ePublishing

ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗΣ
NATIONAL DOCUMENTATION CENTRE

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 50, No 2 (1999)

Experimental trial of bioencapsulation of antimicrobial agent for the treatment of bacterial etiology diseases in seabass (Dicentrarchus labrax) fry. Evaluation of different therapeutic regimes

S. MOURELATOS (Σ. ΜΟΥΡΕΛΑΤΟΣ), M. TOURAKI (Μ. ΤΟΥΡΑΚΗ), G. SAVVIDIS (Γ. ΣΑΒΒΙΔΗΣ), G. SOULOUNIAS (Γ. ΣΟΥΛΟΥΝΙΑΣ), K. KASTRITSIS (Κ. ΚΑΣΤΡΙΤΣΗΣ)

doi: 10.12681/jhvms.15704

Copyright © 2018, S MOURELATOS, M TOURAKI, G SAVVIDIS, G SOULOUNIAS, K KASTRITSIS

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.

To cite this article:

MOURELATOS (Σ. ΜΟΥΡΕΛΑΤΟΣ) S., TOURAKI (Μ. ΤΟΥΡΑΚΗ) M., SAVVIDIS (Γ. ΣΑΒΒΙΔΗΣ) G., SOULOUNIAS (Γ. ΣΟΥΛΟΥΝΙΑΣ) G., & KASTRITSIS (Κ. ΚΑΣΤΡΙΤΣΗΣ) K. (2018). Experimental trial of bioencapsulation of antimicrobial agent for the treatment of bacterial etiology diseases in seabass (Dicentrarchus labrax) fry. Evaluation of different therapeutic regimes. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *50*(2), 116–126. https://doi.org/10.12681/jhvms.15704

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 22/02/2025 22:42:35

ΔΕΛΤΙΟΝ ΕΛΛ. ΚΤΗΝ. ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 1999, 50(2): 116-126

Πειραματική δοκιμή βιοεγκύστωσης αντιμικροβιακού παράγοντα για τη θεραπεία βακτηριακής αιτιολογίας νοσημάτων σε ιχθύδια λαβρακιού (Dicentrarchus labrax). Εκτίμηση διαφόρων θεραπευτικών σχημάτων

Σ. Μουρελάτος[1], Μ. Τουράκη[1], Γ. Σαββίδης[2], Γ. Σουλούνιας[1], Κ. Καστρίτσης[1]

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Η χορήγηση ζωντανής τροφής (ναύπλιοι *Artemia*) αποτελεί τυπική διαδικασία και κλασικό τρόπο εκτροφής νεαρών ιχθυδίων τσιπούρας και λαβρακιού. Τα διάφορα, μικροβιακής αιτιολογίας, νοσήματα με σοβαρότατες οικονομικές προεκτάσεις συνιστούν ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα κατά το χρονικό τούτο διάστημα. Θεραπευτικές παρεμβάσεις με την δια του στόματος, χορήγηση των κατάλληλων αντιμικροβιακών παραγόντων, θεωρούνται και είναι αφ' ενός μεν περισσότερο εφικτές, αφ' ετέρου δε περισσότερο φιλικές προς το περιβάλλον. Η χρησιμοποιούμενη μέθοδος συνίσταται στην τεχνική της βιοεγκύστωσης δηλαδή της ενσωμάτωσης των θεραπευτικών ουσιών στη ζωντανή τροφή. Σε ειδικά διαμορφωμένες εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και στα πλαίσια σχετικού ερευνητικού προγράμματος χρηματοδοτούμενου από την Ευρωπαϊκή Ένωση, διενεργήθηκαν πειραματισμοί σε ιχθύδια λαβρακιού με στελέχη *Vibrio anguillarum* με στόχο τη βελτιστοποίηση των εφαρμοζόμενων κάθε φορά θεραπευτικών και προληπτικών σχημάτων. Στα πλαίσια της εργασίας αυτής παρουσιάζονται συγκριτικά αποτελέσματα από δύο διαφορετικές πειραματικές σειρές (*expermental set*)· κάθε σειρά περιλαμβάνει οκτώ διαφορετικές πειραματικές συνθήκες (*experimental series*), ενώ σε κάθε συνθήκη υπάρχουν πέντε επαναλήψεις (*aliquot*). Ο πειραματισμός θα συνεχιστεί με τη χρησιμοποίηση και άλλων στελεχών του ιδίου μικροβιακού είδους καθώς και άλλων παθογόνων μικροβιακών ειδών. Επίσης προβλέπεται και η εφαρμογή και άλλων σχετικών πειραματικών πρωτοκόλλων.

Λέξεις ευρετηρίασης: ναύπλιοι Artemia, βιοεγκύστωση TMP+SMX,ιχθύδια λαυρακιού

ABSTRACT. S. Mourelatos[1], M. Touraki[1], G. Savvidis[2], G. Soulounias[1], K. Kastritsis[1]. Experimental trial of bioencapsulation of antimicrobial agent for the treatment of bacterial etiology diseases in seabass (Dicentrarchus labrax) fry. Evaluation of different therapeutic regimes. *Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society 1999, 50(2):116-126.* **Early stages of larval development of seabass and seabream are typically fed with live feeds (nauplii of *Artemia*). The different disease of microbial etiology with important economic consequences, constitute one of the most significant problems during this first larval period. Therapeutic interventions, implying oral delivery of appropriate antimicrobial agents, are considered more feasible and environmentally friendly. The method used consists in techniques of bioencapsulation (incorporation of therapeutics in the live feeds). In specially designed facilities of the Laboratory of General Biology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, in the frame of a European Union research programme, experimental trials were carried out on seabass fry with *Vibrio anguillarum* strains, aiming at the optimisation of therapeutic and/or preventive schemes. Within this work, comparative results from separate experimental sets (each set comprising eight different experimental series [conditions], each series having five aliquots) are presented. The experimentation will be continued by using different strains and different bacterial species and by testing other relevant experimental protocols.**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η συνεχής εντατικοποίηση των μεθόδων εκτροφής αύξησε σημαντικά τόσο από πλευράς αριθμού όσο και από πλευράς σοβαρότητας τα διάφορα παθολογικής αιτιολογίας προβλήματα στην οργανωμένη ιχθυοτροφία. Μεταξύ των προβλημάτων, τα μικροβιακά νοσήματα αποτελούν

[1] *Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.*

[2] *Εργαστήριο Νοσημάτων Ιχθύων και Οστρακοειδών, Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης, Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας.*

[1] *Laboratory of General Biology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki.*

[2] *Laboratory of Fish and Shellfish Diseases, Veterinary Research Institute of Thessaloniki, National Agricultural Research Foundation.*

Ημερομηνία υποβολής: 19.05.98
Ημερομηνία εγκρίσεως: 13.11.98

μία μόνιμη πηγή κινδύνου, ιδιαίτερα κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των νεαρών ιχθυδίων.

Η συνήθης πρακτική θεραπευτικής αντιμετώπισης των μικροβιακών νοσημάτων, η οποία συνίσταται κυρίως στην προσθήκη των κάθε φορά επιλεγομένων θεραπευτικών μέσων είτε στο νερό εκτροφής είτε στη χορηγούμενη τεχνητή τροφή, εμφανίζει αρκετά μειονεκτήματα όπως περιβαλλοντική υποβάθμιση, ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών, καθώς και αρκετά συχνά μη ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Από την άλλη μεριά, ζωντανοί οργανισμοί ιδιαίτερα ναύπλιοι *Artemia*, είναι γνωστό ότι χρησιμοποιούνται εκτενώς ως η κύρια πηγή τροφής στην εκτροφή γόνου θαλασσινών ψαριών (τσιπούρα, λαβράκι) και ως εκ τούτου χρησιμεύουν ήδη ως βιολογικοί μεταφορείς ουσιωδών θρεπτικών συστατικών, όπως ακόρεστα λιπαρά οξέα (ω^3 HUFA), βιταμίνες κ.λπ.

Υπ' αυτήν την έννοια και κατ' αυτόν τον τρόπο η απευθείας θεραπεία νοσημάτων δια μέσου της τροφικής αλυσίδας (ενσωμάτωση των προς χορήγηση αντιβιοτικών στη ζωντανή τροφή) αποδεικνύεται εν πολλοίς δραστικότερη, οικονομικότερη αλλά και φιλικότερη περιβαλλοντικά.

Σε ειδικά διαμορφωμένες εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης και στα πλαίσια σχετικού ερευνητικού προγράμματος χρηματοδοτούμενου από την Ευρωπαϊκή Ένωση εφαρμόστηκαν, με τη μέθοδο της βιοεγκύστωσης, διάφορα θεραπευτικά και προληπτικά σχήματα μετά από πειραματική μόλυνση ιχθυδίων λαβρακιού με δύο στελέχη *Vibrio anguillarum*.

Η προκαλούμενη από το *V. anguillarum* ασθένεια της δονακίωσης (*Vibriosis*) απαντά κυρίως σε ψάρια, εκτρεφόμενα ή μη, των αλμυρών και υφάλμυρων υδάτων (σολομοειδή, χέλια, λαβράκια κ.ά.). Τα κρούσματα φαίνεται ότι δεν περιορίζονται στο θαλάσσιο περιβάλλον. Αναφέρονται επιζωοτίες σε πέστροφες εκτρεφόμενες σε γλυκό νερό, πιθανότατα οφειλόμενες σε διατροφή των ψαριών με μολυσμένα μη καταναλωθέντα νεκρά ψάρια[1]. Επίσης καταγράφηκαν περιστατικά σε τροπικά ψάρια διατηρούμενα σε ενυδρεία γλυκού νερού. Επιπρόσθετα, η ασθένεια φαίνεται να αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα σε καλλιεργούμενα μαλακόστρακα, όπως π.χ. οι αστακοί και οι γαρίδες[1,2].

Σήμερα, ως παθογόνα είδη του γένους *Vibrio* έχουν περιγραφεί τα *V. anguillarum* (το συνηθέστερα απαντών είδος), *V. ordalii, V. alginolyticus, V. cholerae* (NON-01), *V. damsela, V. vulinificus, V. salmonicida, V. carchariae.*

Η ασθένεια της δονακίωσης στην τυπική της μορφή χαρακτηρίζεται από γενικότερη σηψαιμική εικόνα (πετέχειες, διάχυτες αιμορραγίες αλλά και νεκρωτικές αλλοιώσεις παρατηρούνται τόσο στα εσωτερικά όσο και καθ' όλη την έκταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος).

Στην Ελλάδα σήμερα η δονακίωση αποτελεί ένα από τα σοβαρότερα νοσολογικά προβλήματα στη θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια, με τις προκαλούμενες οικονομικές επιπτώσεις να κυμαίνονται σε μεγάλα μεγέθη. Ενδεικτικά για την Ιαπωνία, ως τάξη μεγέθους, αναφέρεται ότι οι ετήσιες οικονομικές απώλειες εξ αιτίας του νοσήματος υπερβαίνουν τα 3,5 δισ δρχ.

Στην εργασία αυτή παρουσιάζονται συγκριτικά αποτελέσματα από δύο ξεχωριστές πειραματικές σειρές, εκ των οποίων η κάθε μία διαλαμβάνει οκτώ διαφορετικές πειραματικές συνθήκες και κάθε συνθήκη έχει πέντε επαναλήψεις.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Βιολογικό υλικό

Κύστεις *Artemia* (Great Salt Lake) επωάζονται κανονικά σε φιλτραρισμένο θαλασσινό νερό αλατότητος 35‰ , θερμοκρασίας κυμαινόμενης περί τους 28° C και σε συνθήκες συνεχούς αερισμού και φωτισμού (2000 Lux). Μετά από πάροδο 24 h οι ναύπλιοι I σταδίου διαχωρίζονται από τις μη εκκολαφθείσες κύστεις και ξεπλύνονται με καθαρό θαλασσινό νερό. Κατόπιν, τους χορηγείται ειδικό εμπλουτιστικό μέσο (HUFA) με ή χωρίς την παρουσία αντιβιοτικών σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο, το οποίο πρόκειται να ακολουθηθεί. Το εμπλουτιστικό μέσο υπό την επωνυμία Selco base προέρχεται από το Laboratory of Aquaculture and Artemia Reference Center, State University of Ghent, Belgium. Το χημειοθεραπευτικό μέσο , το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη διενέργεια των πειραματισμών, ήταν ένα μίγμα Trimethoprim και Sulfamethoxazole σε αναλογία μεταξύ τους 1:5 (όπως ακριβώς η σχέση μεταξύ τους στα κυκλοφορούντα στο εμπόριο ανάλογα σκευάσματα) και το οποίο προστίθεται κατά περίπτωση στο Selco base μέχρι την επίτευξη τελικής συγκέντρωσης 40% w/w (στα 100 mg έτοιμου προς χορήγηση μείγματος Selco base και φαρμακούχου μείγματος - υπάρχουν 40 mg χημειοθεραπευτικού μέσου).

Για τη διενέργεια των πειραματικών μολύνσεων χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά στελέχη *Vibrio anguillarum*:

α. στην πειραματική σειρά I το γαλλικό στέλεχος 408, το οποίο απομονώθηκε από λαβράκια στον Ατλαντικό ωκεανό (Laboratoire de Pathologie des Animaux Aquatiques d' IFREMER, Brest), και

β. στην πειραματική σειρά II το ελληνικό στέλεχος 332A, το οποίο απομονώθηκε από μονάδα εκτροφής εγκατεστημένη στην Κεντρική Ελλάδα.

Τα στελέχη διατηρούνται στο εργαστήριο σε TCBS Agar, Marine Agar καθώς και TSA εμπλουτισμένο με 2,5% NaCI. Πριν από τη χρησιμοποίησή τους λαμβάνει χώρα επαναβεβαίωση της βιοχημικής τους συμπεριφοράς

(biochemical profil) με τη διενέργεια όλων των απαραιτήτων εργαστηριακών εξετάσεων (χρώση Gram, δοκιμασία O/F, οξειδάση, 0 129, καταβολισμός αμινοξέων, διάσπαση σακχάρων κ.λπ., καθώς και αντιβιογράμματα). Καλλιεργούνται σε sea water yeast peptone για χρονικό διάστημα 24h και σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν από τον πειραματισμό το διάλυμα φυγοκεντρείται (4000 rpm, 10 min), απορρίπτεται το υπερκείμενο και το εναπομείναν επαναδιαλύεται σε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Η βακτηριακή συγκέντρωση προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος 600 nm καθώς και με τη μέθοδο της πλακός (Neubauer).

Πέραν των ανωτέρω και με σκοπό την επιβεβαίωση των αρχών του Koch, δείγματα ιχθυδίων τα οποία μολύνθηκαν και έθαναν, υποβλήθηκαν σε μικροβιολογικές εξετάσεις για επαναπομόνωση από τους νεφρούς του παθογόνου μικροβίου. Έτσι έγιναν σπορές από νεφρικό παρέγχυμα σε Marine Agar και TCBS Agar, τα οποία επωάσθηκαν στους 25° C για 24 h. Το σύνολο των μικροβιολογικών εξετάσεων των υπόπτων αποικιών, πιστοποίησε την παρουσία και επανεμφάνιση του *V. anguillarum*.

Τα ιχθύδια λαβρακιού που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τη μονάδα Rio Pesca. Οι συνθήκες εγκλιματισμού τους, οι οποίες διαρκούν τουλάχιστον μία εβδομάδα πριν από την έναρξη των πειραματισμών, έχουν ως ακολούθως:

- θερμοκρασία 18° C, pH 8,2-8,4, διαλυμένο οξυγόνο κοντά στα επίπεδα κορεσμού
- φωτοπερίοδος, 12 h φως/12 h σκότος
- χορήγηση τροφής 3 φορές ημερησίως (ναύπλιοι εμπλουτισμένοι με το υλικό Artemia Selco base).
- ιχθυοπυκνότητα, το ανώτερο 5 άτομα / l νερού.

2. Διεξαγωγή του πειραματισμού

α) Πειραματική σειρά Ι

Τα ιχθύδια λαβρακιού, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, ήταν της ίδιας ηλικίας, περίπου 80 ημερών και βάρους κατά μέσον όρο 203 mg. Το όλο πειραματικό πρωτόκολλο είχε ως ακολούθως:

Γίνεται τυχαία σύλληψη ομάδων αποτελουμένων από 20 ψάρια κάθε μία, τα οποία εν συνεχεία μεταφέρονται σε 38 πλαστικούς κυλινδρικούς περιέκτες, στον καθένα από τους οποίους έχει ήδη τοποθετηθεί ποσότητα 5 l νερού. Οι περιέκτες εγκαθίστανται σε ειδικό χώρο ελεγχόμενης θερμοκρασίας και φωτισμού, ενώ ο καθένας απ' αυτούς είναι εφοδιασμένος με βυθιζόμενη συσκευή αερισμού καθώς και σύστημα εκκένωσης στον πυθμένα. Κάθε πειραματική συνθήκη περιλαμβάνει πέντε επαναλήψεις εκτός από τις συνθήκες 5 και 6 οι οποίες είχαν μόνο τέσσερις.

Μετά τη διενέργεια της βακτηριακής μόλυνσης και τη χορήγηση της κατάλληλης αντιβιοτικής θεραπείας, λαμβάνει χώρα, κατά τα 3/4 κάθε φορά και ανά διήμερο, αλλαγή του νερού των περιεκτών καθώς και η κανονική γενική φροντίδα συνεχιζόμενη για χρονικό διάστημα τουλάχιστον δύο εβδομάδων.

Πειραματική σειρά Ι. (Experimental Set I)

Πίνακας Ι. Πρωτόκολλο πειραματικής μόλυνσης με Vibrio και χορήγησης -via Artemia - TMP-SMX (1:5) σε οκτώ συνθήκες (Exp. Series) της πειραματικής σειράς Ι, C: μόλυνσηV. anguillarum 408 (2 ώρες επώαση, 1,2x10^6 μικροβιακά κύτταρα / ml). M: Χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής με Artemia δύο φορές ημερησίως για όλες τις συνθήκες (πλην της συνθήκης 8: μία δόση 2 ώρες πριν από την πρόκληση της μόλυνσης).

Table I. Experimental protocol of Vibrio challenge and TMP-SMX (1:5) delivery via Artemia in the eight series of experimental set I. C: Challenge with V. anguillarum 408 (2-hour incubation, 1.2x10^6 cells/ml), M: Administration of medicated nauplii of Artemia twice a day for all series (except for series 8: one dose of medicated nauplii 2 hours prior to the onset of the 2-hour Vibrio-challenge).

Πειρ/κές Συνθήκες /Ημέρες (Exp. Series /Days)	-1	0	1	2	3
1		Control			
2		MM			
3		C			
4		C	MM		
5	MM	C			
6	MM	C	MM		
7		C	MM	MM	MM
8		MC			

Η μόλυνση των ψαριών με το στέλεχος *V. anguillarum* 408 επιτυγχάνεται με τον ενοφθαλμισμό του ύδατος των περιεκτών (εκείνων που πρέπει ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες) μέχρι την επίτευξη τελικής συγκέντρωσης 1, 2 x 10^6 μικροβιακά κύτταρα /ml. Η διαδικασία της μόλυνσης περατώνεται μετά από παρέλευση 2 h οπότε λαμβάνει χώρα αλλαγή του νερού των περιεκτών κατά δύο αλλεπάλληλες φορές.

Η θεραπευτική παρέμβαση, εκεί όπου απαιτείται, συνίσταται στην ημερήσια χορήγηση ανά ιχθύδιο 1500 ναυπλίων Artemia, οι οποίοι προηγουμένως έχουν προσλάβει ποσότητα αντιβιοτικών (προσδιορισθείσα με HPLC) ίση με 0,690 μg και 1,650 μg TMP και SMX αντίστοιχα. Στις περιπτώσεις όπου η θερμοκρασία εφαρμόζεται πριν από την πειραματική μόλυνση, γίνονται δύο αλλαγές του νερού μεταξύ των δύο παρεμβάσεων.

Η παρατηρούμενη θνησιμότητα καταγράφεται καθημερινά, ενώ τα νεκρά ψάρια απομακρύνονται από τον υ-

Πειραματική Σειρά ΙΙ. (Experimental Set II)

Πίνακας ΙΙ. Πρωτόκολλο πειραματικής μόλυνσης με Vibrio και χορήγηση -via Artemia- TMP-SMX (1:5) σε οκτώ συνθήκες (Exp. Series) της πειραματικής σειράς ΙΙ. C: Μόλυνση με *V. anguillarum* 332 A (4 ώρες επώαση, 10^6 μικροβιακά κύτταρα/ml). M: χορήγηση, ανά ιχθύδιο ημερησίως συνολικά 1500 ναυπλίων *Artemia,* φερόντων TMP-SMX.

Table II. Experimental protocol of Vibrio challenge and TMP-SMX (1:5) delivery via *Artemia* in the eight series of *experimental set II*. C: Challenge with V. anguillarum 332A (4-hour incubation, 10^6 cell/ml). M: Daily administration of 1500 medicated nauplii of *Artemia* per fish.

Πειρ/κές Συνθήκες /Ημέρες (Exp. Series/Days)	-3	-2	-1	0	1	2	3
1				Control			
2				C			
3			M	MMCMM	MM	MM	MM
4			M	MMC			
5				CMM	M		
6				C	MM	MM	MM
7	MM	MM	MM	C			
8	MM	MM	MM	C	MM	MM	MM

Πίνακας ΙΙΙ. Σχήμα θεραπευτικής αγωγής με τους μικρότερους παρεμβαλλόμενους χρόνους στις συνθήκες 3, 4 και 5 της πειραματικής σειράς ΙΙ. Ο χρόνος 0 αντιστοιχεί στο χρόνο διενέργειας της μόλυνσης.

Table III. Therapeutic delivery schedule for the shorter time laps (hours) in series 3, 4 and 5 of experimental set II. Time 0 corresponds to the bacterial challenge.

Πειρ. Συνθ. /Ώρες (Exp. Series/ Hours)	-16	-6	-1	+1	+6	+16
3	M	M	M	M	M	M
4	M	M	M			
5				M	M	M

πόλοιπο πληθυσμό κάθε μέρα στις 10.00

Το πειραματικό πρωτόκολλο το οποίο ακολουθήθηκε εμφανίζεται συνοπτικά στον Πίνακα Ι.

β) Πειραματική σειρά ΙΙ

Η κυριότερη διαφορά αναφορικά με τη διαδικασία διεξαγωγής των δύο πειραματικών σειρών έγκειται στο γεγονός ότι ενώ στη σειρά Ι τόσο η πειραματική μόλυνση όσο και η θεραπευτική παρέμβαση έλαβαν χώρα στους ίδιους περιέκτες (tanks), στη σειρά ΙΙ υπήρξε ο ακόλουθος διαχωρισμός: η μόλυνση των ιχθυδίων έγινε σε ξεχωριστά υάλινα ορθογώνια ενυδρεία 80 l, ενώ η θεραπεία εφαρμόστηκε, όπως και στη σειρά Ι, στους γνωστούς πλαστικούς κυλινδρικούς περιέκτες 5 l. Η μεταφορά των ψαριών έγινε με τη βοήθεια μαλακού δικτυού (διαμέτρου οφθαλμού 100 μm), παρεμβολής και διόδου (τρεις φορές) δια μέσου θαλασσινού νερού και τελικής τοποθέτησής τους στους κατάλληλους πειραματικούς περιέκτες των 5 l για την παρακολούθηση της θνησιμότητος (ημερήσια καταγραφή και απομάκρυνση των νεκρών ψαριών στις 10.00). Στους μάρτυρες που έχουν και αυτοί υποστεί την ίδια διαδικασία μεταφοράς, δεν παρατηρήθηκε αξία λόγου θνητότητα.

Ο πειραματισμός στη σειρά ΙΙ αφορούσε ομάδες ιχθυδίων 15-20 ατόμων της ίδιας ηλικίας (περίπου 70 ημερών) και μέσου βάρους 159 mg. Η όλη πειραματική διαδικασία διήρκεσε δύο εβδομάδες, όπως και στη σειρά Ι και συνοπτικά παρουσιάζεται στους Πίνακες ΙΙ και ΙΙΙ.

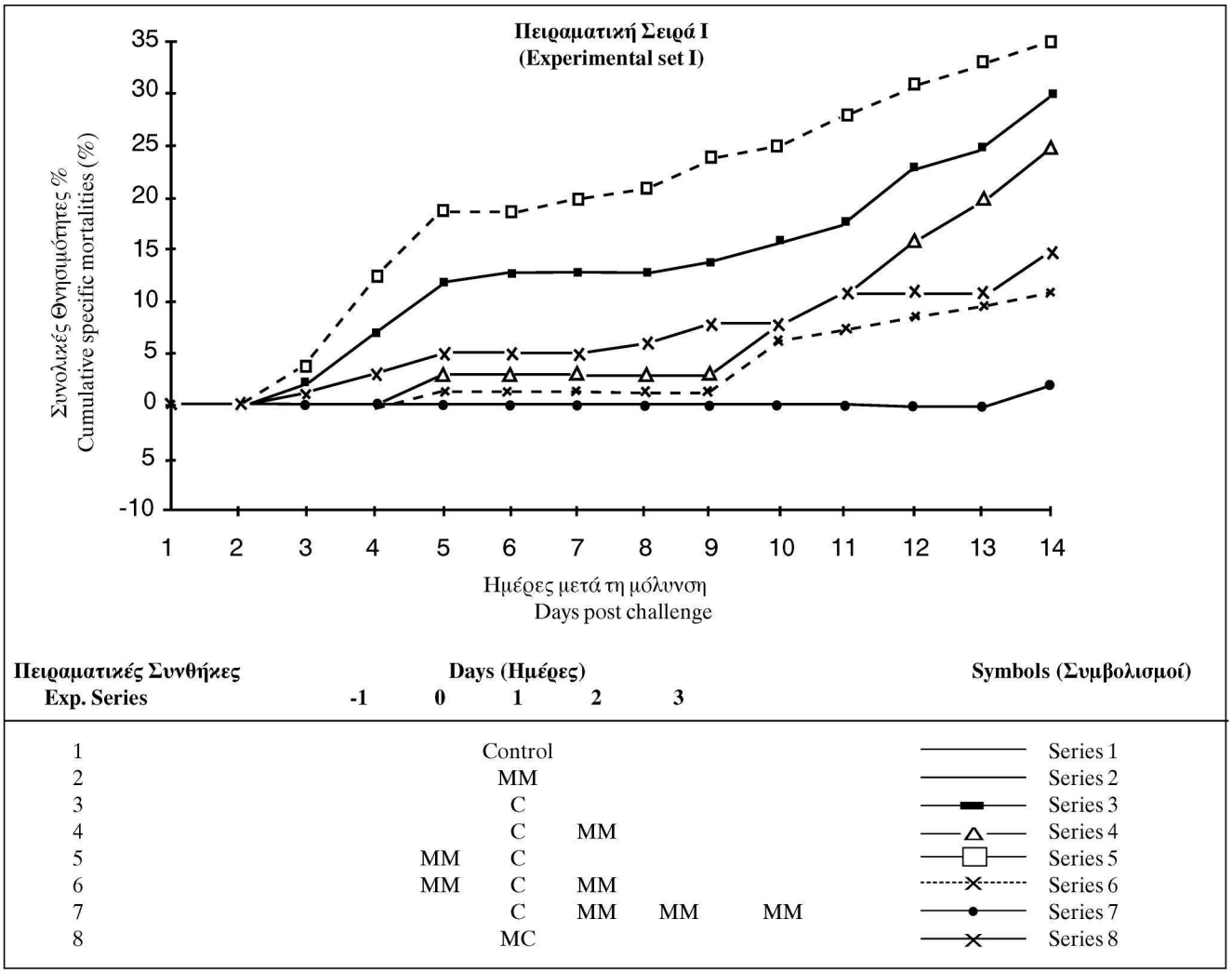
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Πειραματική σειρά Ι.

Κατ' αρχήν, αυτό που πρέπει να υπογραμμισθεί, αναφορικά με τα αποτελέσματα της πρώτης πειραματικής σειράς, είναι ότι η θνησιμότητα η οποία παρατηρήθηκε στην πειραματική συνθήκη 3 (ομάδα ιχθυδίων μολυνθείσα και μη υποστάσα θεραπεία) ανέρχεται σε ποσοστό 30%. Αυτό δείχνει ότι το εν προκειμένω χρησιμοποιηθέν γαλλικό στέλεχος *V. anguillarum* 408 χαρακτηρίζεται από αρκετά μέτρια λοιμογόνο ικανότητα.

Συνολικά, τα αποτελέσματα τόσο σε σχέση με την τελική θνησιμότητα των οκτώ πειραματικών συνθηκών όσο και αναφορικά με την εξέλιξη της θνησιμότητας για το χρονικό διάστημα των 14 ημερών του πειραματισμού, παρουσιάζονται στον Πίνακα IV και στο Σχήμα 1 αντίστοιχα.

Προσεγγίζοντας τα δεδομένα του Σχήματος 1, παρατηρείται ότι η θνησιμότητα στην πειραματική συνθήκη 3



Σχήμα 1. Εξέλιξη των ημερήσιων συνολικών θνησιμοτήτων κατά τη διάρκεια πειραματισμού 14 ημερών για τις οκτώ συνθήκες της πειραματικής σειράς I. Παράλληλα δίδονται και οι διάφορες θεραπείες για κάθε μία από τις διαφορετικές συνθήκες. C: μόλυνση, M: θεραπεία. Για περισσότερες λεπτομέρειες, ίδε Πίνακα I.

Figure 1. Evolution of daily cumulative mortalities during 14 days for the eight experimental series of set I. The specific treatments received by the different series, along with the respective symbols employed, are also indicated. C: challenge, M: medication. For further details, see Table I.

αρχίζει να εγκαθίσταται 3 ημέρες μετά τη μόλυνση, συνεχίζεται με την ίδια περίπου ένταση κατά την 4η και 5η μέρα, κατόπιν ελαττώνεται και, τέλος, άρχεται αυξανόμενη ξανά, αρχής γενομένης κατά την 9η μέχρι τη 14η ημέρα (τέλος πειραματισμού).

Αναφορικά με τις συνθήκες από 4 έως και 8, οι οποίες υπέστησαν όλες τόσο τη μόλυνση όσο και τη θεραπεία, τα πιο αξιόλογα σημεία, τα οποία πρέπει να τονισθούν, είναι τα ακόλουθα:

α. Η υψηλότερη θνησιμότητα καταγράφηκε στη συνθήκη 5 με τελικό ύψος μεγαλύτερου ακόμη και εκείνου της συνθήκης 3. Είναι αξιοσημείωτο, όπως σαφώς εμφαίνεται από τα δεδομένα του Πίνακα IV, ότι το επιτυγχανόμενο ποσοστό προστασίας στη συνθήκη 5 είναι εντελώς αρνητικό (-58,2%) συγκρινόμενο με το επίπεδο θνησιμότητας της συνθήκης 3 (ομάδα ιχθυδίων μολυνθείσα και μη υποστάσα θεραπεία).

β. Απουσία ουσιαστικά θνησιμότητας σημειώθηκε στη συνθήκη 7. Η χορήγηση θεραπευτικής αγωγής για 3 ημέρες μετά την πειραματική μόλυνση είχε θετικότατα αποτελέσματα.

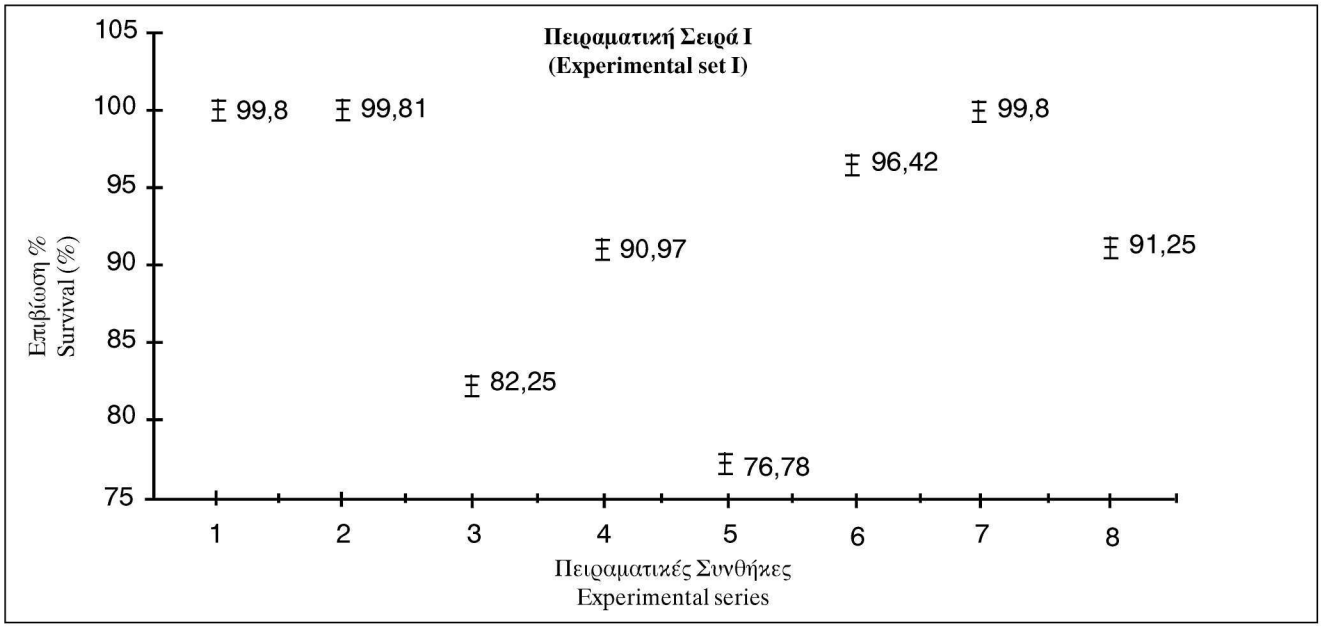
γ. Ενδιάμεσα θεραπευτικά αποτελέσματα σημειώθηκαν για τις συνθήκες 4, 8 και 6 εμφανίζοντας ένα ποσοστό προστασίας 17,9%, 53,6% και 62,5% αντίστοιχα. Στις συν-

Πειραματική Σειρά I. (Experimental Set I)

Πίνακας IV. Μέσο, καθώς και ελάχιστο - μέγιστο τελικό ποσοστό θνησιμοτήτων για κάθε πειραματική συνθήκη (n=5, εκτός των συνθηκών 5 και 6: n=4). Επίσης δίδεται το μέσο ποσοστό προστασίας στις συνθήκες που έλαβαν θεραπευτική αγωγή.

Table IV. Average and minimal-maximal final percentile mortalities per experimental series (n=5, except for series 5 and 6: n=4). Mean protection efficiencies for the medicated series are also given.

ΤΕΛΙΚΕΣ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΕΣ (FINAL MORTALITIES)			
Πειρ. Συνθήκες (Exp. Series)	Ελάχ.-Μεγ. (Min-Max)	Μέσος όρος (Average)	Προστασία επί τοις % (Protection efficiency %)
1	(0-5)	2%	-
2	(0-10)	2%	-
3	(15-55)	30%	-
4	(15-30)	25%	17,9
5	(35-55)	46,3%	-58,2
6	(0-20)	12,5%	62,5
7	(0-5)	2%	100,0
8	(5-25)	15%	53,6



Σχήμα 2. Ανάλυση LSD για τη στατιστική διαφοροποίηση των οκτώ συνθηκών της πειραματικής σειράς I (περιλαμβάνονται τα ημερήσια ποσοστά επιβίωσης, n=70, εκτός των συνθηκών 5 και 6, n=56).

Figure 2. LSD analysis for the statistical differentiation of the eight series tested in *experimental set I*. The data set comprises all the daily survival values, thus, for each series n=70, where as for series 5 and 6, n=56.

θήκες 4 και 6 διαφαίνεται μία ουσιαστική καθυστέρηση στην εμφάνιση των απωλειών (άξια λόγου θνησιμότητα παρατηρείται μόνο μετά από παρέλευση 9 ημερών από την ημέρα της μόλυνσης).

Η στατιστική ανάλυση LSD (Least Significant Difference) (Σχήμα 2) λαμβάνει υπόψη όλα τα δεδομένα αναφορικά με το βαθμό επιβίωσης καθ' όλη τη χρονική περίοδο του 14ήμερου πειραματισμού και όχι μόνο τον τελικό αριθμό. Υπ' αυτή τη λογική το σύνολο των 8 πειραματικών συνθηκών ομαδοποιείται ουσιαστικά σε 5 διαφορετικά στατιστικά ως ακολούθως: (1-2-7, 6, 4-8, 3, 5).

Το συμπέρασμα, το οποίο εξάγεται από την παραπάνω παρουσίαση σε σύγκριση με την προηγούμενη ανάλυση, είναι ότι διαφοροποιεί στατιστικά την πειραματική συνθήκη 6, ενώ ταυτόχρονα ομαδοποιεί τις συνθήκες 4 και 8. Έτσι, παρά το γεγονός ότι από τα αποτελέσματα τελικής θνησιμότητας συμπεραίνεται ποσοστό προστασίας 17,9% και 53,6% για τις συνθήκες 4 και 8 αντίστοιχα, όταν λαμβάνο-

Πειραματική Σειρά ΙΙ. (Experimental Set I

Πίνακας V. Μέσο, καθώς και ελάχιστο - μέγιστο τελικό ποσοστό θνησιμοτήτων για κάθε πειραματική συνθήκη (n=5, πλην της συνθήκης 5 και 6: n=4). Επίσης δίδεται το μέσο ποσοστό προστασίας στις συνθήκες που έλαβαν θεραπευτική αγωγή.

Table V. Average and minimal-maximal final percentile mortalities per experimental series (n=5, except for series 5 and 6: n=4). Mean protection efficiencies for the medicated series are also given.

ΤΕΛΙΚΕΣ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΕΣ (FINAL MORTALITIES)			
Πειρ. Συνθήκες (Exp. Series)	Ελάχ.-Μεγ. (Min-Max)	Μέσος όρος (Average)	Προστασία επί τοις % (Protection efficiency %)
1	(0-12,5)	3,7%	-
2	(37,5-62,5)	46,8%	-
3	(13,3-33,3)	20,0%	62,2
4	(46,7-73,3)	60,0	-30,6
5	(25,0-65,0)	40,0%	15,8
6	(25,0-65,0)	40,0%	15,8
7	(40,0-73,3)	61,3%	-33,6
8	(5,0-25,0)	15,0	73,8

νται υπόψη όλα τα δεδομένα στη στατιστική ανάλυση LSD δεν υφίσταται ουσιαστικά καμία διαφορά μεταξύ τους.

2. Πειραματική σειρά ΙΙ

Στον πίνακα V καταγράφονται οι τελικές θνησιμότητες των 8 διαφορετικών συνθηκών της πειραματικής σειράς ΙΙ καθώς επίσης και το μέσο ποσοστό προστασίας για τις συνθήκες εκείνες, που υπήρξε θεραπευτική παρέμβαση.

Στη συνθήκη 1 (ομάδα ιχθυδίων μάρτυρας, μη μόλυνση - μη θεραπεία) παρατηρήθηκε μία αμελητέα τελική θνησιμότητα της τάξεως του 3,7% οφειλόμενη κυρίως στους διάφορους χειρισμούς κατά τη μεταφορά των ψαριών από τα ενυδρεία ενοφθαλμισμού στους περιέκτες και χορήγησης της θεραπευτικής αγωγής.

Η θνησιμότητα που σημειώθηκε στη συνθήκη 2 (μόλυνση - μη θεραπεία) ανήλθε σε ποσοστό 46,8%, γεγονός που υποδηλώνει μία σαφέστατα μεγαλύτερη λοιμογόνο ικανότητα του ελληνικού στελέχους, σε σύγκριση με το γαλλικό, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική σειρά Ι. Η θνησιμότητα άρχισε να εγκαθίσταται δύο ημέρες μετά τη μόλυνση, ενώ κατά την εξέλιξη της λοίμωξης παρατηρούνται δύο φάσεις ανάπτυξης (Σχήμα 3).

α . μεταξύ των ημερών 2 και 9 μετά τη μόλυνση, ο δείκτης θνησιμότητας είναι υψηλός ανερχόμενος σε μέσο ποσοστό 6% ημερησίως, ενώ,

β. μεταξύ των ημερών 9 και 14 η θνησιμότητα είναι πολύ πιο χαμηλή και ανέρχεται σε ποσοστό 1% ημερησίως.

Αναφορικά με όλες τις υπόλοιπες συνθήκες της πειραματικής σειράς ΙΙ, στις οποίες υπήρξε χορήγηση αγωγής πριν ή και μετά τη μόλυνση με Vibrio, σημειώνονται οι κάτωθι παρατηρήσεις (Σχήμα 3).

i) η μεγαλύτερη θνησιμότητα παρατηρείται στις συνθήκες 4 και 7, στις οποίες χορηγήθηκε τροφή με αντιβιοτικό πριν από τη μόλυνση. Και στις δύο περιπτώσεις η παρατηρηθείσα θνησιμότητα ξεπέρασε κατά 30% τουλάχιστον τη θνησιμότητα της συνθήκης 2 (μόλυνση - μη θεραπεία). Επιπρόσθετα, η εξέλιξη της λοίμωξης ήταν πολύ γρήγορη με τους δείκτες θνησιμότητας να φθάνουν σε ποσοστά:

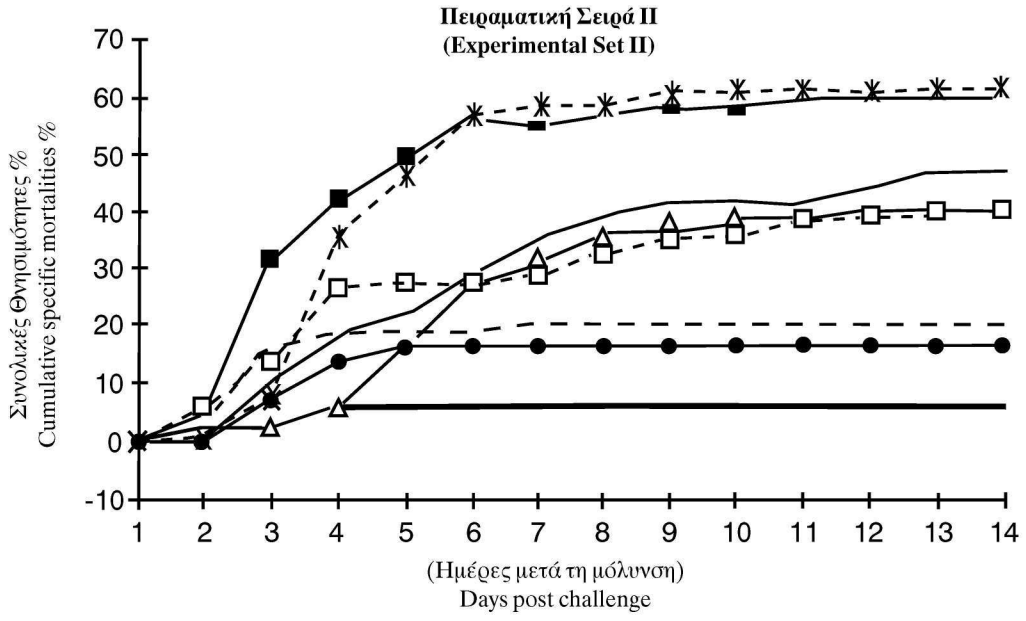
- 12,5% ημερησίως στη συνθήκη 4 (3 φαρμακευτικές δόσεις) και για χρονικό διάστημα μεταξύ 2ης και 6ης ημέρας.
- 16,5% ημερησίως στη συνθήκη 7 (6 φαρμακευτικές δόσεις) και για το χρονικό διάστημα μεταξύ 3ης και 6ης ημέρας.

Οι παραπάνω αναφερόμενες τιμές ημερήσιας θνησιμότητας αποκτούν ιδιαίτερη σημασία όταν συγκριθούν με εκείνη του 6% της συνθήκης 2.

ii) στις συνθήκες 5 και 6, στις οποίες χορηγήθηκε αγωγή μόνο μετά την πειραματική μόλυνση, επιτυγχάνεται ένα μέσο ποσοστό προστασίας ανερχόμενο μόλις στο 15,8%. Η χρονική εξέλιξη της θνησιμότητας μεταξύ των ημερών 2 και 6 μετά τη μόλυνση είναι διαφορετική στις δύο συνθήκες:

- στη συνθήκη 5 στην οποία χορηγείται θεραπεία αμέσως μετά τη μόλυνση παρατηρείται μία ελαφρά καθυστέρηση συγκρινόμενη με τη συνθήκη 6 στην οποία η πρώτη χορήγηση αγωγής λαμβάνει χώρα μετά παρέλευση 24 h.

iii) στις συνθήκες 3 και 8, στις οποίες υπήρξε χορήγηση TMP-SMX, τόσο πριν όσο και μετά την πειραματική μόλυνση, παρατηρήθηκαν τα καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα με επίπεδα προστασίας της τάξεως του 62,2% και του 73,8% αντίστοιχα. Επιπλέον στη συνθήκη 3 σημειώθηκε δραστική μείωση των θανάτων μετά την 4η ημέρα και απουσία νεκρών ιχθυδίων μετά την 7η ημέρα, ενώ στη συνθήκη 8 ο αριθμός των νεκρών ιχθυδίων μειώθηκε με-



Πειραματικές Συνθήκες Exp. Series	Days (Ημέρες) -3	-2	-1	0	1	2	3	Symbols (Συμβολισμοί)
1				Control				Series 1
2				C				Series 2
3			M	MMCMM	MM	MM	MM	Series 3
4			M	MMC				Series 4
5				CMM		M		Series 5
6				C	MM	MM	MM	Series 6
7	MM	MM	MM	C				Series 7
8	MM	MM	MM	C	MM	MM	MM	Series 8

Σχήμα 3. Εξέλιξη των ημερήσιων συνολικών θνησιμοτήτων κατά τη διάρκεια πειραματισμού 14 ημερών για τις οκτώ συνθήκες της πειραματικής σειράς II. Παράλληλα δίδονται και οι διάφορες θεραπείες για κάθε μία από τις διαφορετικές σειρές. C: μόλυνση, M: θεραπεία. Για περισσότερες λεπτομέρειες, ίδε Πίνακες II και III.

Figure 3. Evolution of daily cumulative mortalities during 14 days for the eight *experimental series of set II.* The specific treatments which received the different series, along with the respective symbols employed, are also indicated. C: challenge, M: medication. For further details, see Tables II and III.

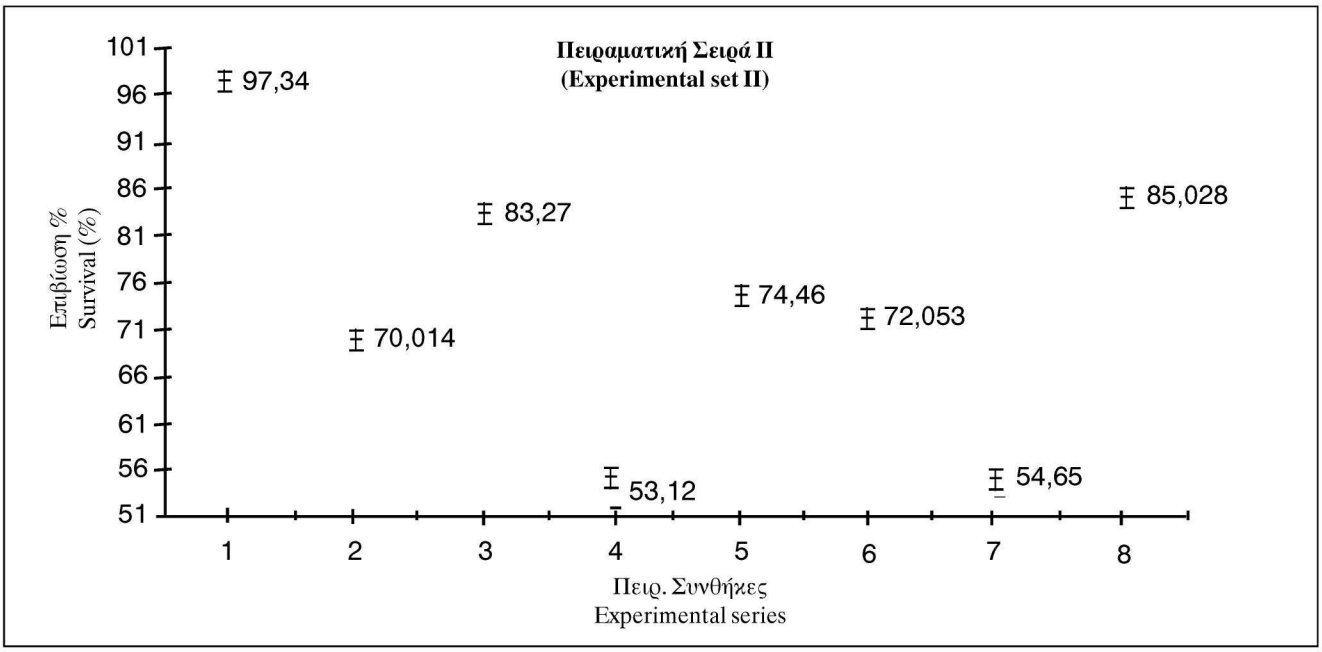
τά την 5η ημέρα και διακόπηκε εντελώς μετά την 8η. Παρατηρείται δηλαδή μια πλήρης εγκατάσταση της προστασίας μετά παρέλευση 7-8 ημερών από τη μόλυνση.

Η στατιστική ανάλυση LSD, στηριζόμενη στα δεδομένα επιβίωσης, διαφοροποιεί 4 στατιστικά επίπεδα (Σχήμα 4). Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τη γραφική παράσταση που αναφέρεται στις συνολικές θνησιμότητες σε σχέση με τις ημέρες μετά τη μόλυνση, που παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η επιλογή της διεξαγωγής του πειραματισμού με τη χρησιμοποίηση του *V. anguillarum* είναι ευνόητο ότι οφείλεται στο γεγονός ότι το παραπάνω μικροβιακό είδος αποτελεί το συνηθέστερα απαντών παθογόνο αίτιο και ένα από τα κυριότερα προβλήματα στη θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια. Επίσης αναφορικά με τη χρησιμοποίηση αντιμικροβιακών παραγόντων έγινε επιλογή του συνδυασμού Trimethoprim και Sulfamethoxazole (TMP + SMX) εξ αιτίας αφ' ενός μεν της γνωστής ευρέος φάσματος δραστικότητάς του έναντι παθογόνων Gram αρνητικών βακτηριδίων, αφ' ετέρου δε της περιορισμένης διαλυτότητός του στο θαλασσινό νερό.

Εκείνο, το οποίο αρχικά πρέπει να τονισθεί, είναι ότι



Σχήμα 4. Ανάλυση LSD για τη στατιστική διαφοροποίηση των οκτώ συνθηκών της πειραματικής σειράς II (περιλαμβάνονται τα ημερήσια ποσοστά επιβίωσης, n=70 εκτός των συνθηκών 5 και 6, n=56).

Figure 4. LSD analysis for the statistical differenciation of the eight series tested in *experimental set II.* The data set comprises all the daily survival values, thus for each series n=70, whereas for series 5 and 6 n=56.

τα αποτελέσματα για αμφότερες τις πειραματικές σειρές (I και II) καταδεικνύουν ανεπιφύλακτα ότι η θνησιμότητα η οφειλόμενη στις γενικότερα επικρατούσες πειραματικές "συνθήκες" (χειρισμός των ψαριών, ποιότητα νερού κ.ά.), ή προκαλούμενη από ενδεχόμενη τοξικότητα των χορηγηθέντων θεραπευτικών μέσων είναι αμελητέα.

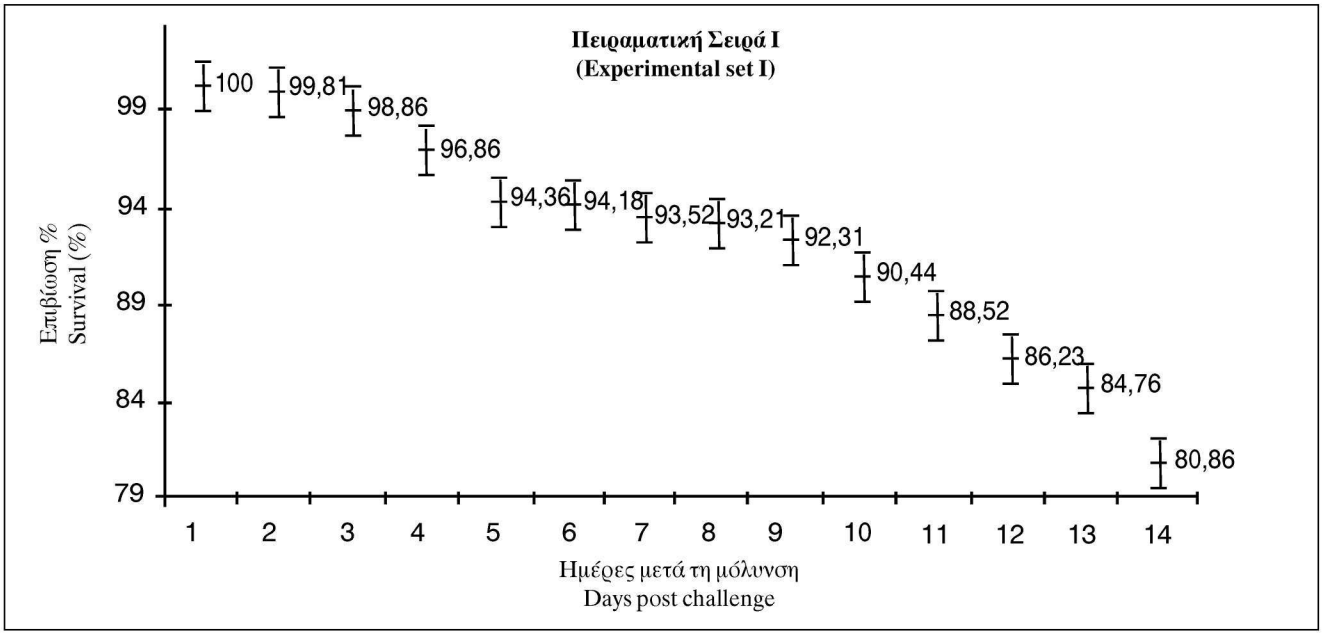
Η μεθοδολογία, η οποία χρησιμοποιήθηκε στις δύο πειραματικές σειρές, ήταν διαφορετική. Έτσι στη σειρά I όλες οι παρεμβάσεις, μόλυνση - χορήγηση αγωγής και διεξαγωγή του όλου πειραματισμού, έλαβαν χώρα στους ίδιους περιέκτες (tanks).

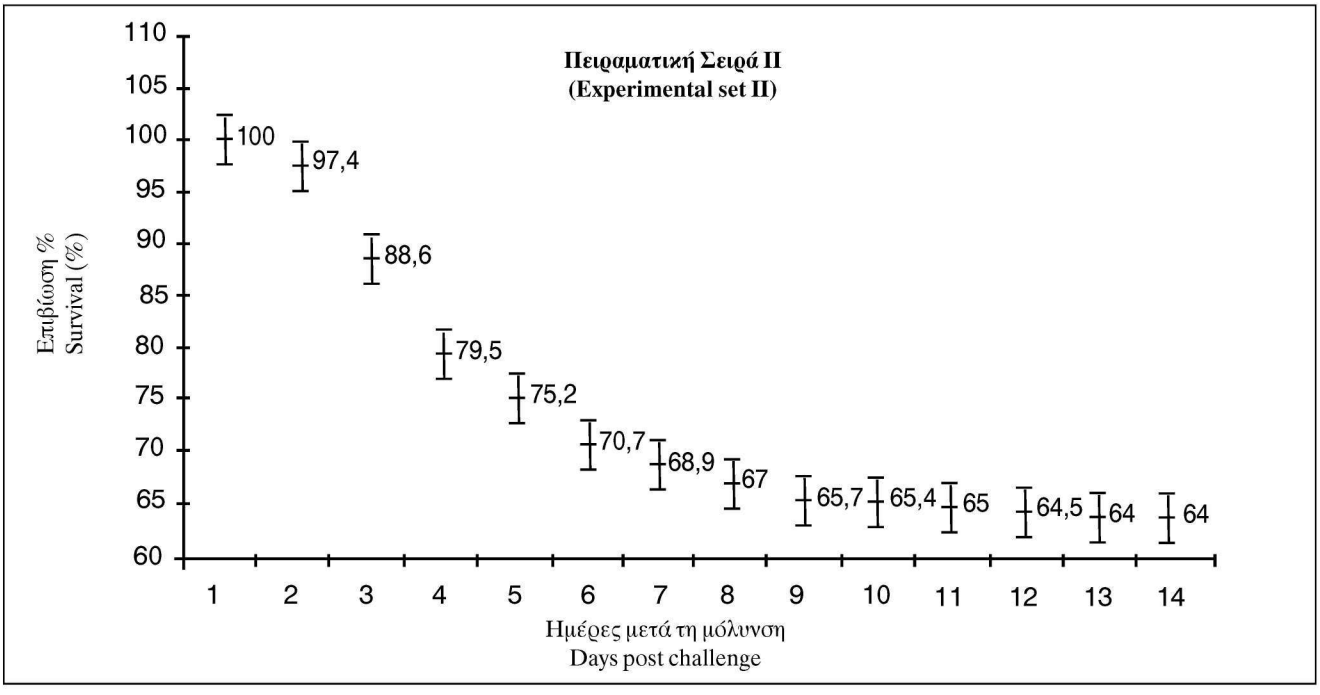
Αντίθετα, στη σειρά II, η μόλυνση και η χορήγηση αγωγής διαχωρίστηκαν μεταξύ τους με τρεις ενδιάμεσες διόδους των ιχθυδίων σε θαλασσινό νερό, ενώ γενικότερα ελήφθη μέριμνα διαχωρισμού της διαδικασίας της μόλυνσης από το σύνολο των υπολοίπων ενεργειών του πειραματισμού.

Οι παραπάνω επισημαινόμενες διαφορές είχαν σαφή επίδραση στα επίπεδα επιβίωσης σε σχέση με το χρόνο, τα οποία παρατηρήθηκαν στις δύο σειρές. Όταν λοιπόν όλα τα δεδομένα συσχετίζονται με το χρόνο, εκείνο το οποίο διαφαίνεται είναι ότι στη σειρά I παρατηρούνται φαινόμενα επαναμολύνσεως (πτώση του επιπέδου επιβίωσης άρα αύξηση της θνησιμότητας), τα οποία πιθανότατα οφείλονται σε εκ νέου πολλαπλασιασμό του *V. anguillarum* στο υδατικό περιβάλλον μετά την 8η ημέρα του πειραματισμού. Αντίθετα, στη σειρά II, μετά την 8η ημέρα, παρατηρείται μία αξιόλογη σταθερότητα και μία σαφής διακοπή στην αύξηση της θνησιμότητας, γεγονός το οποίο ανάγεται στο μονιμότερο χαρακτήρα των επιτευχθέντων θεραπευτικών αποτελεσμάτων (στατιστική ανάλυση LSD, Σχήμα 5).

Πέραν των ανωτέρω, εκείνο το οποίο πρέπει να τονισθεί ιδιαίτερα είναι ότι οι "συνθήκες" που επικρατούν στην πειραματική σειρά I, με τα χαρακτηριστικά της πολύ βραδείας ανανέωσης του νερού και της ως εκ τούτου μη δυνατότητος δραστικής μείωσης του βακτηριακού πληθυσμού, είναι σαφώς διαφορετικές από εκείνες της σειράς II. Στην τελευταία με το διαχωρισμό των παρεμβάσεων και τη μεταφορά των ψαριών μετά από 3 διόδους μέσω θαλασσινού νερού, οι δημιουργούμενες "συνθήκες" προσομοιάζουν κατά πολύ με εκείνες των μονάδων και των κλωβών όπου ο ρυθμός ανανέωσης του νερού είναι εν δυνάμει υπαρκτός και στην πραγματικότητα συνεχής.

Μία άλλη σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο πειραματικών σειρών (I και II) αναφέρεται στη δραστικότητα της λοίμωξης (θνησιμότητα 30% και 47% αντίστοιχα). Αποδεχόμενοι εκ των προτέρων ότι η διαφορά στο βάρος των ιχθυδίων δεν μπορεί να αποτελέσει την ειδοποιό αιτία αυτής της απόκλισης μετά από πειραματισμό 14 ημερών, θεωρείται ότι η πειραματική σειρά I αντιπροσωπεύει μία τυπική μέτρια λοίμωξη, σε αντίθεση με τη σειρά II





Σχήμα 5: Ανάλυση, LSD αναφορικά με τη χρονική εξέλιξη των ποσοστών επιβίωσης, λαμβανομένων υπ' όψη όλων των δεδομένων, ξεχωριστά για τις πειραματικές σειρές I και II.

Figure 5. LSD analysis for the evolution of survival with time, when all the available data are plotted separately for *experimental sets I and II*.

όπου η λοίμωξη είναι σαφώς σοβαρότερη.

Εκτιμώντας κριτικά τα συνολικά αποτελέσματα των σειρών I και II, τα πιο αξιοσημείωτα, τα οποία εξάγονται, στοιχειοθετούνται ως κάτωθι:

1. Επαναβεβαίωση της δυνατότητας εφαρμογής στην πράξη και της αποτελεσματικότητας της μεθόδου της βιοεγκύστωσης, ως ενός αξιόπιστου εναλλακτικού τρόπου χορήγησης θεραπευτικής αγωγής. Η συνεχώς εντεινόμενη ερευνητική δραστηριότητα διανοίγει ήδη νέους δρόμους τόσο για τη χορήγηση, δια του τρόπου αυτού, και υδατο-

διαλυτών φαρμακευτικών ιδιοσκευασμάτων, όσο και έναντι διαφόρων λοιμογόνων νοσημάτων, per os διενέργεια εμβολιασμών.

2. Η χορήγηση χημειοθεραπευτικής αγωγής **μόνο πριν** από τη βακτηριακή μόλυνση οδηγεί σε ουσιαστική αύξηση του δείκτη θνησιμότητας και σε σαφώς αντίθετα από τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Το γεγονός αυτό συνδέεται πιθανότατα με τη μαζική ανάπτυξη του ενοφθαλμισθέντος στελέχους *V.anguillarum* αμέσως μετά την πειραματική μόλυνση, με το δεδομένο της απουσίας άλλων πιθανά ανταγωνιστικών βακτηριακών πληθυσμών στο έντερο των ψαριών, η οποία απουσία με τη σειρά της οφείλεται στην ήδη, προ της πειραματικής μόλυνσης, χορηγηθείσα αγωγή.

3. Σε πολλές από τις λειτουργούσες μονάδες είναι γνωστή η πρακτική, η οποία εφαρμόζεται και η οποία συνίσταται στην ανα τακτά χρονικά διαστήματα και ανεξάρτητα από την ύπαρξη οιουδήποτε προβλήματος, αλόγιστη και ανεξέλεγκτη πολλές φορές χορήγηση αντιμικροβιακών παραγόντων. Η εκ των πραγμάτων εσφαλμένη αυτή φιλοσοφία της πρόληψης, πέραν των άλλων, φαίνεται να οδηγεί σε αντίθετα από τα προσδοκώμενα αποτελέσματα.

Στο σημείο αυτό δέον να υπογραμμισθεί ότι ταυτόχρονα πρέπει να συνυπολογισθούν και οι άλλες πιθανές αρνητικές προεκτάσεις, εξειδικευόμενες κυρίως στην ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών, το υψηλό οικονομικό κόστος παρέμβασης, την περιβαλλοντική υποβάθμιση, η οποία προκαλείται και, τέλος, τις δυσμενείς επιπτώσεις στη δημόσια υγεία με την παραγωγή και διοχέτευση στην αγορά προϊόντων που θα ενοχοποιούντο για την υψηλή περιέκτικότητά τους σε αντιβιοτικούς και γενικότερα χημειοθεραπευτικούς παράγοντες.

4. Η συχνή και επισταμένη παρακολούθηση του εκτρεφόμενου ιχθυοπληθυσμού, τόσο η κλινική με την ει δυνατόν ταχύτερη εντόπιση πιθανού προβλήματος όσο και η στηριζόμενη στην εργαστηριακή διερεύνηση του οιουδήποτε εμφανιζομένου νοσήματος, αποτελεί μαζί με την αυστηρή τήρηση των κανόνων υγιεινής το σημαντικότερο παράγοντα ελέγχου και έγκαιρης αντιμετώπισης αναλόγου φύσεως προβλημάτων

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Austin, B, D.A. Austin (1989). Bacterial Fish Pathogens: Diseases in farmed and wild fish. Ellis Horwood Limited.
2. Austin, B, D.A. Austin (1989). Methods for the microbiological examination of fish and shellfish. Ellis Horwood Limited.
3. Chair, M.,M. Rombhane, M. Dehasque, H. Nelis, A.P. De Leenheer, and P. Sorgeloos (1991). Live-food mediated drug delivery as a tool for disease treatment in larviculture. II. A case study with european seabass p. 412-414 In: Larvi '91 - Fish and Crustacean Larviculture Symposium. P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers, and F. Ollevier (Eds). European Aquaculture Society, Special Puplication No 15, Gent, Belgium. 427p.
4. Mourelatos, S., M. Touraki, H. Karamanlidou, S. Kalaitzopoulou, and C. Kastritsis (1996). Bioencapsulation of chemotherapeurics in Artemia as a mean of prevention and treatment of infectious diseases of marine fish fry, Aquacultural Engineering 15: 133-147.
5. Touraki, M., P. Rigas, P. Pergantas, Th. Abatzopoulos. Optimizing bioencapsulation of the antibiotics Trimethoprim and Sulfamethoxazole in Artemia nauplii. P. 415-417. In: Larvi 91 - Fish and Crustecean Larviculture Symposium. P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Ollevier (Eds). European Aquaculture Society, Special puplication No 15, Chent, Belgium, 427p.
6. Verpeaet, R., M. Chair, H. Nelis, P. Sorgeloos, and A.P. De Leenheer (1992). Live - food mediated drug delivery as a tool for disease treatment in larviculture. The enrichment of therapeutics in rotifers and Artemia nauplii. Aquacult. Eng.,11:133-139.