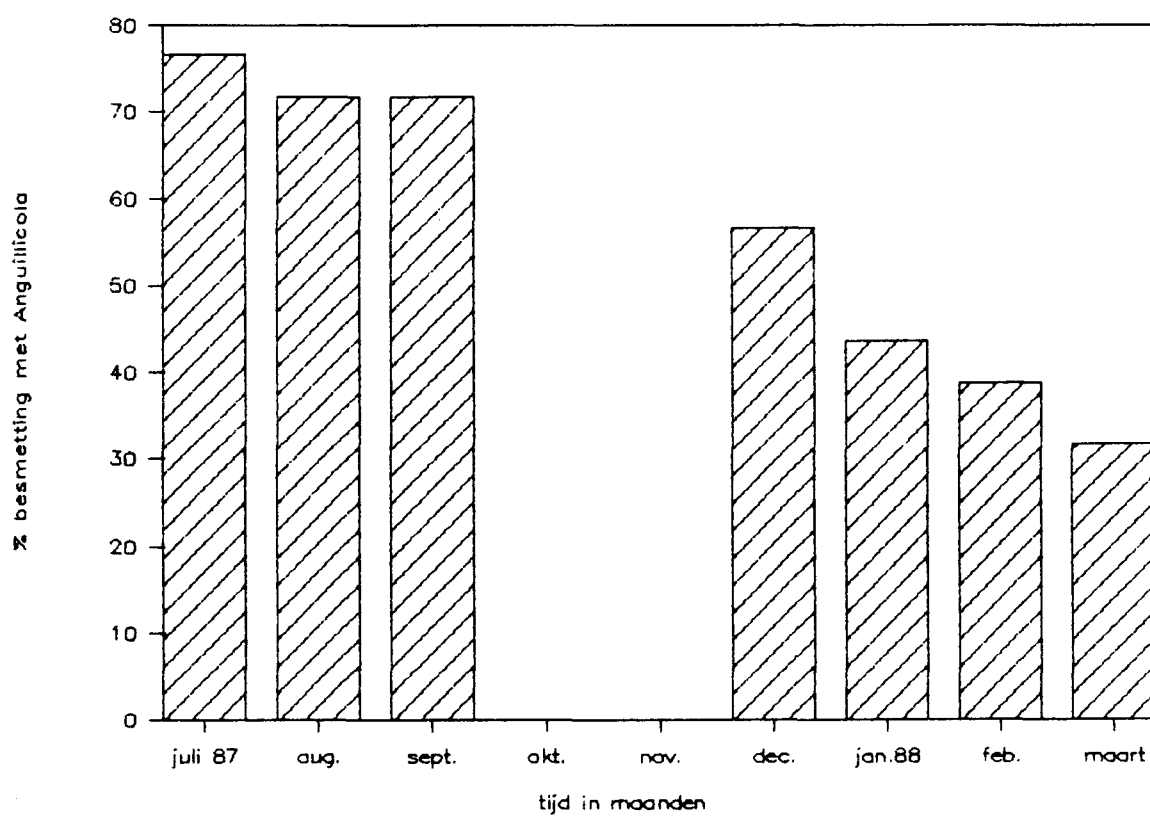
De procentuele besmettingsgraad, beschouwd voor alle stadia (L1, L2, preadulten, adulten) daalt sterk ten gevolge van de sterfte van de zwaarst geïnfecteerde palingen en de afwezigheid van herbesmetting met *Anguillicola* (grafiek 1). Dit is eveneens zo wanneer de stadia apart worden beschouwd (grafiek 2).

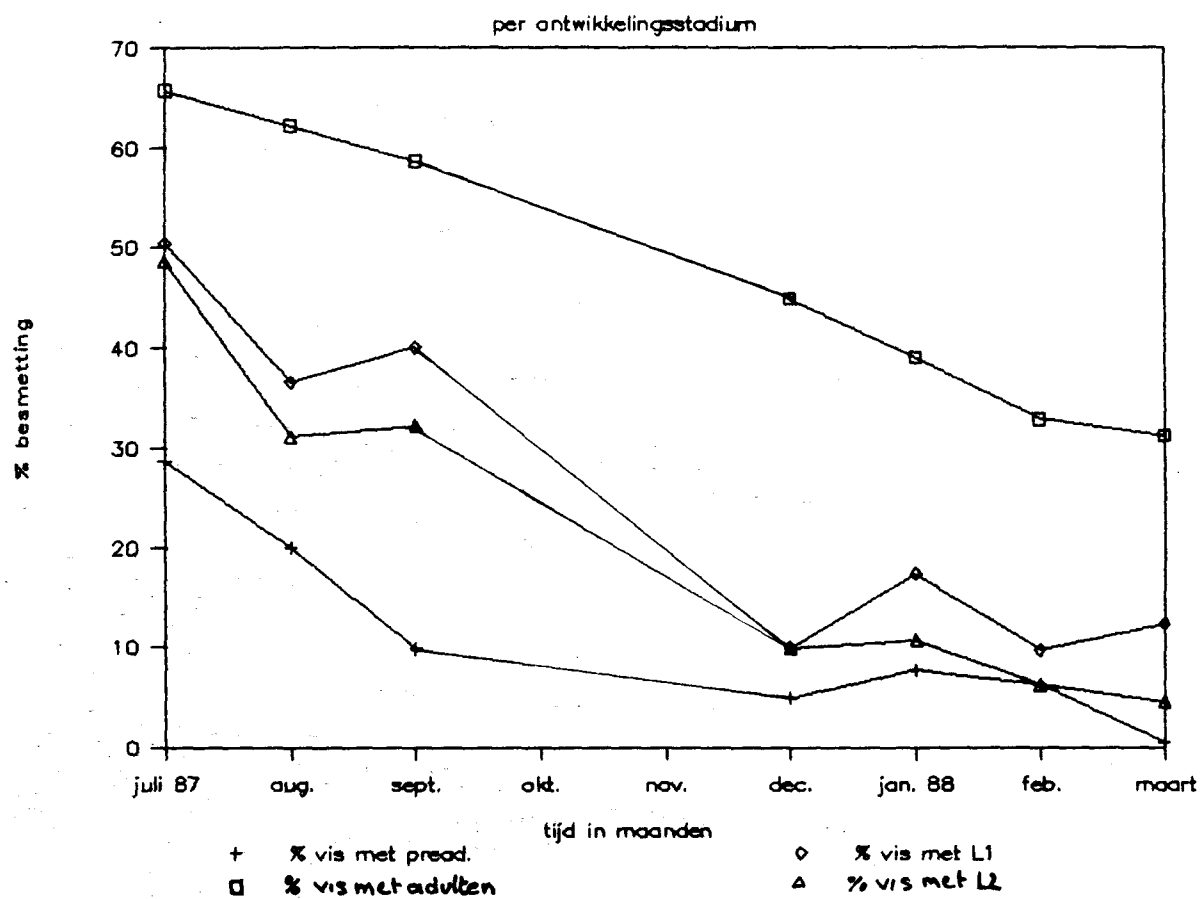
Dit gestadig afnemen van het aantal L1-, L2-, preadulte-, en adulte nematoden had ook consequenties voor de experimenten met antiparasitica.

Sommige gegevens werden moeilijk interpreteerbaar door een te lage infectiegraad (vooral met L1-, en L2-stadia) in de experimentele groepen. Daar het procentuele aantal besmette palingen terugliep in de loop van de tijd, werd het noodzakelijk om steeds meer palingen per experimentele conditie te nemen om aldus over voldoende besmette vissen te beschikken.

Grafiek 1.

verloop Anguillicola besmetting





Grafiek 2: Verloop Anguillicola besmetting in een marien milieu zonder herbesmetting. Besmettingspercentage per ontwikkelingsstadium.

B. Uitgeteste antiparasitica.

Na literatuurstudie en uitgebreide kontakten met de farmaceutische industrie werd een lijst van produkten opgesteld die enigszins aan de eisen, die in de inleiding vermeld zijn, voldeden.

De uitgeteste produkten zijn :

1. Ivermectine (Merck, Sharp and Dohme BV, Haarlem, Nederland)
2. Safewormer (Dierenarts M. Blom)
3. Closantel (Janssen Pharmaceutica, Goirle, Nederland)
4. Masoten (Bayer, Leverkusen Duitsland)
5. Oxfendazole (Syntex International B.V., Rijswijk, Nederland)
6. L-Levamisole (Janssen Pharmaceutica, Beerse, België)
7. Flubendazole (Janssen Pharmaceutica, Beerse, België)

3.2. Methoden.

A. Bepalen van beweeglijkheid van *Anguillicola crassa*.

De beweeglijkheid van de adulte nematoden nadat deze uit de zwemblaas zijn vrijgeprepareerd, werd op twee wijzen uitgetest:

1. een druppel water op de nematode brengen,
2. de onderkant van de petrischaal waarin de nematode ligt zacht verwarmen met een kleine vlam.

Indien de nematode op geen van beide prikkels reageert, wordt ze als onbeweeglijk beschouwd.

Bij de L 1 stadia werden als onbeweeglijk genoteerd die larven die niet bewogen binnen de eimembraan en tevens de vroege larvestadia zoals o.a. de net afgezette eitjes.

Dit heeft voor gevolg dat 'onbeweeglijk' in onze terminologie niet altijd 'dood' hoeft te betekenen.

Soms werden een aantal larven uit de zwemblaas geïsoleerd en een tijd (1 tot 3 dagen) in zoetwater geplaatst om te zien of ze nog levensvatbaar waren. Normaal gezien beginnen de larven dan na enige tijd te bewegen.

B. Behandelingsmethoden.

De meeste proeven betreffen badbehandelingen, daar dit ons inziens de eenvoudigste methode is om alle, ook slecht of niet etende alen, effectief te behandelen. Daarnaast werden ook andere toedieningswijzen uitgetest zoals : via het voer, d.m.v. injecties en dwangvoederen.

In tegenstelling tot de proeven met een aantal antiwormmiddelen van Taraschewski et al. (1988) werden steeds minimaal 10 palingen per proefconditie gebruikt en werd steeds een controleproef ingezet met een gelijk aantal palingen.

C. Gebruik van enkele verdovingsmiddelen.

MS222 (Sandoz)

40 - 80 ppm : gewone verdoving

meer dan 80 ppm : dodende verdoving

Hypnodil (Janssen Pharmaceutica)

5 ppm : verdovend

10 - 25 ppm : dodende dosis

II. EXPERIMENTEN.

1. IVERMECTINE

Fabrikant : MSD-AGVET (Merck, Sharp and Dohme BV, Haarlem)

1.1. Badexperiment : LC50 proef

-Materiaal en methoden.

Gebruikt product : Ivomec injectievloeistof 1 %

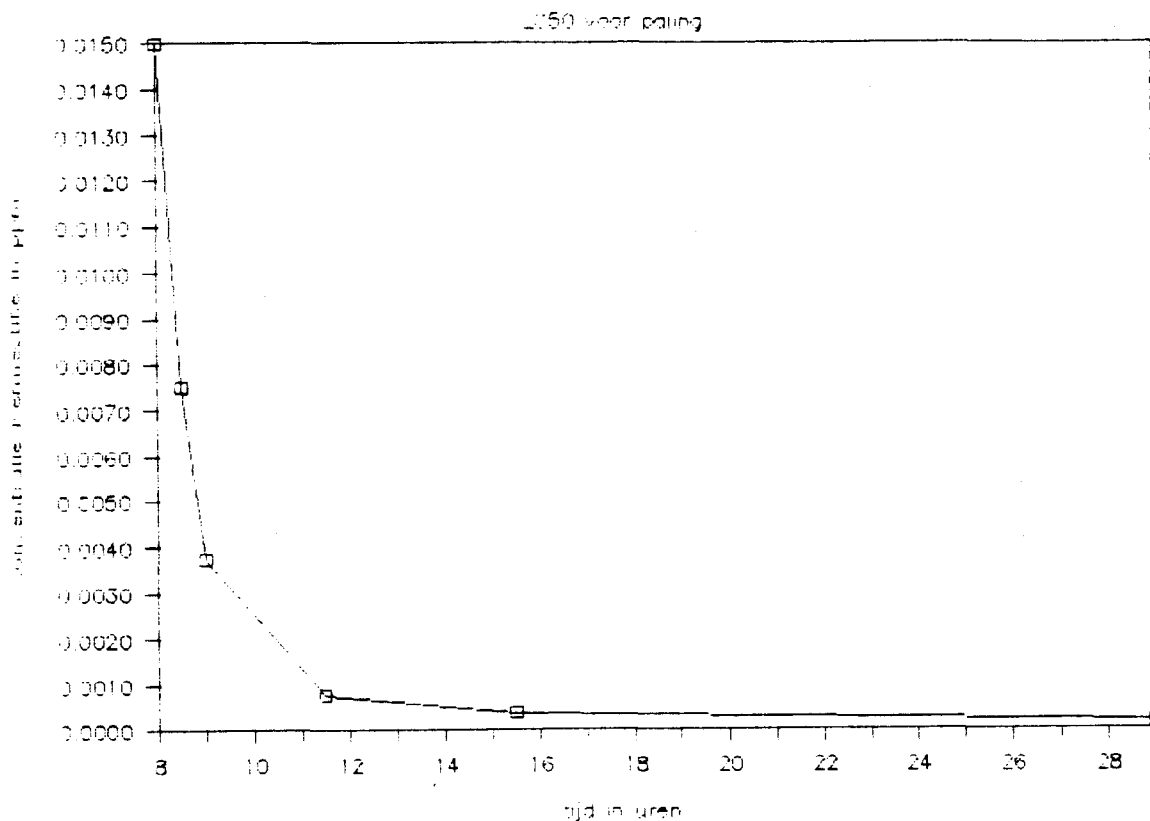
Om de effecten van Ivermectine te leren kennen werd een LC50 proef ingezet met telkens 10 palingen in aquaria met 8 liter zeewater. Doseringen van 0.00018 ppm Ivermectine tot 0.01500 ppm Ivermectine werden uitgetest.

-Resultaten

De toxiciteit van Ivermectine bleek zeer hoog te zijn. Bij een concentratie van 0.00018 mg Ivermectine/liter overleed 50 % van de palingen reeds na 30 uur. Gezien de enorme hoge toxiciteit van het middel werden de proeven niet voortgezet (grafiek 3).

Grafiek 3.

IVERMECTINE :



2. SAFEWORMER

Geneesmiddel verstrekt door dierenarts M. Blom uit Hoevelaken

2.1. Badexperiment met verschillende concentraties.

-Materiaal en methoden.

Gebruikt produkt : wit, oplosbaar poeder

De effecten op *Anguillicola* werden in een badexperiment nagegaan. In aquaria met 8 liter zeewater werden 10 palingen gedurende 5 dagen met volgende concentraties Safewormer behandeld : 0 g/l (=controle), 0.8 g/l (= dosering door de dierenarts opgegeven) en 2.4 g/l (=drie maal de aangegeven dosis).

-Resultaten.

Zowel de gewone dosis Safewormer (0.8 g/l), als de overdosis (2.4 g/l) werd goed verdragen door de palingen (slechts 1 op 10 palingen van de proefgroep 0.8 g/l stierf.)

Er kon geen duidelijk effect van Safewormer op de vitaliteit van *Anguillicola* (alle stadia) worden waargenomen.

De resultaten zijn hieronder weergegeven in tabel 1.

Tabel 1. Badexperiment met Safewormer

Kenmerk	controle	0.8 g/l	2.4 g/l
Aantal palingen	10	10	10
Sterfte %	0 %	10 %	0 %
% Niet geïnfecteerd	0 %	20 %	30 %
% Geïnfecteerd	100 %	80 %	70 %
Aantal adulte wormen	33	17	24
% Beweeglijk	94 %	94 %	88 %
Aantal preadulten	15	0	27
% Beweeglijk	80 %	0	67 %
Vissen met L1-stadia	5	6	4
% Beweeglijke L1	83 %	100 %	50 %
Vissen met L2-stadia	4	6	2
% Beweeglijke L2	80 %	100 %	100 %

3. CLOSANTEL

Fabrikant : Janssen Pharmaceutica, Goirle, Nederland

3.1. Badexperiment : toxiciteitsproef.

-Materiaal en methoden.

Gebruikt produkt : Flukiver, injecteerbaar antiparasiticum
Om inzicht te krijgen in de toxiciteit van Flukiver werd een badexperiment in aquaria ingezet. Concentraties van 2.5 mg Closantel/liter tot 100 mg Closantel/liter werden uitgetest. De proeven werden in zoet water uitgevoerd, daar uit een oplosbaarheidsproef bleek dat Flukiver sterk uitvlokke in zout water. Ook hier werden per concentratie 10 palingen uitgetest.

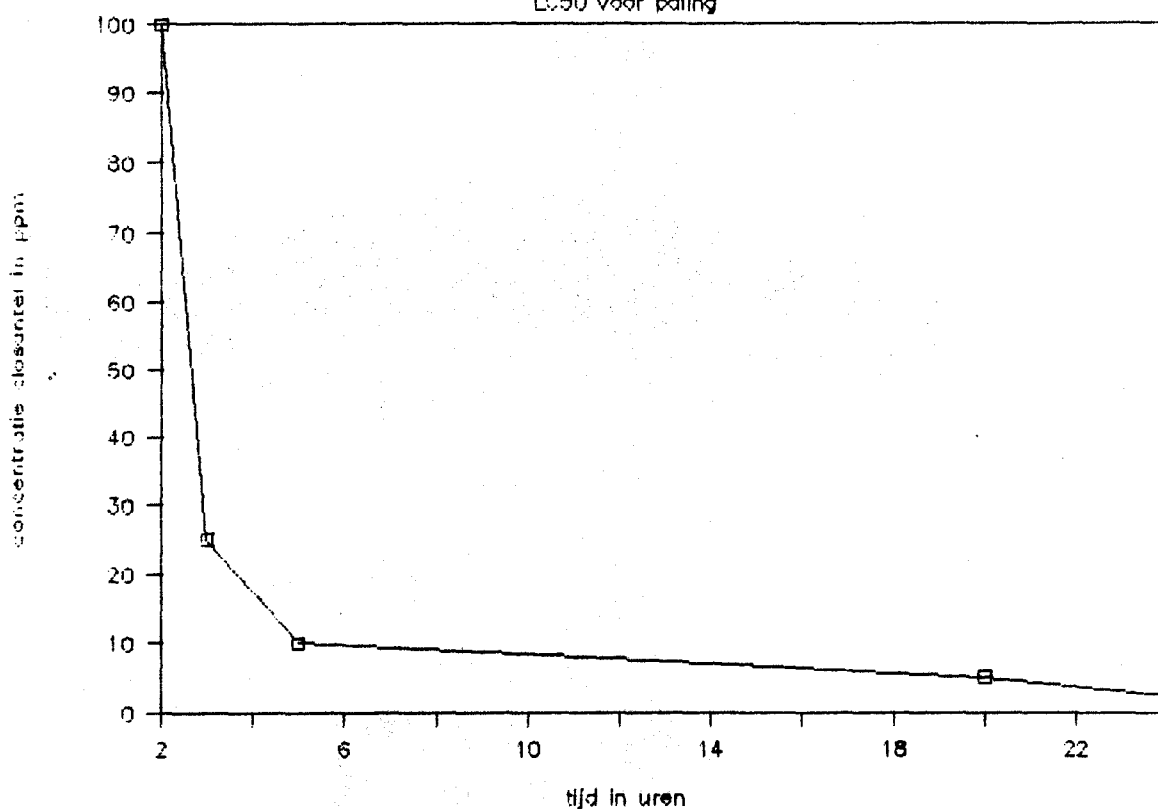
-Resultaten

Flukiver bleek betrekkelijk toxisch te zijn voor palingen. Bij een concentratie van 2.5 mg/l stierf 50 % van de palingen na 24 uur. (zie grafiek 4.)

Grafiek 4.

CLOSANTEL :

LC50 voor paling



-Materiaal en methoden.

Op basis van de gegevens van de vorige proef werd een badbehandeling opgezet met concentraties van 0.25 mg Closantel/ liter tot 10.00 mg Closantel/ liter en een behandelingsduur van 24 uur. Tevens werden ook twee controlegroepen ingezet. Ook hier werd de proef uitgevoerd in aquaria met 8 liter zoetwater met telkens 10 palingen. Het risico werd genomen dat een deel van de palingen voor het beeindigen van het experiment zouden sterven als gevolg van de hoge toxiciteit van Flukiver. Deze werden dan aan een post-mortem onderzoek op *Anguillicola* onderworpen.

-Resultaten

De LC50 dosis voor Flukiver na de badbehandeling van 24 uur ligt rond 2.5 mg/l. In de bijgaande tabel is dit verder gespecificeerd:

CLOSANTEL MG/LITER :	0.00	0.25	0.50	1.00	2.50	5.00	10.00
MORTALITEIT NA :STUKS	0	0	0	0	6	10	10
24 hr BLOOTSTELLING: %	0	0	0	0	60	100	100

Wat de werking van Flukiver betreft bleek de badbehandelingsmethode geen enkel aantoonbaar effect te hebben op de adulte of pre-adulte stadia in geen van de uitgeteste concentraties bij 24 uur behandeling. De werking op L1- en L2-stadia is zeer moeilijk te bepalen daar een te klein aantal vissen met deze stadia geïnfecteerd waren (zie tabel 2).

3.3 Dwangvoederproef met Closantel Drench 5 %

-Materiaal en methoden.

Gebruikt produkt : Closantel Drench 5 %

Daar niet uitgesloten werd dat de badbehandeling met Flukiver geen effect had t.g.v. de slechte oplosbaarheid en/of opname van Closantel, werd besloten het middel per os toe te dienen. Een dwangvoederproef werd opgezet omdat palingen in kleine groepjes in aquaria doorgaans moeilijk aan het eten te krijgen zijn. Twee methoden van dwangvoederen werden uitgeprobeerd :

- A) via een deegballetje : maar deze werden veelal na enkele minuten uitgespuwd.
- B) d.m.v. een injectiespuit oraal toedienen : deze methode leek de meest effectieve, en werd in dit experiment dan ook gebruikt.

De dosering die op landbouwhuisdieren van toepassing is nl. 10 mg Closantel per kg lichaamsgewicht, werd ook in deze proef aangehouden. De 20 palingen werden na de toediening van Closantel in aquaria met 8 liter zeewater gezet en na 6.5 dagen gedissecteerd.

-Resultaten.

De dosering bleek niet toxisch te zijn voor de palingen, want allen overleefden ze de duur van het experiment.

Wat de werking op *Anguillicola* betreft : het percentage onbeveeglijke adulte wormen is iets hoger in de Closantelgroep, nl. 11.8 % , dan in de controlegroep, nl. 0 %. Ook het percentage gelyseerde adulte wormen ligt iets hoger in de behandelde groepen (23.5 % t.o.v. 7.7 %). Op de larvestadia had Closantel blijkbaar weinig of geen effect. Er waren echter een te klein aantal vissen met larvestadia geïnfecteerd om hieruit definitieve conclusies te trekken (zie tabel 3).

Van een afdoende behandeling van de parasitaire infectie met Closantel is echter nog geen sprake.

Tabel 2. :

BADBEHANDELING FLUKIVER 24 uur

Concentraties CLOSANTEL in mg/l	0	0	0.25	0.50	1.00	2.50	5.00	10.00
n palingen	10	10	10	10	10	10	10	10
n geïnfect.	5	4	3	3	7	4	4	5
% geïnfect.	50	40	30	30	70	40	40	50
n vissen met adulte wormen	5	4	3	2	5	3	4	4
% vissen met adulte wormen	100	100	100	66.6	71.4	75	100	80
gem. n wormen per vis (min-max)	4.4 (1-16)	4.25 (1-8)	4.33 (1-10)	3 (3)	2.6 (1-7)	3 (1-6)	3.75 (3-6)	3 (1-5)
tot. n adulten	22	17	13	6	13	9	15	12
% beweeglijk (aantal)	86.4 19	70.6 12	92.3 12	100 6	84.5 11	100 9	100 15	100 12
% onbeweeglijk (aantal)	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
% gelyseerd (aantal)	13.6 3	29.4 5	7.7 1	0 0	15.4 2	0 0	0 0	0 0
n vissen met preadulte wormen	0	0	2	0	3	1	1	0
% vissen met preadulte wormen			66.7		42.9	25	25	
gem. n wormen per vis			1.5		2	10	1	
tot. n preadulten	0	0	3	0	6	10	1	0
% beweeglijk (aantal)			100 3		100 6	100 10	100 1	
% onbeweeglijk (aantal)			0 0		0 0	0 0	0 0	
% gelyseerd (aantal)			0 0		0 0	0 0	0 0	
n vissen met stadium 1 larven	2	2	3	3	2	1	1	0
% vissen met stadium 1 larven	40	50	100	100	28.6	25	25	
% beweeglijk	100	25	83.3	50	100	100	100	
% onbeweeglijk	0	75	16.6	50	0	0	0	
n vissen met stadium 2 larven	3	2	0	3	0	0	1	1
% vissen met stadium 2 larven	60	50		100			25	20
% beweeglijk	66.7	0		16.7			100	0
% onbeweeglijk	33.3	100		83.3			0	100

Tabel 3. :

DWANGVOEDERPROEF CLOSANTEL DRENCH 5 %

	CLOSANTEL 6.5 d	CONTROLE 6.5 d
n palingen	20	10
n geïnfect.	8	6
% geïnfect.	40	60
n vissen met adulte wormen	7	6
% vissen met adulte wormen	35	60
gem. n wormen per vis (min-max)	2.43 (1-5)	2.16 (1-3)
tot. n adulten	17	13
% beweeglijk (aantal)	64.7 11	92.3 12
% onbeweeglijk (aantal)	11.8 2	0 0
% gelyseerd (aantal)	23.5 4	7.7 0
n vissen met preadulte wormen	1	0
% vissen met preadulte wormen	12.5	
gem. n wormen per vis	10	
tot. n preadulten	10	0
% beweeglijk (aantal)	100 10	
% onbeweeglijk (aantal)	0	
% gelyseerd (aantal)	0	
n vissen met stadium 1 larven	1	4
% vissen met stadium 1 larven	12.5	66.7
% beweeglijk	50	25
% onbeweeglijk	50	75
n vissen met stadium 2 larven	3	2
% vissen met stadium 2 larven	37.5	33.3
% beweeglijk	16.7	25
% onbeweeglijk	33.3	75

4. MASOTEN

Fabrikant : Bayer, Leverkusen Duitsland

Werkzame stof : 80 % (2,2,2 trichloro-1-hydroxy-ethyl)- fosfon-
zuur-dimethylester.

4.1. Badexperiment : dosis-effect relatie : korte t.o.v. lange
behandelingsduur.

----- -Materiaal en methoden

Volgens Ghittino jr. (pers. med.) kon Masoten succes- vol worden ingezet in de bestrijding van *Anguillicola* door toediening via het voer. Van oudsher wordt Masoten vooral gebruikt om ectoparasieten te bestrijden via badbehandelingen. Van de behandeling is bekend dat reeds een lage dosering toxisch is voor palingen (ca.1 ppm wordt volgens de fabrikant goed verdragen). Voor onze experimenten werd een concentratie van 0.5 mg Masoten/ liter aangehouden. Masoten werd als middel opgenomen in een vergelijkend badexperiment met andere antiparasitica onder de volgende experimentele condities :

- Masoten : 0.5 mg/l, 24 uur en 6.5 dagen behandeling
- Oxfendazole : 20 mg/l, 24 uur en 6.5 dagen behandeling
- L-Levamisole : 20 mg/l, 24 uur en 6.5 dagen behandeling
- Controlegroepen : geen behandeling.

De resultaten voor Oxfendazole en Levamisole worden in de volgende paragrafen per produkt besproken (cfr. infra). De proeven werden op 10 palingen per conditie uitgevoerd en in aquaria met 8 liter zeewater.

-Resultaat.

De toegediende dosis Masoten (0.5 mg/l) werd goed door de palingen verdragen maar uit de gegevens kon geen enkel effect van Masoten op *Anguillicola* worden aangetoond (zie tabel 4).

5. OXFENDAZOLE

Fabrikant : Syntex International B.V., Rijswijk

5.1. Badexperiment : toxiciteitstest en dosis-effect relatie.

----- -Materiaal en methoden.

Gebruikt produkt : Synanthic 500 ml suspensie 2.265 % Oxfendazole
Oxfendazole wordt bij landbouwhuisdieren met succes gebruikt voor de bestrijding van buiten de maag-darm tractus verblijvende nematoden. Over het gebruik van dit middel bij vissen was bij de producent geen literatuur bekend. Daarom werd eerst een eenvoudig badexperiment ingezet waarbij telkens 10 palingen aan volgende concentraties Oxfendazole werden blootgesteld :1.4 mg/l, 2.8 mg/l, 11.3 mg/l, 17 mg/l en 22.7 mg/l gedurende een periode van 5 dagen.

Tabel 4. :

KORTE & LANGE BEHANDELINGSDUUR : PROEF MET VERSCHILLENDE ANTHELMINTICA

	CONTROLE		OXFENDAZOLE		LEVAMISOLE		MASOTEN	
	24 h	6.5 d	24 h	6.5 d	24 h	6.5 d	24 h	6.5 d
n palingen	10	10	10	10	10	10	10	10
n geïnfect.	2	6	5	3	6	4	5	5
% geïnfect.	20	60	50	30	60	40	50	50
n vissen met adulte wormen	2	6	4	2	6	4	4	2
% vissen met adulte wormen	20	60	40	20	60	40	40	50
gem. n wormen per vis (min-max)	3.5 (2-5)	2.16 (1-3)	3.5 (1-7)	3.5 (3-4)	3.3 (1-11)	1.75 (1-3)	2.75 (1-5)	3.4 (1-9)
tot. n adulten	7	13	14	7	20	7	11	17
% beweeglijk (aantal)	100 7	92.3 12	71.4 10	85.7 6	15 3	0 0	90.9 10	82.4 14
% onbeweeglijk (aantal)	0 0	0 0	0 0	0 0	65 13	100 7	0 0	11.8 2
% gelyseerd (aantal)	0 0	7.7 0	28.6 4	14.3 1	20 4	0 0	9.1 1	5.9 1
n vissen met preadulte wormen	0	0	3	1	0	0	2	0
% vissen met preadulte wormen			60	33.3			40	
gem. n wormen per vis			1	4			2	
tot. n preadulten	0	0	3	4	0	0	4	0
% beweeglijk (aantal)			33.3 1	0 0			100 4	
% onbeweeglijk (aantal)			66.7 2	100 4			0 0	
% gelyseerd (aantal)			0 0	0 0			0 0	
n vissen met stadium 1 larven	1	4	3	1	2	0	3	1
% vissen met stadium 1 larven	50	66.7	60	33.3	33.3		60	20
% beweeglijk	100	25	100	50	50		100	100
% onbeweeglijk	0	75	0	50	50		0	0
n vissen met stadium 2 larven	0	2	2	1	0	0	1	1
% vissen met stadium 2 larven		33.3	40	33.3			20	20
% beweeglijk		25	100	50			100	100
% onbeweeglijk		75	0	50			0	0
% vissen met :								
rode anus	0	0	0	0	0	0	0	10
puntbloedingen	0	30	0	20	0	50	0	10
bleke lever	20	20	10	0	10	20	20	50

-Resultaten.

De toxiciteit van het middel blijkt gering te zijn want bij 22.7 mg Oxfendazole/ liter trad geen sterfte op. Het percentage beweeglijke *Anguillicola*-adulten lijkt af te nemen met toenemende concentratie Oxfendazole. Eenzelfde beeld is zichtbaar voor de larvenstadia 2. Alhoewel de beweeglijkheid en hoogstwaarschijnlijk ook de levensvatbaarheid van de adulten en de L2 stadia is afgenomen, is er van totale afdoding door middel van Oxfendazole nog geen sprake (zie tabel 5).

Tabel 5. : Badexperiment met Oxfendazole

Duur badbehandeling : 5 dagen Vissen onderzocht na : 5 dagen

Oxfendazole mg/l	0	1.4	2.8	11.3	17.0	22.7
Aantal palingen	10	10	10	10	10	10
Sterfte (niet onderzocht)	1	0	0	0	1	0
% met <i>Anguillicola</i> besmet	100	70	90	80	100	100
Gemidd. aantal adulten						
per geïnfecteerde vis	2.9	2.9	4.7	2.1	2.0	1.0*
% Beweeglijke adulten	96	85	55	56	94	20
Gemidd. aantal pre-adulten						
per geïnfecteerde vis	0.1	0.4	0.1	0	0	0
% Geïnfect.vis met pre-ad.	11	43	11	0	0	0
% Beweeglijke pre-ad.	100	33	100	0	0	0
% Geïnfecteerde vis met						
Larvestadium 1	44	43	33	50	56	60
% Beweeglijke L1	75	17	33	63	80	33
% Geïnfecteerde vis met						
Larvestadium 2	44	43	22	50	67	60
% Beweeglijke L2	100	10	60	12	50	33

* moeilijk exact te bepalen daar in deze groep veel verbindweefselde zwemblazen en gelyseerde nematoden voorkwamen.

5.2. Badexperiment : dosis-effect relatie : korte t.o.v. lange behandelingsduur.

-Materiaal en methoden.

Op basis van de vorige resultaten werd besloten nogmaals een badbehandeling met Oxfendazole (20 mg/l) op te zetten en dit met een variërende behandelingsduur (24 uur en 6.5 dagen). Weerom werd de proef op 10 palingen uitgevoerd in aquaria met 8 liter zeewater.

-Resultaten.

Uit deze proef bleek geen duidelijk effect van Oxfendazole op de beweeglijkheid van zowel adulte, pre-adulte als larvestadia van *Anguillicola*. Alhoewel het percentage gelyseerde adulte nematoden iets hoger ligt in de Oxfendazolegroep (24 uur : 28.6 % en 6.5 dagen : 14.3 %) dan in de controle (24 uur : 0 % en 6.5 dagen : 7.7 %), zijn deze verschillen niet overtuigend genoeg om van een effectieve behandeling te spreken (zie tabel 4).

6. L-LEVAMISOLE

Fabrikant : Janssen Pharmaceutica, Beerse België

L-Levamisole is bekend als een antiwormmiddel dat zeer goed geresorbeerd wordt uit de darmtraktus bij zoogdieren, dat snel hoge bloedspiegels geeft, weinig toxisch is en snel gemetaboliseerd wordt. Vandaar dat L-Levamisole.HCl een ideaal antiwormmiddel leek om uit te testen.

6.1. Injectieproef met L-Ripercol.

-Materiaal en methoden

Gebruikt produkt : L-Ripercol 10 % injectievloeistof.

In deze preliminaire proeven werd de toxiciteit van L-Levamisole voor vissen uitgetest. Hiertoe werden 10 palingen van ca 100 g stuksgewicht met L-Ripercol (verdund in FPBS =Fish Physiological Buffered Saline). ingespoten. De aangehouden dosering was 5 mg L-Levamisole per kg lichaamsgewicht. Vooraf werden de palingen met MS222 (Sandoz) verdoofd.

-Resultaten

Bij een intramusculaire injectie van 5 mg L-Levamisole.HCl/kg lichaamsgewicht werden geen opmerkelijke gedragsstoringen of sterften geconstateerd in een periode van 3 dagen.

6.2. Preliminair badexperiment met verschillende concentraties L-Levamisole.HCl.

-Materiaal en methoden

Gebruikt produkt : Ripercol 10 % injectievloeistof

Drie concentraties L-Levamisole.HCl nl. 19.2 mg/l, 29.5 mg/l en 59.0 mg/l, werden in een badexperiment in aquaria met 8 l zeewater op groepen van 10 palingen uitgetest. De vissen werden gedurende 8 tot 9 dagen aan deze concentratie blootgesteld.

-Resultaten

L-Levamisole blijkt weinig toxisch te zijn voor palingen want zelfs bij de hoogst uitgeteste concentratie nl. 59,0 mg/l werd geen sterfte waargenomen.

Het aantal beweeglijke *Anguillicola*-adulten was sterk gedaald (in de controle 100 % beweeglijk, in de met Levamisole behandelde groepen 0 - 12 % beweeglijk). Het effect op de pre-adulten was nog evidentier. Bij alle L-Levamisole concentraties waren de pre-adulten onbeweeglijk geworden (100 % beweeglijk in de controle). De beweeglijkheid van de L1 en L2 stadia blijkt af te nemen maar dit effect is minder duidelijk (zie tabel 6).

Tabel 6. : Preliminair badexperiment met L-Levamisole
 Duur behandeling : 9 dagen
 Vissen onderzocht: 50 % na 8 dagen, 50 % na 9 dagen

L-Levamisole.HCl mg/l	0.0	19.2	29.5	59.0
Aantal palingen	10	10	10	10
Sterfte (niet onderzocht)	0	1	0	0
% met <i>Anguillicola</i> besmet	90	89	80	80
Gemidd.aantal adulten				
per geïnfecteerde vis	3.1	4.4	4.1	2.3
% Beweeglijke adulten	100	6	0	12
Gemidd. aantal pre-adulten				
per geïnfecteerde vis	0.7	0.8	0.9	1.8
% Geïnfect.vis met pre-ad.	44	38	50	25
% Beweeglijke pre-adulten	100	0	0	0
% Geïnfecteerde vis met				
Larvestadium 1	38	100	50	38
% Beweeglijke L1	100	56	75	33
% Geïnfecteerde vis met				
Larvestadium 2	44	88	38	38
% Beweeglijke L2	100	50	68	33

6.3. Grootschalige badbehandeling met L-Levamisole.HCl. (10 ppm, 36 uur)

-Materiaal en methoden

Gebruikt produkt : Ripercol 10 % injectievloeistof
 In oktober 1987 werd een bassin met 433.8 kg paling (gemiddeld stuksgewicht 24.5 gram) met L-Levamisole (10 ppm, 36 uur) behandeld. Tijdens de behandeling werd geen abnormaal gedrag of sterfte waargenomen. Ca. 2.5 maanden later (9-12-1987) werden 30 palingen uit dat bassin op *Anguillicola* onderzocht. Als controle werden tevens 30 palingen uit een onbehandelde bak onderzocht. Die bak bevatte 642.7 kg paling met een gemiddeld stuksgewicht van 17.0 g.

-Resultaten

Allereerst dient opgemerkt te worden dat het aantal pre-adulten die nog gevonden werden sterk afnam t.o.v. voorgaande onderzoeken in juni-juli 1987. Dit is niet geheel onverwacht daar in zout water de levenscyclus van *Anguillicola* niet gesloten is en er geen herinfectie optreedt (cfr.supra). Verder bleek het zwemblaasinfectiestadium over het algemeen naar stadium 5 tot 7 verschoven. Voordien was dit ongeveer 2-3, hetgeen op een 'rijping' van de infectie duidt.

De resultaten qua effect op *Anguillicola* waren minder overtuigend dan verwacht. Desondanks blijkt de behandelde groep toch een kleiner aantal beweeglijke adulte nematoden (21.4 %) te bevatten dan de controlegroep (65.4 %). Dit is ook zo voor de pre-adulten nl. 9.1 % beweeglijk in de behandelde groep t.o.v. 50 % in de controlegroep (dit waren echter maar 2 besmette vissen). Verder lijken ook de larvestadia minder beweeglijk te zijn maar hieruit zijn moeilijk conclusies te halen vanwege een te klein aantal vissen die daarmee besmet waren (zie tabel 7).

Tabel 7. : Grootschalige badbehandeling met Levamisole
Ripercol 10 ppm, 36 uur

	CONTROLE	LEV.HCl
n palingen	30	30
n geïnfect.	14	19
% geïnfect.	46.7	63.3
n vissen met adulte wormen	12	17
% geïnfect.vissen met adulte wormen	85.7	89.5
gem. n wormen per vis	2.17	1.94
tot. n adulten	26	42
% beweeglijk	65.4	21.4
% onbeweeglijk	30.8	52.4
% gelyseerd	3.8	26.2
som % onbew. & % gelyseerd	34.6	78.6
n vissen met preadulte wormen	1	4
% vissen met preadulte wormen	7.1	21.1
gem. n wormen per vis	1	5.5
tot. n preadulten	1	22
% beweeglijk	0	9.1
% onbeweeglijk	100	77.3
% gelyseerd	0	13.6
n vissen met stadium 1 larven	2	5
% vissen met stadium 1 larven	14.3	26.3
% beweeglijk	50	30
% onbeweeglijk	50	70
n vissen met stadium 2 larven	2	3
% vissen met stadium 2 larven	14.3	15.8
% beweeglijk	50	50
% onbeweeglijk	50	50

Wel kon er worden geconcludeerd dat een badbehandeling van 10 ppm L-Levamisole.HCl gedurende 36 uur de nematode niet volledig afdoodt. Zowel de duur van de behandeling, als de L-Levamisole-concentratie moest verder aangepast worden. In verdere proeven spitsten we ons vooral op deze twee aspecten toe.

6.4. Badexperiment : Dosis-effect relatie : korte t.o.v. lange behandelingsduur.

-Materiaal en methoden.

Gebruikt produkt : L-Levamisole.HCl wit poeder gekocht bij de farmaceutische groothandel.

Aan de hand van de gegevens van de twee voorgaande proeven, rees het vermoeden dat voor een langdurige behandeling gekozen moest worden. Om meer inzicht te krijgen in de verschillen in effectiviteit van een korte (24 uur) t.o.v. een lange (6.5 dagen) badbehandeling werd dit experiment opgezet. Als dosis werd 20 mg/l genomen en in de lange behandelingsduur werd elke dag het water en het anthelminticum verversd. Dit alles werd op 10 palingen per conditie uitgetest en in aquaria met 8 liter zeewater.

-Resultaten.

Alle palingen overleefden de proef. Zowel in de 24 uur groep als bij de 6.5 dagen behandeling had L-Levamisole de beweeglijkheid van de adulte nematoden aanzienlijk verminderd. Na 24 uur behandeling was slechts 15 % van de wormen nog beweeglijk (100 % in de controlegroep) en na 6.5 dagen behandeling waren 100 % van de adulte nematoden onbeweeglijk. Over de invloed op de pre-adulte en de larvestadia kunnen we uit deze gegevens geen definitieve conclusies trekken omdat te weinig palingen hiermee besmet waren (zie tabel 4).

6.5. Badbehandeling met verschillende concentraties L-Levamisole.

-Materiaal en methoden.

Gebruikt produkt : L-Levamisole.HCl wit poeder gekocht bij de farmaceutische groothandel.

Deze proef werd opgezet om een inzicht te krijgen in de effecten van oplopende Levamisole concentraties. Op basis van de vorige proef (cfr. supra 6.4.) werd gekozen voor een 6.5 dagen durende behandeling met concentraties van 2.5 tot 20 mg Levamisole per liter. Nu werden meer palingen per conditie genomen nl. ca. 35 i.p.v. 10. Immers, wanneer het besmettingspercentage nogal laag ligt kan dit problemen geven bij het interpreteren van gegevens indien er per conditie niet genoeg besmette vissen voorkomen. De experimenten werden uitgevoerd in 40 liter aquaria met zeewater.

-Resultaten.

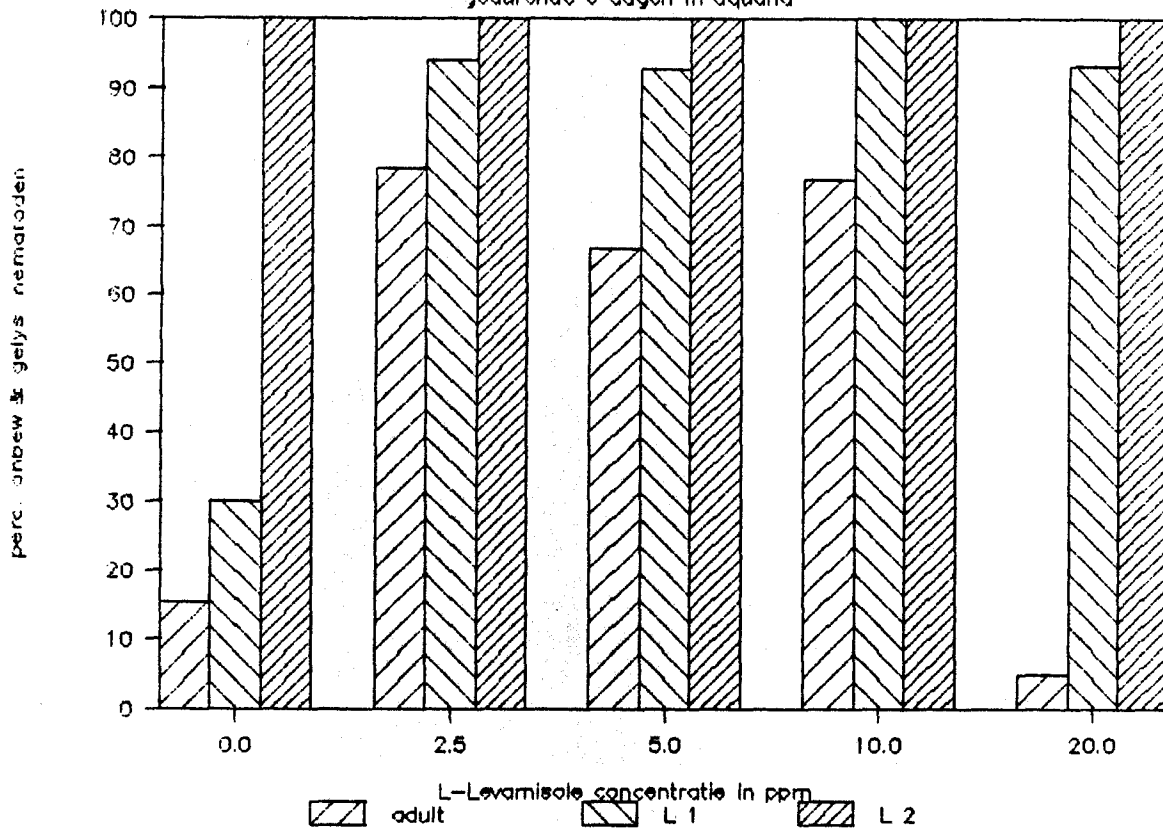
De behandeling met L-Levamisole.HCl bleek bij alle concentraties een duidelijk effect op de beweeglijkheid van de adulte nematoden te hebben nl. in de controlegroep waren 0 % onbeweeglijk, in de behandelde groepen daarentegen tot 70 %.

Tabel 8.
LEVAMISOLEPROEF : BADBEHANDELING & dagen

CONCENTRATIES	CONTROLE				20	
in mg/l	0	2.5	5	10	20	excl. data van 2 alen (zie tekst)
n palingen	26	33	35	31	32	30
n geïnfect.	12	10	11	6	11	9
% geïnfect.	46.2	30.3	31.4	19.4	34.4	30
n vissen met adulte wormen	12	8	11	6	11	9
% vissen met adulte wormen	100	80	100	100	100	100
gem. n wormen per vis (min-max)	2.17 (1-5)	1.75 (1-3)	2.18 (1-5)	2.18 (1-4)	2.64 (1-10)	1.89 (1-7)
tot. n adulten	26	14	24	13	40	20
% beweeglijk (aantal)	84.6 22	21.4 2	33.3 8	23.1 3	5 2	5 1
% onbeweeglijk (aantal)	0 0	64.3 9	41.7 10	69.2 9	25 10	50 10
% gelyseerd (aantal)	15.4 4	14.3 3	25 6	7.7 1	70 28	45 9
som % onbew. & % gelyseerd	15.4	78.6	66.7	76.9	95	95
n vissen met preadulte wormen	0	0	0	0	1	1
% vissen met preadulte wormen					9.1	11.1
gem. n wormen per vis					1	1
tot. n preadulten	0	0	0	0	1	1
% beweeglijk (aantal)					0 0	0 0
% onbeweeglijk (aantal)					100 1	100 1
% gelyseerd (aantal)					0 0	0 0
n vissen met stadium 1 larven	5	5	7	2	3	2
% vissen met stadium 1 larven	41.5	50	63.6	33.3	27.3	22.2
% beweeglijk	70	6	7.1	0	6.7	10
% onbeweeglijk	30	94	92.9	100	93.3	90
n vissen met stadium 2 larven	1	1	1	1	3	2
% vissen met stadium 2 larven	8.3	10	9.1	16.7	27.3	22.2
% beweeglijk	0	0	0	0	0	0
% onbeweeglijk	100	100	100	100	100	100

L-Levamisole badbehandeling

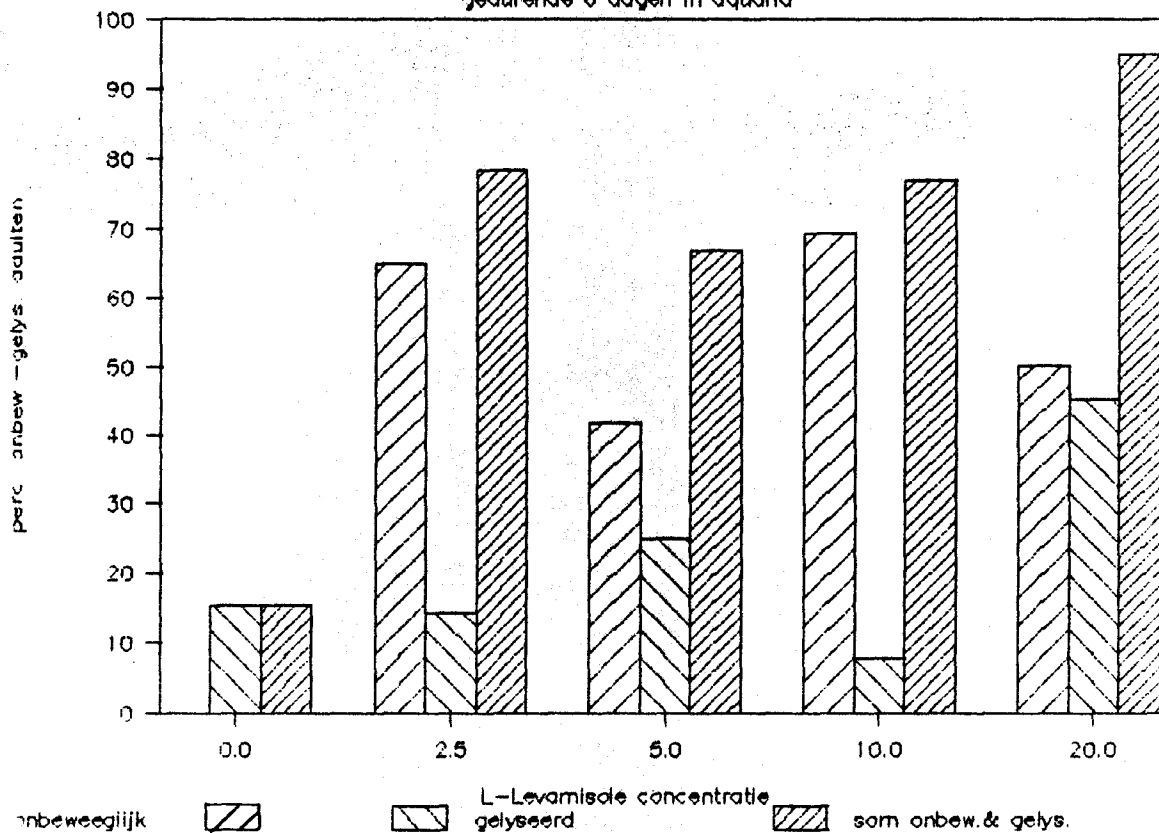
gedurende 6 dagen in aquaria



Grafiek 6.

L-Levamisole badbehandeling

gedurende 6 dagen in aquaria



Indien we de som maken van de percentages onbeweeglijke en gelyseerde adulte nematoden, is het beeld nog duidelijker : in de controle 15 % en in de behandelde groepen van 66.7 % (5 mg/l) tot 95 % (20 mg/l).

Ook blijkt de behandeling bij alle concentraties een invloed op de L1 stadia te hebben. In de controlegroep is 30 % onbeweeglijk t.o.v. 92.9 % tot 100 % in de met Levamisole behandelde groepen. Echter dient wel opgemerkt dat onbeweeglijke L1 stadia niet pro forma als dood mogen beschouwd worden. Een duidelijke invloed op L2 stadia is uit deze proef niet af te leiden (zie tabel 8 en grafieken 5 en 6),

6.6. Grootschalige badbehandeling met L-Levamisole.HCl. (20 ppm, 6 dagen)

-Materiaal en methoden.

Gebruikt produkt : L-Levamisole.HCl, wit poeder gekocht bij farmaceutische groothandel.

Om het effect van L-Levamisole op lange termijn te kunnen nagaan, werd besloten de bassin A18 uit het systeem 6 dagen (om de twee dagen nl. op 7/3, 9/3 en 11/3/88) met 20 ppm L-Levamisole te behandelen. Daarnaast werd ook een onbehandelde controlebak ingesteld. Zodoende kan regelmatig een monster worden genomen, om zo eventueel een antwoord te vinden op de vraag wat er op lange termijn met de nematoden gebeurt nadat ze onbeweeglijk werden t.g.v. de behandeling.

De bakken werden bezet met ongeveer 300 kg IJselmeerpaling (A17 : 334 kg en A18 : 322 kg) met een stuksgewicht van ongeveer 32 gr. Tijdens de behandeling werd niet gevoerd in de proefbak en de controlebak.

Een eerste monster werd genomen van de controle- en de te behandelen bak voor de behandeling plaatsgreep om aldus het besmettingspercentage met *Anguillicola* te bepalen. De controlebak A17 had een besmetting van ongeveer 30 %. De te behandelen palingen waren voor 36 % besmet.

Op 15-4-1988 werden uit elke bak 30 palingen onderworpen aan een *Anguillicola* onderzoek. De resultaten hiervan worden in tabel 9. weergegeven.

-Resultaten.

Het effect van de behandeling is ook hier weer zeer duidelijk zichtbaar : bij de behandelde palingen zijn maar 15 % van de adulte wormen nog beweeglijk in tegenstelling tot 80 % in de controlegroep.

Ook stellen we vast dat de L1- en L2-stadia onbeweeglijk gemaakt werden. Hierbij moet echter rekening gehouden worden met het beperkt aantal waarnemingen.

Om te zien of de L1-stadia werkelijk niet meer beweeglijk waren werden ze een tijd bewaard in zoetwater en enkele dagen na elkaar nagezien onder de microscoop. In normale omstandigheden beginnen de larven dan na een tijd (1 tot 3 dagen) te bewegen en verlaten vervolgens de eimembraan. Indien ze na drie dagen nog geen teken van leven vertoonden werden ze als onbeweeglijk genoteerd.

Verder stelden we ook vast dat 35 dagen na de L-Levamisole behandeling nog geen ontstekingsreacties van de zwemblaas en geen verhoogde lysis van de 'onbeweeglijke' wormen scheen op te treden. Ook dient opgemerkt dat de behandeling op 15 % van de

Tabel 9. : GROOTSCHALIG BADEXPERIMENT
MET L-LEVAMISOLE.HCl 20 ppm, 6dagen

	CONTROLE	LEVAM.HCl
n palingen	30	30
n geïnfect.	11	11
% geïnfect.	36	36
n vissen met adulte wormen	11	9
% geïnf. vissen met adulte wormen	100	82
gem. n wormen per vis (min-max)	1.8 (1-4)	2.2 (1-7)
tot. n adulten	20	20
% beweeglijk (aantal)	80 16	15 3
% onbeweeglijk (aantal)	0 0	70 14
% gelyseerd (aantal)	20 4	15 3
som % onbew. & % gelyseerd	20	85
n vissen met preadulte wormen	0	2
% vissen met preadulte wormen		18
gem. n wormen per vis		2
tot. n preadulten	0	4
% beweeglijk (aantal)		75 3
% onbeweeglijk (aantal)		25 1
% gelyseerd (aantal)		0 0
n vissen met stadium 1 larven	2	3
% vissen met stadium 1 larven	18.1	27
% beweeglijk	100	0
% onbeweeglijk	0	100
n vissen met stadium 2 larven	1	2
% vissen met stadium 2 larven	9	18
% beweeglijk	100	0
% onbeweeglijk	0	100

adulte wormen geen zichtbaar effect had. Een tweede behandeling zou hiervoor eventueel een oplossing zijn.

7. FLUBENDAZOLE

Fabrikant : Janssen Pharmaceutica, Beerse België

7.1. Grootschalige vergelijkende proef met Flubendazole en Levamisole toegediend via het voer.

-Materiaal en methoden

Gebruikt produkt : Flubenol 5 % en L-Ripercol 10 % injectievloeistof.

Daar Flubenol een zeer effectief middel is in de bestrijding van longnematoden bij zoogdieren werd gekozen voor een voederproef waarbij de effecten van Flubenol en Ripercol worden vergeleken met een blanco controle.

De bassins werden bezet met ca. 720 kg wilde pootaal. Gedurende 9 weken werd de voedergift, sterfte en groei bijgehouden. Van 16-6-1987 tot 31-7-1987 werd een dosis van 11 mg L-Levamisole of 120 mg Flubendazole per kg voer toegediend. Daar deze doseringen weinig of geen effect hadden, werden de toegediende doseringen tijdens een tweede proef periode verhoogd. Van 31-7-1987 tot 9-9-1987 werden de vissen gevoerd met 53 mg L-Levamisole of 600 mg Flubendazole per kg voer.

-Resultaten.

Het bassin dat met Ripercol behandeld was had een duidelijk geringere sterfte nl. 4.2 % in 9 weken t.o.v. de controlebassin met 5.2 % en de Flubenolgroep met 5.6 % sterfte.

De groei van de Flubenolgroep was het hoogst (0.72 % LW/dag) gevolgd door Ripercol (0.66 % LW/dag) en de controle (0.54 % LW/dag). (LW = lichaamsgewicht)

De voederconversie vertoonde hetzelfde beeld nl. Flubenol 2.23, Ripercol 2.74 en de controle 3.65.

Wat de werking op *Anguillicola* betreft : de effecten op de adulte nematoden zijn gering te noemen. Maar 16 tot 28 % van de wormen worden onbeweeglijk of gelyseerd. Ook werd gekeken naar het effect van beide middelen op het gewicht van de wormen (uitgedrukt als percentage van het lichaamsgewicht van de gastheer). Hierbij valt op dat dit toeneemt bij de controle naarmate de tijd verstrijkt en dat het afneemt bij Ripercol en in sterke mate bij Flubenol.

De effecten op pre-adulten waren slechts matig. Tussen de 6 % en 42 % van de pre-adulten werden onbeweeglijk of gelyseerd aangetroffen in de behandelde groepen.

De beweeglijkheid van de L1- en L2-stadia bleek ook slechts gering afgenomen (maximaal 45 % onbeweeglijk).

De toediening via het voer van Ripercol en Flubenol blijkt niet het gewenste effect op te leveren.

Uit de gegevens kunnen desalniettemin volgende conclusies worden getrokken : Flubenol lijkt het grootste effect te hebben op de beweeglijkheid van de L1 stadia en de L2 stadia, terwijl Ripercol vooral werkt op de immobilisatie van de adulte nematoden (zie tabel 10 en grafieken 7 t/m 11).

Tabel 10:

RESULTATEN VOEDERPROEF MET RIPERCOL EN FLUBENOL
1987

UITGEVOERD DOOR E.W. LIENES

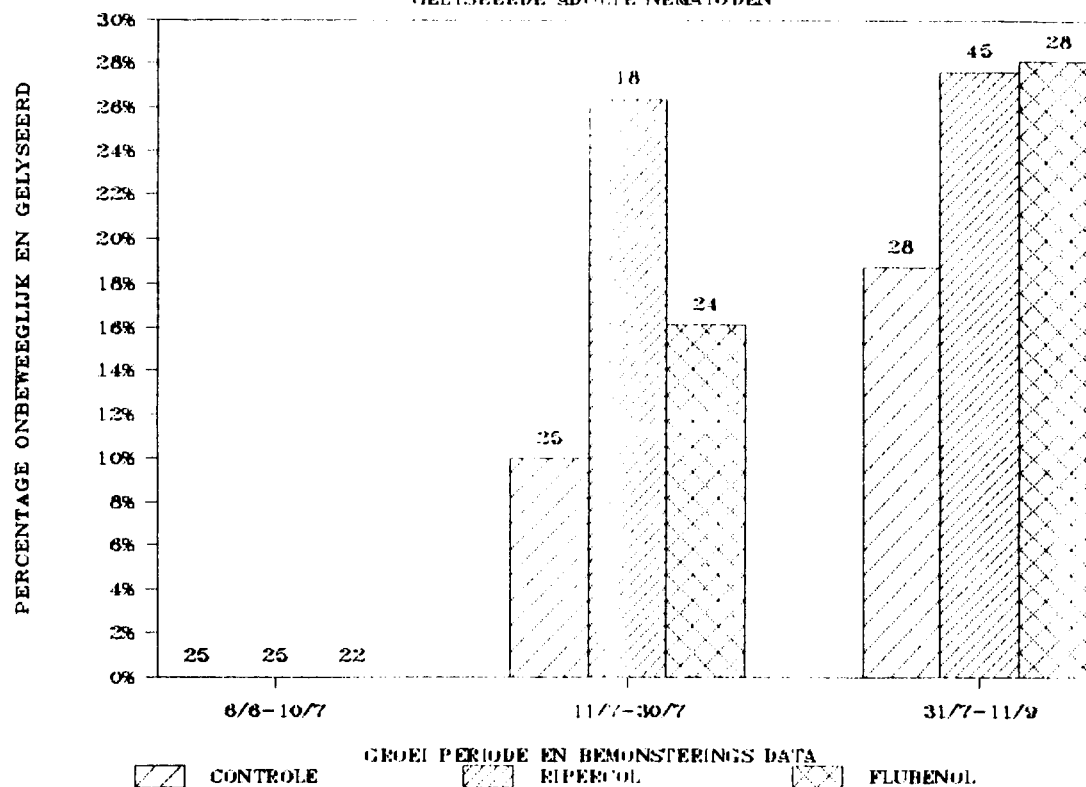
TEXVIS BV

PERIODE	16/6-10/7	11/7-30/7	31/7-11/9	16/6-10/7	11/7-30/7	31/7-11/9	16/6-10/7	11/7-30/7	31/7-11/9
PROEFGROEP	CONTROLE	CONTROLE	CONTROLE	RIPERCOL	RIPERCOL	RIPERCOL	FLUBENOL	FLUBENOL	FLUBENOL
GEMIDD. GEWICHT (GR)	21.0	27.4	43.2	40.7	37.6	46.2	19.9	30.8	43.0
GEMIDD. LENGTE (CM)	26.0	26.9	29.2	29.2	28.9	30.8	25.9	27.6	29.5
AANTAL PALINGEN	32	27	38	31	28	68	30	29	37
AANTAL GEINFECTEERD	25	25	28	25	18	45	22	24	28
PERCENTAGE GEINFECTEERD	78%	93%	74%	81%	64%	66%	73%	83%	76%
AANTAL ADULTEN	67	103	118	134	92	245	95	82	101
% BEWEEGLIJK	100%	90%	81%	100%	74%	72%	100%	84%	72%
AANTAL BEWEEGLIJK	67	93	96	134	68	176	95	69	73
% ONBEWEEGLIJK	0%	10%	15%	0%	18%	21%	0%	11%	17%
AANTAL ONBEWEEGLIJK	0	10	17	0	17	51	0	9	17
% GELYSEERD	0%	0%	4%	0%	8%	7%	0%	5%	11%
AANTAL GELYSEERD	0	0	5	0	7	18	0	4	11
SOM % ONBEWEEGLIJK EN GELYSEERD	0%	10%	19%	0%	26%	28%	0%	16%	28%
GEMIDD. GEWICHT ADULTE WORM (gr)	0.075	0.063	0.113	0.057	0.058	0.057	0.064	0.104	0.098
GEWICHT ADULTEN ALS % L.W.	1.24	1.294	1.390	1.005	0.971	0.878	1.572	1.342	0.861
AANTAL PREADULTEN	13	15	5	72	61	98	22	12	5
% BEWEEGLIJK	100%	100%	100%	100%	76%	94%	100%	58%	80%
AANTAL BEWEEGLIJK	13	15	5	72	46	92	22	7	4
% ONBEWEEGLIJK	0%	0%	0%	0%	19%	2%	0%	42%	20%
AANTAL ONBEWEEGLIJK	0	0	0	0	12	2	0	5	1
% GELYSEERD	0%	0%	0%	0%	5%	4%	0%	0%	0%
AANTAL GELYSEERD	0	0	0	0	3	4	0	0	0
SOM % ONBEWEEGLIJK EN GELYSEERD	0%	0%	0%	0%	24%	6%	0%	42%	20%
AANTAL PALINGEN MET L1 LARVEN	13	16	17	15	14	22	17	13	16
PERCENTAGE VAN DE PALINGEN	41%	59%	45%	48%	50%	32%	57%	45%	43%
PERCENTAGE BEWEEGLIJKE L1-STADIA	100%	94%	94%	100%	82%	64%	100%	54%	59%
AANTAL PALINGEN MET L2 LARVEN	13	14	15	16	13	16	13	14	13
PERCENTAGE VAN DE PALINGEN	41%	52%	39%	52%	46%	24%	43%	48%	35%
PERCENTAGE BEWEEGLIJKE L2 LARVEN	100%	93%	97%	100%	89%	78%	100%	79%	61%
PERCENTAGE VRETENDE VISSSEN	69%	74%	68%	62%	82%	1)	1)	97%	84%

1) Geen gegevens verzameld.

Grafiek 7.

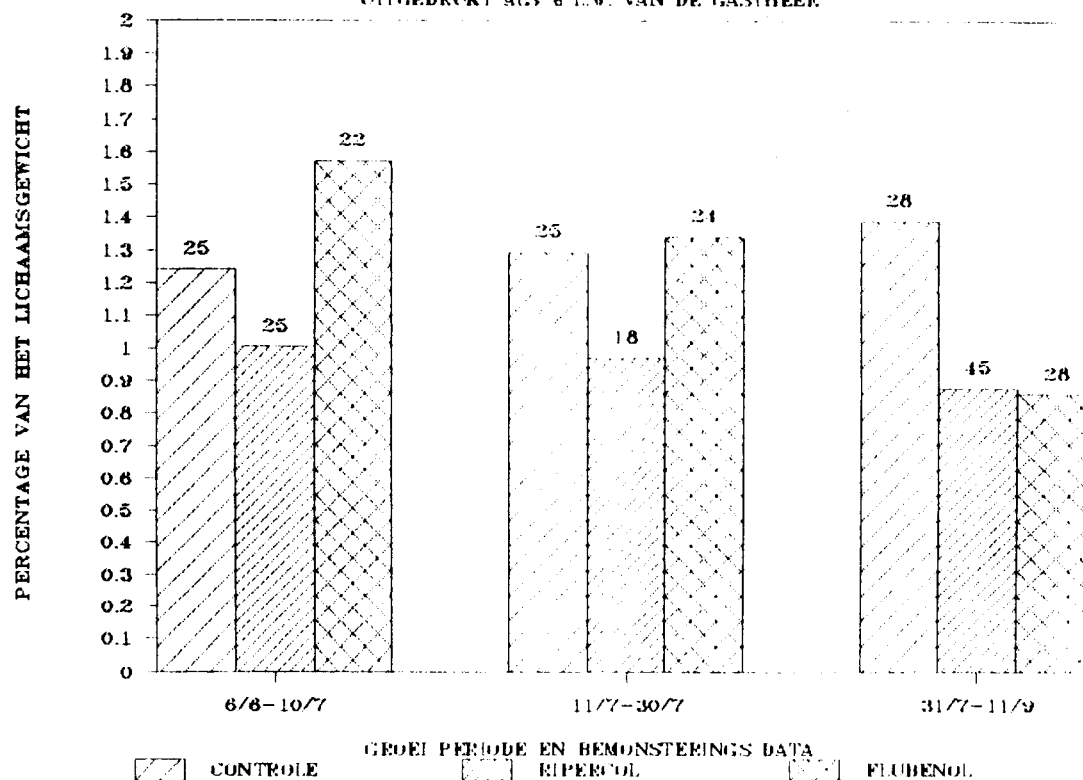
TOENAME PERCENTAGE ONBEWEEGLIJKE EN GELYSEERDE ADULTE NEMATODEN



Grafiek 8.

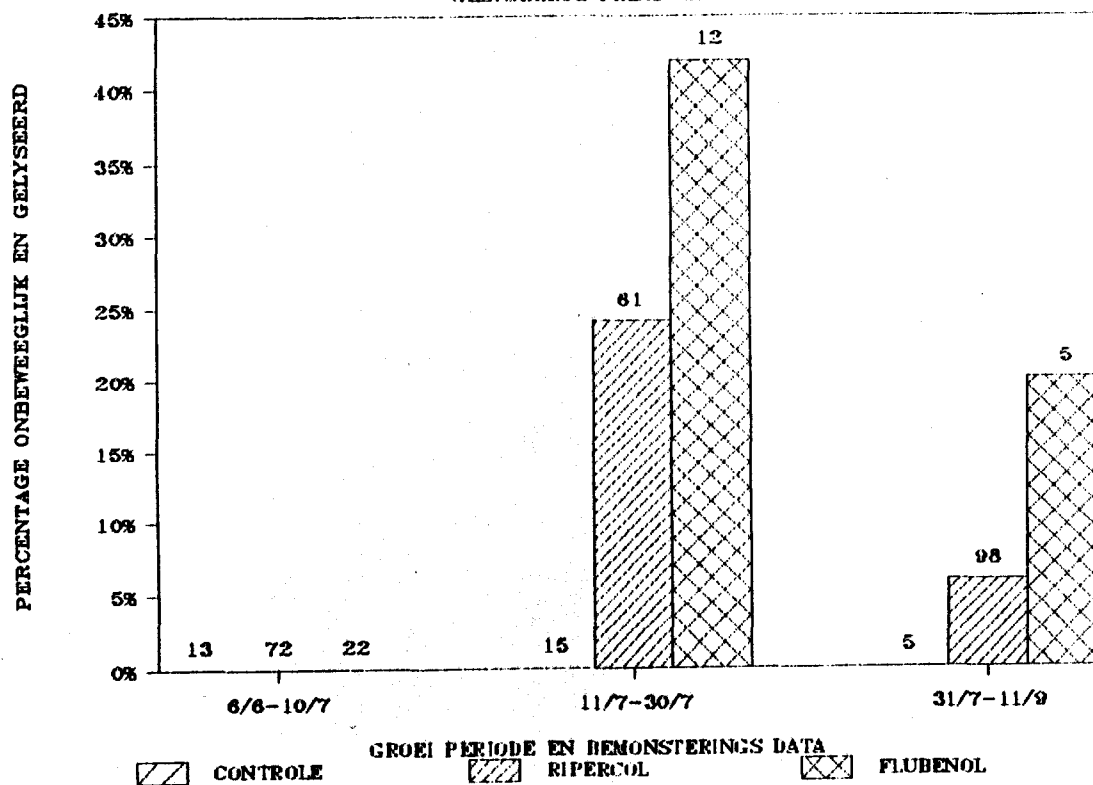
VERLOOP GEWICHT ADULTE NEMATODEN

UITGEDRUKT ALS % L.W. VAN DE GASTHEER



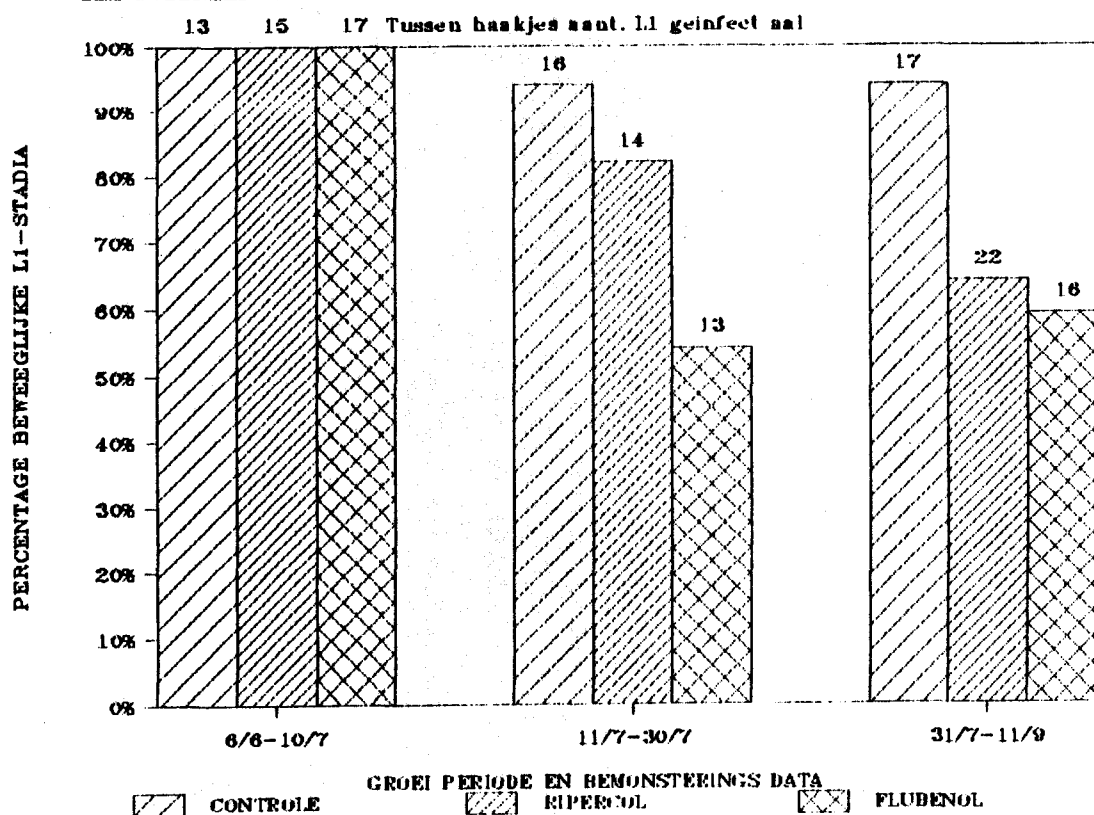
TOENAME PERCENTAGE ONBEWEEGLIJKE EN

GELYSEERDE PREADULTEN



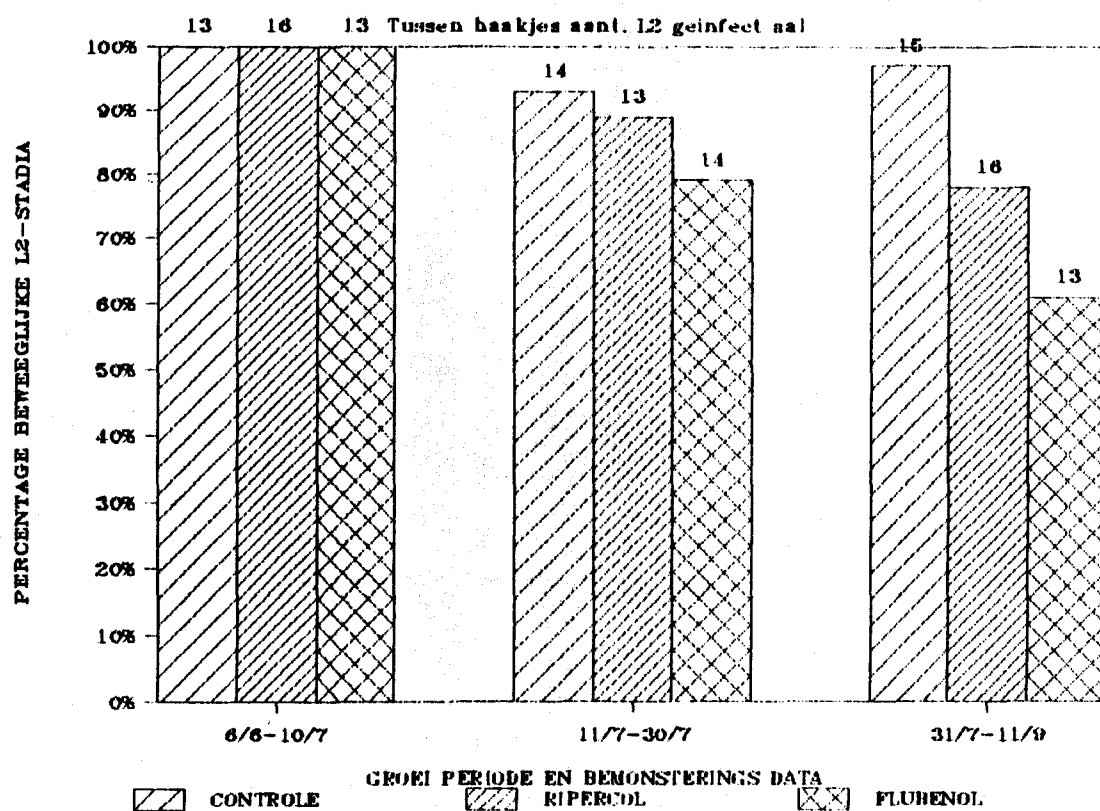
Grafiek 10.

AFNAME PERCENTAGE BEWEEGLIJKE L1-LARVEN



Grafiek 11.

AFNAME PERCENTAGE BEWEEGLIJKE L2-LARVEN



III. SAMENVATTING EN CONCLUSIES

Het *Anguillicola* onderzoek bij Texvis B.V. heeft als doelstelling zo snel mogelijk een in de praktijk toepasbare methode te ontwikkelen ter bestrijding van de zwemblaasnematode *Anguillicola crassa*.

Vooreerst wordt in het kort de gebruikte terminologie verduidelijkt en een samenvatting gegeven van de levenscyclus van *Anguillicola*. Een beschrijving van een mogelijk klinische verloop van de infectie via de verschillende zwemblaas-infectiestadia en van het gebruikte materiaal en methoden sluit dit deel af.

Een uitgebreid spectrum antiparasitica werd uitgetest op wilde besmette pootaal uit het IJsselmeer.

De meeste proeven werden in zout water uitgevoerd en betreffen badbehandelingen. Daarnaast werden bepaalde middelen ook door middel van injecties, dwangvoederen of verwerkt in het voer toegediend.

De gescreende produkten zijn : Ivermectine, Safewormer, Closantel, Masoten, Oxfendazole, Levamisole en Flubendazole.

Al deze produkten werden zowel op hun toxiciteit voor palingen als op hun antiparasitaire werking op *Anguillicola* getest.

Ivermectine en Closantel (o.d.v.v. Flukiver) in badvorm toegediend bleken toxisch te zijn voor de palingen. Reeds bij 0.00018 ppm Ivermectine had men 50 % sterfte na 30 uur. Voor Closantel (Flukiver) ligt de LC50 waarde rond 2.5 ppm (gescreend in zoet water).

Closantel Drench 5 % bleek echter niet of weinig toxisch te zijn wanneer een dosis van 10 mg/kg lichaamsgewicht per os werd toegediend.

Van Masoten is bekend dat concentraties van boven 1 ppm niet goed door palingen wordt verdragen. De palingen werden blootgesteld aan een concentratie van 0,5 mg/l.

De andere uitgeteste produkten : Safewormer, Oxfendazole, L-Levamisole en Flubendazole bleken niet toxisch te zijn voor de palingen in de geteste doseringen.

De anthelmintische werking op *Anguillicola* was voor de meeste produkten gering.

Met Safewormer, Masoten en Flukiver (=injecteerbare vorm van Closantel) kon geen enkel effect op *Anguillicola* worden aangetoond.

Het effect van Closantel Drench 5 % (per os toegediend), Oxfendazole (badbehandeling) en Flubendazole (in het voer verwerkt) op *Anguillicola* was niet erg duidelijk.

In de dwangvoederproef met Closantel lag het percentage onbeweeglijke (11.8 %) en gelyseerde (23.5 %) adulte nematoden iets hoger dan in de controlegroep (onbeweeglijk 0 %, gelyseerd 7.7%).

Uit de eerste proef met Oxfendazole leek het aantal beweeglijke adulte- en L2-stadia van *Anguillicola* wat afgenomen maar deze resultaten werden niet meer bevestigd in een tweede proef.

Flubendazole in het voer verwerkt, bleek een geringe invloed te hebben op de beweeglijkheid van de larvestadia.

Voor geen enkel van deze produkten kan men van een effectieve behandeling spreken.

L-Levamisole daarentegen gaf duidelijk veel positievere resultaten.

Vooreerst werd vastgesteld dat L-Levamisole niet toxisch was voor palingen. Hoge concentraties (tot 59.0 ppm uitgetest) werden goed verdragen, evenals L-Ripercol-injecties van 5 mg levamisole/kg lichaamsgewicht.

Verder zijn langdurige badbehandelingen met Levamisole effectiever dan kortstondige badbehandelingen of dan langdurige toediening via het voer.

Bij alle badbehandelingen (de voederproef uitgezonderd) bleek een duidelijk effect van Levamisole op de adulte nematoden nl. deze werden onbeweeglijk.

Het effect op pre-adulte- en larvestadia is minder evident maar ook hier houdt de tendens naar meer onbeweeglijke pre-adulten en larven aan.

Bij een badbehandeling van 6 dagen met een concentratie van 20 mg Levamisole/liter, uitgetest in 40 liter aquaria, waren 95 tot 100 % van de adulte wormen niet meer beweeglijk (d.w.z. onbeweeglijk of gelyseerd).

Dezelfde dosering werd ook op grote schaal in een proefbak in het systeem van Texvis uitgetest. Hierbij dient wel opgemerkt dat in dit experiment de Levamisole maar om de 2 dagen (dus 3 maal) werd verversd. In de behandelde groep waren slechts 15 % van de adulte wormen nog beweeglijk, in tegenstelling tot de 80 % bij de controlegroep. Op basis van deze gegevens zou het mogelijk moeten zijn de *Anguillicola*-infectie middels twee opeenvolgende badbehandelingen met Levamisole (b.v. met 14 dagen tussentijd) vrijwel alle *Anguillicola*-nematoden onbeweeglijk te maken. Door tijdgebrek kon dit experiment niet meer worden uitgevoerd. Wat het effect op langere termijn betreft: 35 dagen na behandeling werd geen toenemend aantal ontstoken zwemblazen of geen duidelijk verhoogde lysis van de onbeweeglijke wormen waargenomen.

L-Levamisole blijkt uit de experimenten tot nu toe als het meest effectieve middel tegen *Anguillicola* naar voor te komen om volgende redenen :

- Levamisole kan in badvorm worden toegediend,
- Levamisole wordt door de palingen goed verdragen ,ook in hoge concentraties,
- Een intensieve badbehandeling van 6 dagen met 20 ppm geeft tussen de 85 % en de 100 % afdoding van de adulte wormen.

IV. KORTE SAMENVATTING

De antiparasitaire werking van Ivermectine, Safewormer, Closantel, Masoten, Oxfendazole, Levamisole en Flubendazole op *Anguillicola crassa*, een zwemblaasnematode van *Anguilla anguilla*, werd uitgetest.

Toxiciteitstesten wezen erop dat een badbehandeling met lage concentraties Ivermectine (0.00018 ppm) en Closantel (Flukiver, 2.5 ppm) fataal waren voor palingen.

Safewormer, Masoten, Closantel (Drench 5 %), Oxfendazole en Flubendazole toonden geen of weinig anthelmintische werking.

L-Levamisole daarentegen bleek een duidelijk effect te hebben op de beweeglijkheid van de *Anguillicola crassa* adulten.

Een badbehandeling van 6 dagen met 20 ppm L-Levamisole bleek onder experimentele condities 95 tot 100 % van de adulte wormen te immobiliseren.

Het effect van L-Levamisole op pre-adulte en larvestadia was minder evident maar ook hier was er een tendens naar meer onbeweeglijkheid van deze stadia waarneembaar.

V. LITERATUURLIJST

- Canestri-Trotti, G. (1987) Occurrence of the nematode *Anguillicola crassa*, Kuwahara, Niimi & Itagaki, 1974 in eels from the Po delta, Italy. Bull. Eur. Ass. Fish. Path. 7(5) : 109 - 111
- De Charleroy, D., Thomas, K. and Belpaire, C. (1987) Problems concerning the species determination, biology and diagnostical methods of *Anguillicola*, a swimbladder nematode in the European eel (*Anguilla anguilla*). EIFAC Working Party on Eel, April 13th, Vol.16th, Bristol
- Geets, G., Liewes, E.W. (1988) Verslag van de voortgang in het *Anguillicola* onderzoek bij Texvis B.V., I en II, Den Burg, Texel, RIVO vergadering maart 1988, (niet gepubliceerd)
- Kuwahara, A., Niimi, A., Itagaki, H. (1974) Studies on a nematode parasitic in the air bladder of the eel. I. Description of *Anguillicola crassa* n. sp. (Philometridea, Anguillicolidae) Jap. J. Parasit. 23 : 275 - 279
- Liewes, E.W. (1986) Problemen met zwemblaasnemathode in de Nederlandse aal. Texvis B.V., Den Burg, Texel, Juni 1986 pp4 (niet gepubliceerd)
- Liewes, E.W., Schaminee-Main, S. (1987) Onderzoek naar de effecten van de parasiet *Anguillicola crassa* op de ontwikkeling van de paling (*Anguilla anguilla*) in de zout water palingmesterij Texvis B.V., Den Burg, Texel (niet gepubliceerd)
- Liewes, E.W., Schaminee-Main, S. (1987) Onderzoek aalparasiet vordert. Aquacultuur, 2e jaargang, 4 : 5 - 17
- Saroglia, M.G. (1985) Eel production in Italy : Problems and perspectives. EIFAC Eel Working Group, Perpignan, Sept. 1985 pp 5
- Schmall, G., Taraschewski, H. (1987) Treatment of fishes, 2. Effects of Praziquantel, Niclosamide, Levamisole-HCl and Metrifonate on Monogenea (*Gyrodactylus aculeati*, *Diplozoon paradoxum*). Parasitology Research 73 : 341 - 351
- Taraschewski, H., Renner, C., Melhorn, H. (1988) Treatment of fishes 3. Effects of Levamisole-HCl, Metrifonate, Febendazole, Mebendazole and Ivermectin on *Anguillicola crassus* (Nematoda) pathogenic in the air bladder of eels. Parasitology Research 74 : 281 - 289.
- Thomas, K. (1987) Aspecten van de levenscyclus, soortproblematiek en verspreiding van *Anguillicola* sp. in Vlaanderen. K.U.Leuven eindverhandeling dierkunde, pp 139 (niet gepubliceerd).
- Van Banning, P., Heerman, W., Van Willigen, J. (1985) *Anguillicola crassa*, een nieuwe aalparasiet in de Nederlandse wateren. Visserij, 38 (6-7) : 237 - 240

Van Willingen, J., Dekker, W., Van Banning, P. (1986) De parasiet *Anguillicola crassa* in de Nederlandse aal. RIVO intern rapport BV86-04 : pp 15

Yamaguti, S. (1935) Studies on the helminth fauna of Japan. Pt. 9 Nematodes of fishes I. Jap. J. Zool. 6 (2) : 337 - 386

**ONDERZOEK NAAR MOGELIJKE ORALE BEHANDELINGS-
METHODEN VAN DE ZWEMBLAASNEMATODE
(ANGUILLICOLA CRASSA) BIJ KWEEKAAL.**



TROUW INTERNATIONAL • BV •

Research and Development

Jan Willem Resink
oktober 1989

Inhoud

Inleiding	3
Materiaal en methoden	7
Resultaten	8
Discussie	12
Referenties	14
Appendix 1-4	15

Inleiding

De zwemblaasnematode (*Anquillicola crassa*) blijkt zeer frequent voor te komen bij kweekaal.

Uit een onderzoek bij TEXVIS blijkt 40-95% van de gekweekte aal met *Anquillicola crassa* besmet te zijn. De nematode huist in de zwemblaas en voedt zich met bloed (1). Er kunnen verschillende stadia van de infectie onderscheiden worden (2). Een overzicht van de verschillende stadia is hieronder gegeven:

Tabel 1 Infectie stadia van de zwemblaas

Stadium 1.	Zwemblaas normaal, zonder wormen
Stadium 2.	Zwemblaas normaal, enkele nematoden zijn aanwezig.
Stadium 3.	Zwemblaas is iets gezwollen en bevat rood-bruine vloeistof, ook kunnen er ontstekingen zijn. Een enkele grote of een zeer groot aantal kleine nematoden is aanwezig.
Stadium 4.	Zwemblaas sterk vergroot en ontstoken, geheel gevuld met rood-bruine vloeistof. Zowel grote nematoden als nematoden larven zijn in de zwemblaas aanwezig.
Stadium 5.	Ruptuur van de zwemblaas. Veelal ontstekingen in de buikholte en verkleving van de ingewanden. Zwemblaas infectie is van buitenaf zichtbaar.
Stadium 6.	Verbindweefseling van de zwemblaas, vaak zijn er resten van vloeistof en van afgestorven wormen zichtbaar.

Ter bestrijding van nematoden bij landbouwhuisdieren zijn verschillende anthelminthica ontwikkeld. Met behulp van een orale behandeling met deze anthelminthica is het wellicht mogelijk bij kweekaal de eerste infectie stadia aan te pakken.

Voor een succesvolle behandeling met anthelminthica dienen deze goed geresorbeerd te worden. In tabel 1 is een overzicht gegeven van mogelijke commercieel verkrijgbare, wormmiddelen, opgesplitst in chemische groepen. In deze tabel staan zowel middelen specifiek gericht tegen nematoden als middelen die vooral tegen trematoden en cestoden gebruikt worden. Een slechte opname is mogelijk de reden dat in voorgaande empirische studies gebleken is dat gebruikelijke nematoden middelen bij normale doseringen niet effectief bleken tegen de zwemblaasworm.

De wormmiddelen kunnen op basis van toedieningsduur verdeeld worden in twee groepen, resp. éénmalige toediening of toediening gedurende 5 à 10 dagen. In het algemeen geldt dat (bij) een langduriger toediening en met een lagere dosis effectiever werkt. Uit vooronderzoek bij TEXVIS is gebleken dat de effecten van medicatie bij kweekaal pas na 10 à 15 dagen resultaat geven (1).

In het hier beschreven experiment vindt een screening van de verschillende middelen plaats. Een aantal middelen is al getest bij TEXVIS. Echter de omstandigheden, zout water, zijn hier wezenlijk verschillende, hetgeen van invloed kan zijn op de resultaten. Bij de keuze van de uit te testen anthelminthica golden de volgende overwegingen en prioriteiten:

- Uitsluitend middelen die (tevens) in de diergeneeskunde regelmatig worden of werden toegepast; i.c. bij (landbouw) huisdieren.
- In hoofdzaak middelen tegen nematoden, omdat de zwemblaasworm ook tot deze groep behoort. L-Tramisol^R werd mede gekozen, omdat met een soortgelijk middel bij Texvis inmiddels goede ervaringen waren opgedaan. Verder één trematoden-middel (Fasinex^R), en één cestoden-middel (Droncit^R).
- Middelen, resp. leveringsvormen van middelen, die bestemd zijn voor oraal gebruik.
- Middelen waarvan bekend is, dat ze bij (landbouw)huisdieren tenminste voor een deel geresorbeerd worden vanuit het maag-darm kanaal, en dus enige bloedspiegel geven. Immers: voor de bestrijding van de wormstadia in de zwemblaas is een bloedspiegel nodig.
- Een accent op de chemische groep der benzimidazolen, vanwege het grote belang hiervan in de diergeneeskunde. Binnen deze groep: diverse fabrikaten.
- Voor het overige: middelen uit meerdere chemische groepen.
- Voorlopige uitsluiting van organo-fosforverbindingen, vanwege de te verwachten geringe veiligheidsmarge.

De gekozen middelen zijn opgevoerd in tabel 2.

De keuze van de doseringen van de verschillende anthelminthica was gebaseerd op de doseringen voor (landbouw) huisdieren, in mg zuivere stof/kg lichaamsgewicht. Omrekenen naar de concentratie in voer gaat via de volgende formule.

$$\text{Concentratie}^* = \text{dosering}^{**} \times \frac{100}{\text{voedergift in \%}} \times \frac{100}{\text{gehalte geneesm. in \%}}$$

* = In ppm = mg/kg voer = g/ton voer

** = In mg zuivere stof/kg lichaamsgewicht per dag.

Tabel 2 De anthelminthica die in het experiment uitgetest werden.

Merknaam	Algemene naam	Fabrikaat	Chemische groep	Gekozen leveringsvorm
Banminth ^R	Pyrantel tartraat	Pfizer	Tetrahydro-pyrimidine	Poeder 12,5%
Droncit ^R	Praziquantel	Bayer	Isochinoline	Tabletten 50 mg*
Fasinex ^R	Triclabendazol	Ciba-Geigy	Benzimidazole	Suspensie 5%
Ivomec ^R	Ivermectine	MSD	Avermectine	Suspensie 0,08%
Mebenvet ^R	Mebendazol	Janssen	Benzimidazole	Poeder 5%
Panacur ^R	Fenbendazol	Hoechst	Benzimidazole	Poeder 4%
Piperazine citraat	Piperazine citraat		Pyrazine	Poeder zuiver
Rintal ^R	Febantel	Bayer	Benzimidazole	Suspensie 2,5%
Synanthic ^R	Oxfendazol	Syntex	Benzimidazole	Suspensie 2,265%
L-Tramisol ^R	Levamisol base	Janssen	Imidazolthiazole	Granulaat 10%

* Tabletten Droncit^R wogen 675 mg. Bevatten 50 mg zuivere stof: gehalte dus 7.4%

De meeste wormmiddelen uit voorgaande tabel zijn bestemd voor een éénmalige toediening. Voor de paling leek ons dat minder wenselijk, en wel om 2 redenen:

- Bij een éénmalige toediening zal de individuele voederopname op de betreffende dag een forse invloed hebben op de dosering.
- Naar onze taxatie is het twijfelachtig, of de moeilijk "bereikbare" zwemblaasworm met één wormmiddel-toediening te elimineren is, waardoor herinfectie mogelijk is.

Daarom werd gekozen voor continue medicatie gedurende de looptijd van de proef.

Van enkele wormmiddelen geeft de fabrikant ook concentraties in voer voor een meerdaagse kuur. Voorbeelden: Banminth^R 100 ppm (zuivere stof), 10 dagen; Mebenvet^R 60-120 ppm (zuivere stof), 7-14 dagen. Uitgaande van

een voedergift van 4-5% bij landbouwhuisdieren betekent dit, dat de dosering bij een meerdaagse kuur ca. 40% bedraagt van de éénmalige dosering. Dit percentage is verder als richtlijn aangehouden voor de doseringen bij paling. Van L-Tramisol^R werden meerdere doseringen gebruikt, op voorstel van Texvis. Eén en ander is uitgewerkt in tabel 3.

Tabel 3 Doseringen van de gekozen anthelmintica.

in	Dosering* (landbouw- huisdieren)	Dosering** paling	Concentratie leveringsvorm in palingdeeg***	Concentratie zuivere stof palingdeeg ***
Banminth ^R	12,5 mg/kg	5 mg/kg	4 g/kg	500 ppm
Droncit ^R	5 mg/kg	2 mg/kg	2,7 g/kg	200 ppm
Fasinex ^R	10 mg/kg	4 mg/kg	8 ml/kg	400 ppm
Ivomec ^R	0,2 mg/kg	0,08 mg/kg	10 ml/kg	8 ppm
Mebenvet ^R	10-15 mg/kg	5 mg/kg	10 g/kg	500 ppm
Panacur ^R	5/7,5 mg/kg	2 mg/kg	5 g/kg	200 ppm
Piperazine citraat	150 mg/kg	60 mg/kg	6 g/kg	6.000 ppm
Rintal ^R	5-7,5 mg/kg	2 mg/kg	8 ml/kg	200 ppm
Synanthic ^R	5-10 mg/kg	2 mg/kg	8,83 ml/kg	200 ppm
L-Tramisol ^R	10 mg/kg	2,5 mg/kg	2,5 g/kg	250 ppm
		5 mg/kg	5 g/kg	500 ppm
		15 mg/kg	15 g/kg	1.500 ppm
		40 mg/kg	40 g/kg	4.000 ppm

* In mg zuivere stof/kg lichaamsgewicht, bij éénmalige toediening

** In mg zuivere stof/kg lichaamsgewicht, bij semi-permanente toediening.

*** Bij 1% voedergift.

Materiaal en methoden

Besmette paling

Het uitgangsmateriaal is reeds gedurende 3-4 maanden bij TEXVIS gekweekte IJsselmeer paling. Deze paling is voor 80% besmet met *Anguillicola* (1). De paling wordt uitgezet in aquaria van 130 liter, met een dichtheid van 80 palingen per aquaria. De paling wordt gevoerd met Trouvit A100 eventueel gemixed met vis om zeker te zijn van een goede voer opname. Voerniveau 1 à 1.5% per dag.

Medicatie

De keuze van de aard en dosering van de verschillende wormmiddelen is gebaseerd op chemische groep, werkingsspectra en resorbeerbaarheid. Op basis van deze criteria zijn 5 benzimidazolen en 5 vertegenwoordigers uit overige groepen geselecteerd (tabel 2 en 3).

Alleen in geval van Ripercol worden er verschillende doseringen toegepast, één gebaseerd op de berekening die ook voor de overige middelen wordt toegepast en hiernaast resp. 5, 15 en 40 ml/kg meel bij een voedergift van 1.5% per dag.

Hiernaast wordt er een controle in drie-voud meegenomen.

Wormmiddelen in poedervorm homogeen gemengd met palingmeel; daarna werd water toegevoegd voor het maken van deegvoeder. Tabletten en granulaten werden verpoederd, voordat ze werden gemengd met het meel. Suspensies werden homogeen gemengd met water; de verdunde suspensies werden daarna toegevoegd aan het meel. De voedergift was 1% medicinaal voeder per dag, aangevuld met niet-gemedicineerd voeder.

Experimentele opzet

In totaal wordt het onderzoek in 15 aquaria uitgevoerd gedurende een periode van 9 weken.

Na een gewenningsperiode werd de medicatie gestart. Op dag 0, 21, 42 en 63 worden er per behandelingsgroep op een aantal palingen sectie verricht.

Hierbij werd bepaald:

1. Vis gewicht.
2. Zwemblaas gewicht.
3. Besmettingsstadium van de zwemblaas (zie Inleiding).
4. De macroscopische aanwezigheid van wormen in de zwemblaas.
5. De microscopische aanwezigheid van wormen (alle verschillende stadia).
6. De temperatuur gevoeligheid van de aanwezige wormen.

De laatstgenoemde parameter wordt bepaald door de eventueel aanwezige wormen op een object glas te verwarmen. Het al of dan niet bewegen wordt gescoord. Dit werd uitgevoerd om eventueel verlamde en dode wormen van "gezonde" wormen te onderscheiden.

Resultaten

Een overzicht van de resultaten is gegeven in Appendix 1. Omdat het experiment uitgevoerd is in een recirculatie systeem is het niet uit te sluiten dat in de loop der tijd de -in het voer- verstrekte anthelminthica via het water in alle aquaria terecht gekomen is. Bovendien is het mogelijk dat vissen die genezen waren door het gebruik van een anthelminticum wederom besmet raakten via het water uit andere aquaria. Daarom is aangenomen dat de resultaten van de eerste drie weken van het experiment het meest relevant zijn. Deze resultaten zijn hieronder behandeld.

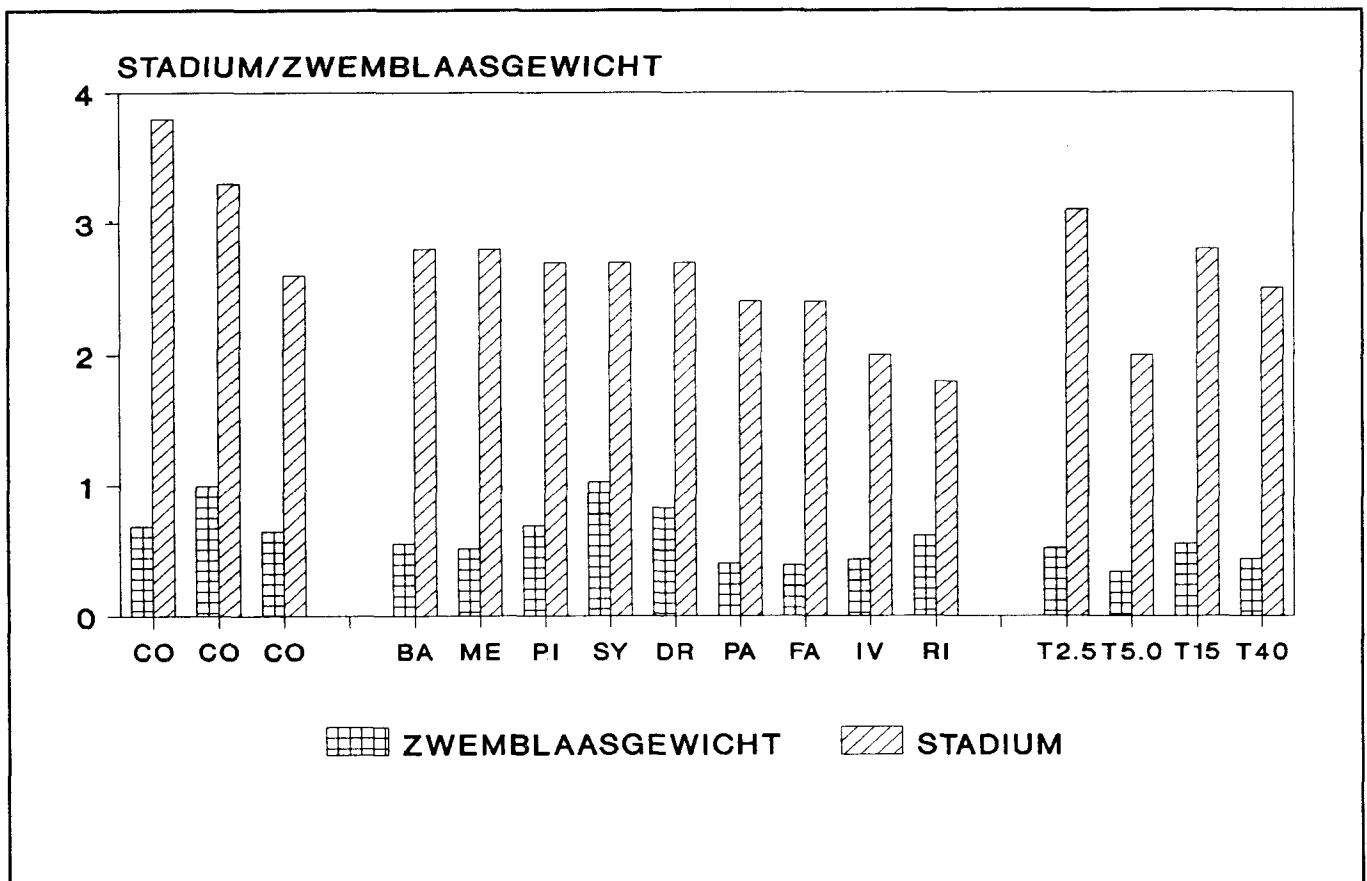
In Figuur 1 is het gewicht en het infectiestadium van de zwemblazen van de vissen in de verschillende aquaria na 3 weken behandeling weergegeven. De volgende afkortingen zijn gebruikt voor de anthelminthica in Figuur 1 en alle volgende figuren:

Tabel 4 De afkortingen van de gebruikte anthelminthica.

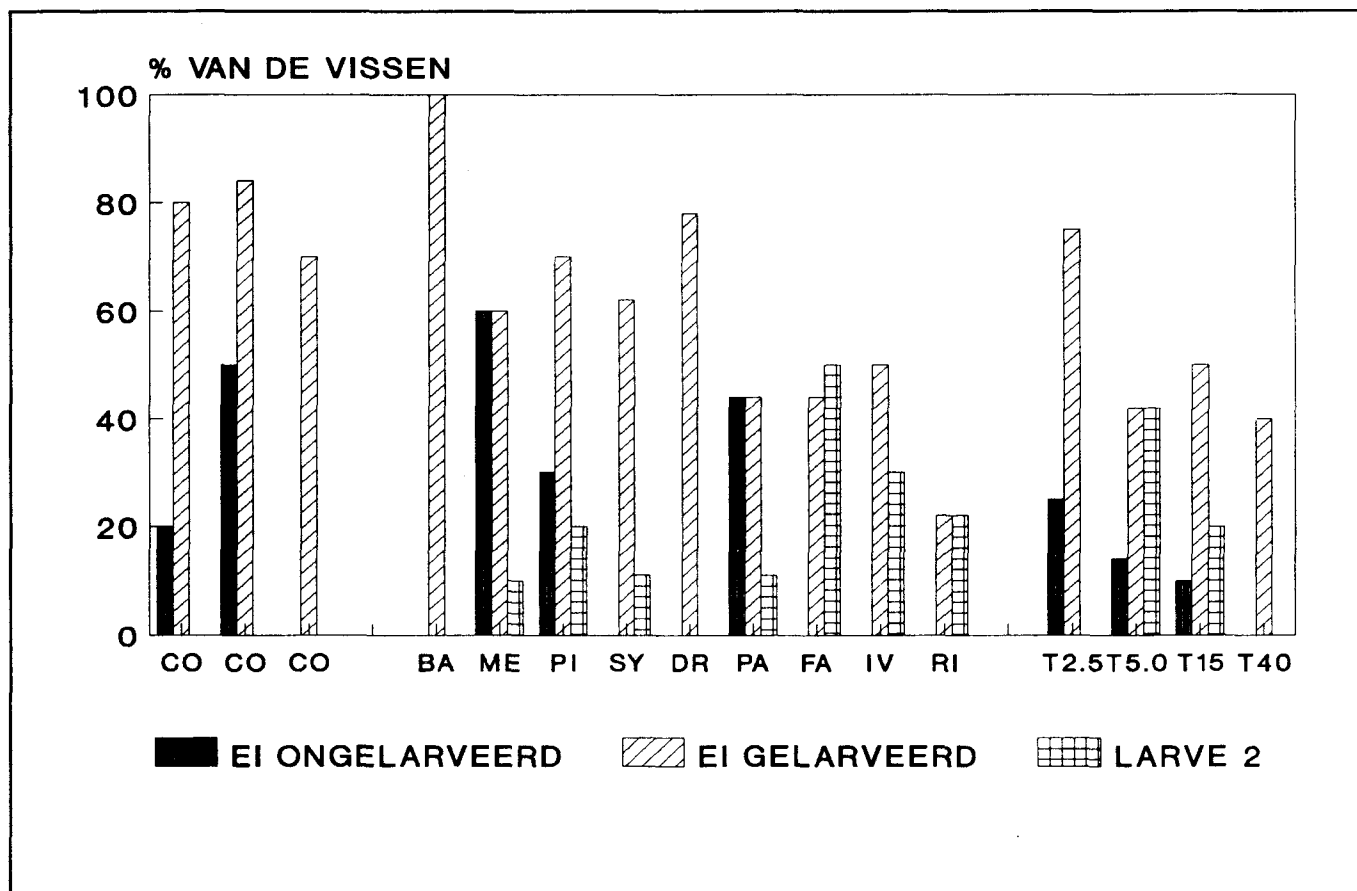
Behandeling	afkorting:
Controle	CO
Banminth ^R	BA
Mebenvet ^R	ME
Piperazine	PI
Synanthic ^R	SY
Droncit ^R	DR
Panacur ^R	PA
Fasinex ^R	FA
Ivomec ^R	IV
Rintal ^R	RI
L-Tramisol ^R	T2.5 (2.5 mg/kg)
	T5.0 (5.0 mg/kg)
	T15 (15 mg/kg)
	T40 (40 mg/kg)

In de figuren zijn de drie controle groepen apart weergegeven om enigzins een idee te krijgen van de grootteverschillen als gevolg van de verschillen tussen aquaria. De gewichten van de zwemblazen van de vissen (Figuur 1) blijken geen duidelijke verschillen te vertonen. De grootteverschillen van de test groepen vallen allen binnen de verschillen

tussen de controlegroepen. Echter het infectiestadium van de zwemblaazen blijkt wel duidelijke verschillen te vertonen. Terwijl in alle groepen de zwemblaas van de vissen veelal ontstoken is en nematoden bevat (stadium 3-4). Vertonen de zwemblaazen van de vissen die met Rintal^R en 5.0 mg/kg L-Tramisol^R behandeld zijn in veel gevallen een normaal uiterlijk, alhoewel er wel duidelijk nematoden aanwezig zijn (stadium 2). Ook de zwemblaazen van de vissen in de Ivomec^R groep lijken enigszins minder ontstoken te zijn.



Figuur 1 Gemiddeld zwemblaas-gewicht en stadium in de verschillende groepen.

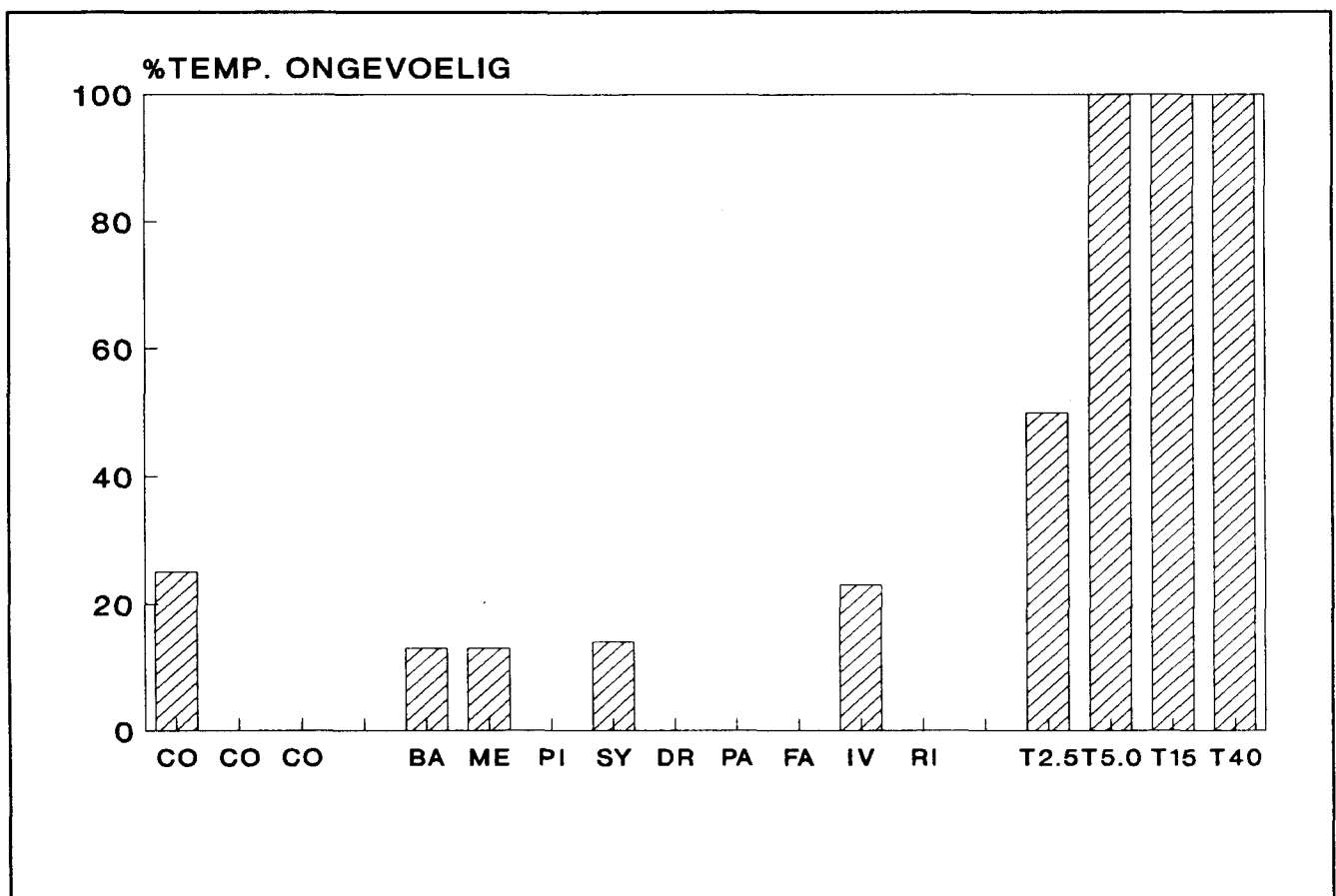


Figuur 2 Percentage vissen met ongelarveerde eieren, gelarveerde eieren, larven in stadium 2 in de verschillende groepen.

Figuur 2 toont het gemiddelde percentage vissen in de verschillende groepen met de jongere stadia nematoden. Duidelijke verschillen zijn alleen aanwezig in het aantal vissen met gelarveerde eieren. Dit percentage is duidelijk lager in de Rintal^R groep en is ook enigszins lager in de groepen vis die met een concentratie van 5.0, 15 en 40 mg/kg L-Tramisol^R behandeld zijn. Een zelfde tendens is waarneembaar in de Panacur^R, de Fasinex^R en de Ivomec^R groepen. Terwijl alle vissen in de Banminth^R groep gelarveerde eieren bevatten.

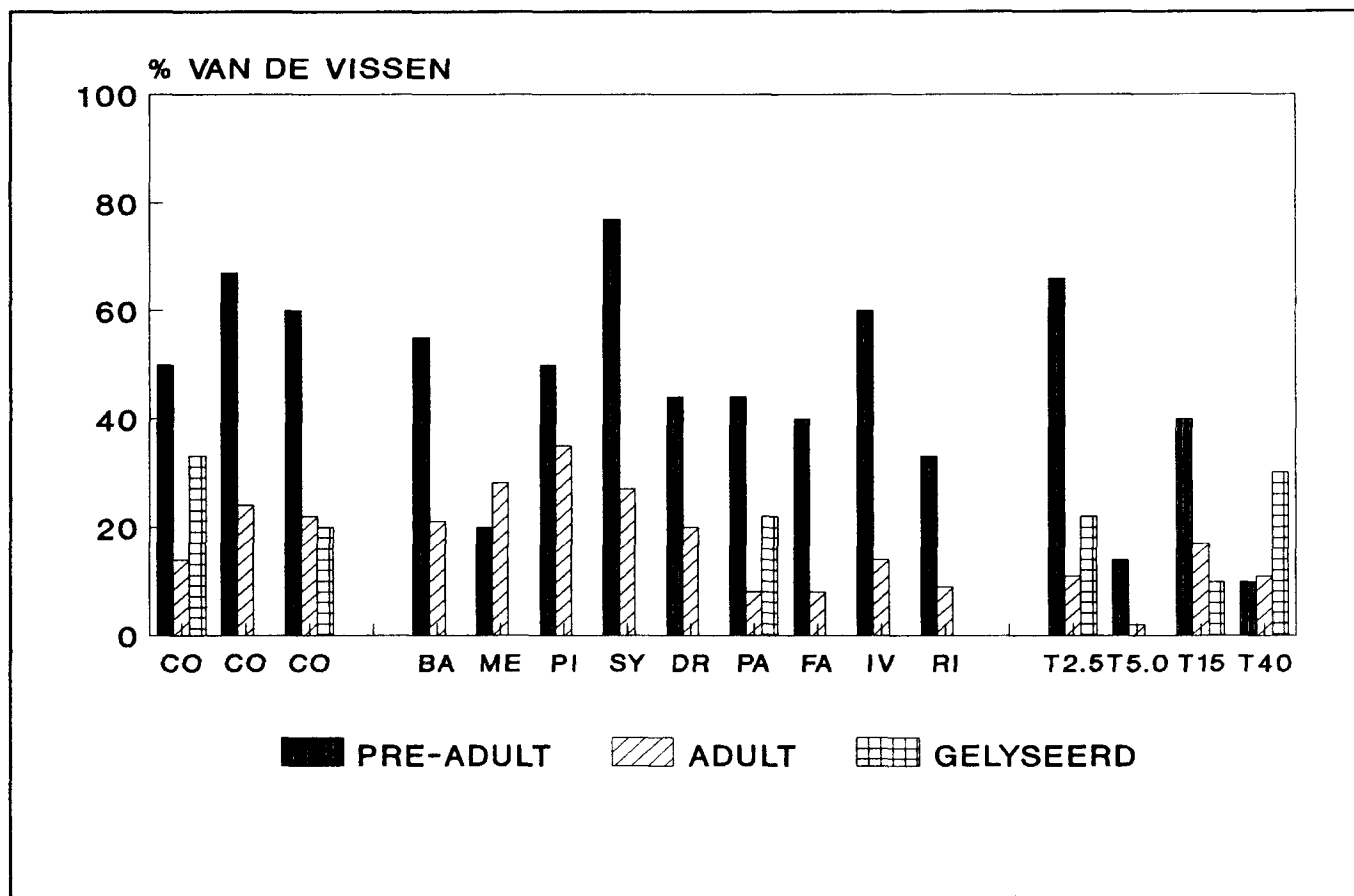
In figuur 3 is te zien dat in de Rintal^R, Mebenvet^R en in de L-Tramisol^R (5.0 en 40 mg/kg) groepen het percentage vissen met pre-adulte wormen duidelijk lager is dan in de controle groepen. Het percentage vissen met adulte of gelyseerde wormen in de zwemblaas vertoont geen duidelijke verschillen als gevolg van de behandelingen.

Figuur 4 toont het totaal aantal larven (stadium 2) en verschillende stadia wormen in de verschillende groepen. De "spekwormen" zijn dikke gele wormen, die de zich duidelijk onderscheiden van de normale adulte wormen. Duidelijke verschillen zijn waarneembaar in het aantal adulte wormen: terwijl er relatief veel aangetroffen werden in de Piperazine^R groep, waren er duidelijk minder adulte wormen aanwezig in de groepen die met Panacur^R, Fasinex^R, Rintal^R en L-Tramisol^R (2.5, 5 en 40 mg/kg) behandeld zijn.



Figuur 5 Temperatuur-ongevoelige (dode of verlamde) wormen uitgedrukt als percentage van het totaal aantal wormen.

In figuur 5 is weergegeven het percentage wormen dat niet reageert wanneer zij verwarmd worden. In alle groepen blijken het grootste gedeelte van de wormen gevoelig te zijn behalve in de groepen die met L-Tramisol^R behandeld zijn. Bij een concentratie van 2.5 mg/kg zijn 50% van de wormen ongevoelig, bij de hogere concentraties zijn alle wormen ongevoelig, dus dood en/of verlamd.

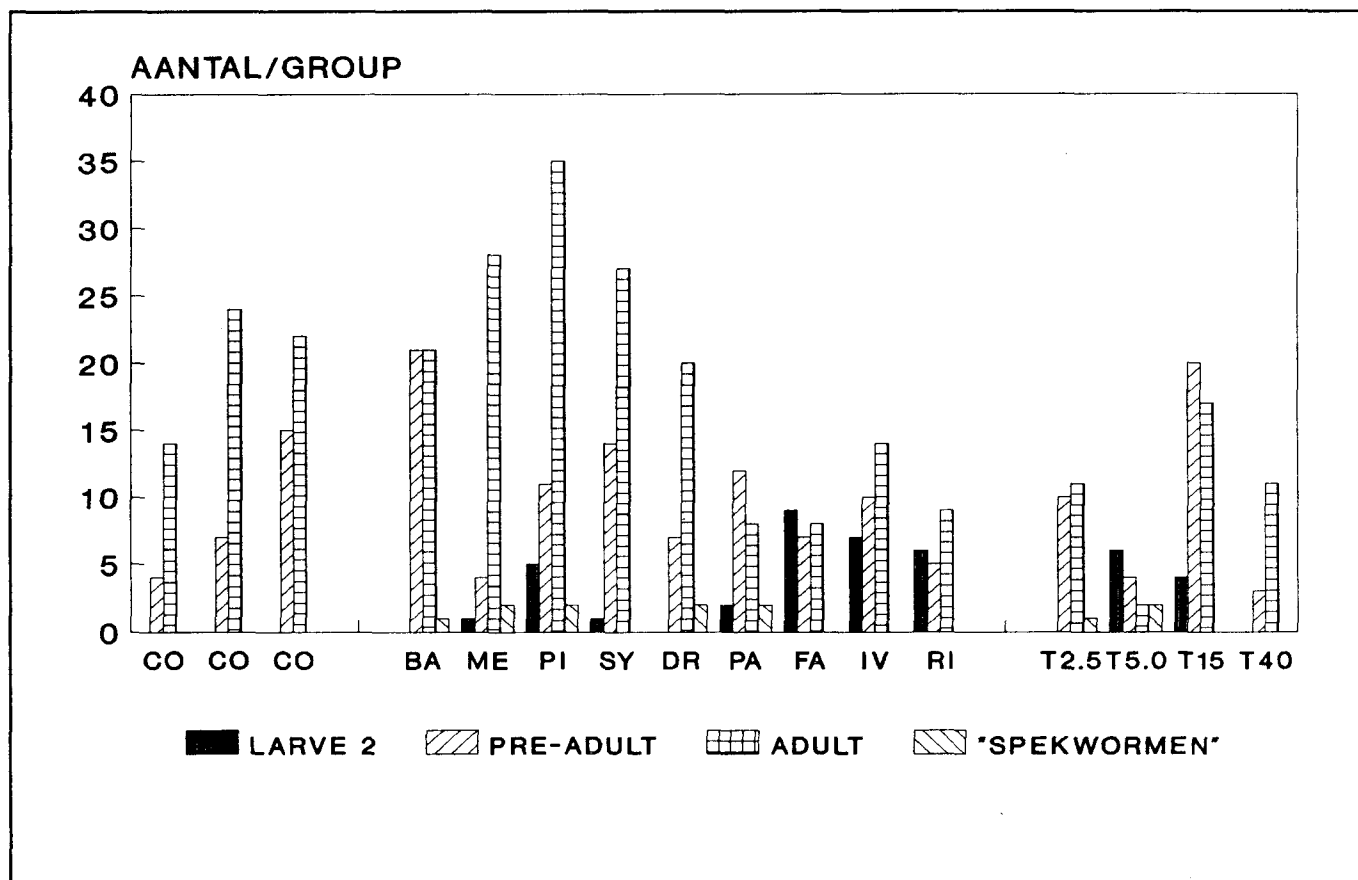


Figuur 3 Percentage van de vissen met pre-adulte, adulte of gelyseerde wormen.

Discussie

Na 3 weken behandeling van kweekaal met verschillende anthelmintica blijken er in het hier beschreven experiment een aantal opmerkelijke veranderingen op te treden wat betreft het infectiestadium van de zwemblaas, het aantal nematoden en de temperatuurgevoeligheid van de nematoden. De resultaten van de kweekaal die langer dan 3 weken behandeld werden zijn niet meegenomen in de bespreking van de resultaten aangezien er als gevolg van het recirculatie systeem zowel verspreiding van de nematoden als van de anthelmintica via het water over de verschillende aquaria is opgetreden waardoor de resultaten waarschijnlijk beïnvloed zijn.

Het meest effectieve uitgeteste anthelminticum is L-Tramisol^R. Een dosis afhankelijk vermindering van het aantal vissen met gelaarveerde eieren, het aantal vissen met pre-adulte wormen, het aantal adulte wormen werd waargenomen na behandeling met L-Tramisol^R. Bovendien hebben vissen die behandeld zijn met een dosis van 5 mg/kg L-Tramisol^R een minder ontstoken zwemblaas. Dezelfde effecten zijn waarneembaar met Rintal^R. L-Tramisol^R



Figuur 4 Aantal larven in stadium 2, pre-adulte wormen, adulte wormen en "spekwormen" die waargenomen werden per group vissen.

blijkt daarnaast ook een duidelijk dosis afhankelijk effect te hebben op de temperatuur-gevoeligheid van de nematoden: bij een dosis van 2.5 mg/kg blijkt 50 % van de wormen niet te reageren op warmte; bij de hogere doseringen is 100 % "ongevoelig".

Panacur^R en Fasinex^R lijken beiden het aantal adulte wormen en het percentage vissen met gelaarveerde eieren enigszins te verminderen. Dit laatste geldt ook voor Ivomec^R. Ivomec^R lijkt daarnaast eveneens een positief effect te hebben op het infectie stadium van de zwemblaas. Bij de vissen behandeld met Mebenvet^R werd een duidelijk geringer aantal pre-adulte wormen aangetoond dan in de controle groepen.

De resultaten met Ivomec^R, en L-Tramisol^R komen in grote lijnen overeen met de ervaringen met deze anthelminthica uitgetest in zeewater bij TEXVIS. Ivomec^R bleek daarbij zeer toxisch te zijn voor paling en geen duidelijk effect te hebben op de nematoden. Ook bij TEXVIS bleek L-Tramisol^R een duidelijk effect te hebben op de bewegelijkheid van de pre-adulte en adulte wormen. Tarashevski et al. (1988) hebben aangetoond dat behandeling van aal met L-Tramisol^R of trichloorfon leidde tot ernstige necrosis van de hypodermis, spierweefsel, de ingewanden en van zenuwweefsel van de nematoden. Bij hogere doseringen leidde deze

morfologische veranderingen uiteindelijk tot de dood van de nematoden. Tot slot kan men zich afvragen wat uiteindelijk het gevolg zal zijn van door anthelminthica-gedode nematoden op de gezondheid van de aal.

Referenties

- (1) Liewes, E.W. Proefvoorstel voor onderzoek naar de behandeling van zwemblaasnematode (*Anguillicola crassa*) bij kweekaal.
- (2) Banning van, P., Heermans, W. and Willigen, Van, J.A. *Anguillicola crassa*, een nieuwe aalparasiet in de Nederlandse wateren.
- (3) Taraschewski, H., Renner, C. and Mehlhorm, H., 1988. Treatment of fish parasites. 3. Effects of levamisole HCl, Metrifonate, fenbendazole, mebendazole, and ivermectin on *Anguillicola crassa* (nematodes) pathogenic in the air bladder of eels. Parasitol. Res. 74: 281-289.

Appendix 1: Groei en mortaliteit gegevens van de paling over de gehele proefperio

Anthelminthica	Dosering palingdeeg		Voedergift	Begin aantal	Begin gewicht	Sp.gr snelh
Controle	-		1%	67	69.0	
Banminth ^R	4	g/kg	1%	22	72.7	0.6
Droncit ^R	2.7	g/kg	1%	22	70.5	0.9
Fasinex ^R	8	ml/kg	1%	17	65.7	0.8
Ivomec ^R	10	ml/kg	1%	27	62.8	0.8
Mebenvet ^R	10	g/kg	1%	23	78.2	0.3
Panacur ^R	5	g/kg	1%	23	67.4	0.5
Piperazinecitr.	6	g/kg	1%	21	69.7	0.4
Rintal ^R	8	ml/kg	1%	23	75.8	0.5
Synanthic ^R	8.83	ml/kg	1%	29	59.2	0.6
L-Tramisol ^R	2.5	g/kg	1%	20	70.2	0.6
	5	g/kg	1%	22	64.6	0.9
	15	g/kg	1%	25	62.6	0.7
	40	g/kg	1%	27	59.2	0.6

Appendix 2: Resultaten na 3 weken orale anthelminthica toediening

Anthelminthica	Dosering palingdeeg	Aantal onderzochte palingen	Gemiddeld gewicht (gram)	Gewicht zwemblaas (gram)	SEM.
Controle	-	22	93.4 (25.4)	0.76 (0.49)	0.10
Banminth ^R	4 g/kg	9	85.1 (16.1)	0.56 (0.33)	0.11
Droncit ^R	2.7 g/kg	6	91.5 (17.0)	0.83 (0.32)	0.13
Fasinex ^R	8 ml/kg	7	79.9 (19.7)	0.39 (0.28)	0.11
Ivomec ^R	10 ml/kg	8	78.2 (27.1)	0.43 (0.27)	0.10
Mebenvet ^R	10 g/kg	10	80.2 (22.8)	0.52 (0.36)	0.11
Panacur ^R	5 g/kg	7	85.2 (19.5)	0.41 (0.17)	0.06
Piperazinecitr.	6 g/kg	10	80.8 (20.7)	0.69 (0.49)	0.15
Rintal ^R	8 ml/kg	5	85.3 (26.9)	0.61 (0.41)	0.18
Synanthic ^R	8.83 ml/kg	8	73.7 (20.2)	1.02 (0.53)	0.19
L-Tramisol ^R	2.5 g/kg	9	80.6 (16.8)	0.53 (0.18)	0.06
	5 g/kg	7	73.2 (21.9)	0.34 (0.15)	0.06
	15 g/kg	10	74.6 (27.3)	0.56 (0.40)	0.13
	40 g/kg	10	66.3 (17.7)	0.44 (0.30)	0.09

Anthelminthica	Zwemblaas (% B.W.)	Besmetting stadium	Worm (%)	Microsc. (%)	Temperatuur gevoeligheid (%)
Controle	0.84 (0.54)	3.1	95	76	95
Banminth ^R	0.63 (0.33)	2.8	89	100	87
Droncit ^R	1.01 (0.45)	2.7	50	83	100
Fasinex ^R	0.52 (0.43)	2.4	57	44	100
Ivomec ^R	0.60 (0.32)	2.0	88	50	77
Mebenvet ^R	0.68 (0.46)	2.8	90	60	87
Panacur ^R	0.57 (0.34)	2.4	57	43	100
Piperazine	0.85 (0.54)	2.7	90	70	100
Rintal ^R	1.0 (0.65)	1.8	60	22	100
Synanthic ^R	1.48 (0.92)	2.7	88	62	86
L-Tramisol ^R	0.66 (0.20)	3.1	77	75	57
	0.49 (0.19)	2	42	42	0
	0.72 (0.41)	2.8	90	50	0
	0.70 (0.56)	2.5	40	40	0

Appendix 3: Resultaten na 6 weken orale anthelminthica toediening.

Anthelminthica	Dosering palingdeeg	Aantal onderzochte palingen	Gemiddeld gewicht (gram)	Gewicht zwemblaas (gram)
Controle	-	18	97.8 (26.7)	0.54 (0.38)
Banminth ^R	4	8	90.5 (20.4)	0.45 (0.22)
Droncit ^R	2.7	9	99.7 (33.8)	0.66 (0.35)
Fasinex ^R	8	2	91.5 (5.3)	0.85 *
Ivomec ^R	10	11	84.9 (32.9)	0.47 (0.28)
Mebenvet ^R	10	9	92.1 (21.4)	0.61 (0.50)
Panacur ^R	5	9	73.8 (25.0)	0.50 (0.41)
Piperazine	6	8	76.7 (24.0)	0.63 (0.36)
Rintal ^R	8	10	94.7 (16.2)	0.36 (0.16)
Synanthic ^R	8.83	10	68.9 (17.3)	0.75 (0.66)
L-Tramisol ^R	2.5	10	92.2 (20.4)	0.54 (0.31)
	5	5	97.5 (7.4)	0.53 (0.27)
	15	9	82.1 (27.6)	0.40 (0.21)
	40	9	79.3 (23.9)	0.53 (0.33)

Anthelminthica	Zwemblaas (% B.W.)	Besmetting stadium	Worm (%)	Microsc. (%)	Temperatuur gevoeligheid (%)
Controle	0.57 (0.38)	2.3	67	50	81
Banminth ^R	0.58 (0.47)	2.3	75	25	100
Droncit ^R	0.70 (0.42)	2.4	89	67	85
Fasinex ^R	0.99 *				
Ivomec ^R	0.57 (0.3)	2.3	91	78	37
Mebenvet ^R	0.72 (0.66)	2.6	67	67	85
Panacur ^R	0.71 (0.48)	2.3	89	78	38
Piperazine	1.04 (0.85)	3.1	75	63	67
Rintal ^R	0.34 (0.18)	2	80	63	42
Synanthic ^R	1.18 (1.03)	2.8	80	71	83
L-Tramisol ^R	0.59 (0.32)	1.8	60	33	0
	0.56 (0.31)	3	60	50	0
	0.47 (0.14)	2	67	67	0
	0.68 (0.36)	3.2	67	84	0

Appendix 4: Resultaten na 9 weken orale anthelminthica toediening.

Anthelminthica	Dosering palingdeeg		Aantal onderzochte palingen	Gemiddeld gewicht (gram)	Gewicht zwemblaas (gram)
Controle	-		3	107.1 (28.3)	0.55 (0.20)
Banminth ^R	4	g/kg			
Droncit ^R	2.7	g/kg			
Fasinex ^R	8	ml/kg			
Ivomec ^R	10	ml/kg			
Mebenvet ^R	10	g/kg	3	117.0 (15.4)	0.57 (0.23)
Panacur ^R	5	g/kg			
Piperazine	6	g/kg			
Rintal ^R	8	ml/kg	2	79.2 (19.4)	0.75 (0.28)
Synanthic ^R	8.83	ml/kg	7	74.7 (25.0)	0.52 (0.24)
L-Tramisol ^R	2.5	g/kg			
	5	g/kg			
	15	g/kg	5	61.6 (16.6)	0.56 (0.30)
	40	g/kg	2	76.5 (1.8)	0.25 (0.05)

Anthelminthica	Zwemblaas (% B.W.)	Besmetting stadium	Worm (%)	Microsc. (%)	Temperatuur gevoeligheid (%)
Controle	0.59 (0.29)	2.3	67	33	50
Mebenvet ^R	0.51 (0.23)	67	50	50	
Rintal ^R	1.10 (0.62)	2	100	0	
Synanthic ^R	0.80 (0.49)	2.4	86	50	84
L-Tramisol ^R	0.99 (0.62)	3	80	75	0
	0.33 (0.06)	2	50	0	0