



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Υδατοκαλλιέργειες» -

«Παθολογικά Προβλήματα Εκτρεφόμενων Υδρόβιων Οργανισμών»

ΣΕ ΣΥΜΠΡΑΞΗ ΜΕ ΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ-ΑΛΙΕΙΑΣ ΤΟΥ Τ.Ε.Ι. ΗΠΕΙΡΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

“Απορρόφηση αντιβιοτικών (αντιβακτηριακών ουσιών)(φλουμεκίνης) στην τσιπούρα (*Sparus aurata* L.) μέσω εμβάπτισης”

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ

Ελένη Π. Χρυσανθάκη

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Δρ. Γεώργιος Γ. Ρήγος

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2011



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

POSTGRADUATE STUDIES PROGRAM

“Aquaculture” – “Aquatic Animal Health”

***IN COLLABORATION WITH
THE DEPARTMENT OF AQUACULTURE & FISHERIES, TEI OF EPIRUS***

Thesis:

**“Absorption of antibiotics (antibacterial agents) (flumequine) in
sea bream (*Sparus aurata* L.) by bath treatment”**

POSTGRADUATE STUDENT

Eleni P.Chrysanthaki

SUPERVISOR

Dr. Georgios G. Rigos

KARDITSA 2011

*Στο "Χρυσάνθο", τη "Μαφία" και
στους "γονείς" που τόσο με περιβάλλουν...*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε η απορρόφηση της φλουμεκίνης (FLU) στην τσιπούρα (*Sparus aurata* L.), μετά από την εμφάνιση των ψαριών σε διάλυμα της ουσίας το οποίο χορηγήθηκε στο νερό των πειραματικών δεξαμενών, όπου προσαρμόστηκαν τα ψάρια. Στη συνέχεια, παρατίθενται τα αποτελέσματα που πήραμε μετά τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων της ουσίας στο πλάσμα, σε συνάρτηση με τη διάρκεια (χρόνο) εμφάνισης.

Η δειγματοληψία (αιμοληψίες), η επεξεργασία των δειγμάτων και η προετοιμασία τους για τη χρωματογραφική ανάλυση, πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Υδατοκαλλιεργειών του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών στον Άγιο Κοσμά.

Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν δεξαμενές χωρητικότητας 800 L και 70 τσιπούρες βάρους 300-350 gr. Η θερμοκρασία του θαλασσινού νερού κατά την εκτέλεση του πειράματος ήταν 14-15 °C. Η φλουμεκίνη διαλύθηκε πρώτα σε διάλυμα NaOH 0.025M και στην συνέχεια διαλύθηκε στο θαλασσινό νερό των πειραματικών δεξαμενών, όπου ήδη βρίσκονταν τα ψάρια για 48 h (χρόνος προσαρμογής). Ακολούθησαν οι δειγματοληψίες σε ομάδες των τεσσάρων ψαριών ανά δείγμα και για κάθε προκαθορισμένη χρονική στιγμή των 2, 4, 6, 8, 24 και 48 h από τα οποία παραλήφθηκε δείγμα αίματος που στάλθηκαν για ανάλυση στο εργαστήριο. Από την υδροχρωματογραφική ανάλυση του πλάσματος του αίματος, λάβαμε αποτελέσματα, οι μέσες τιμές των οποίων κυμάνθηκαν από 0.2, έως 1.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ πλάσματος.

SUMMARY

The following thesis investigates the absorption of flumequine (FLU) in sea bream (*Sparus aurata* L.), after its bath treatment in a solution of flumequine, which has been added to the water of experimental tanks, where the fish were adapted. Below are the results obtained after calculating the concentrations of the above agent in the plasma of the fish, in relation to the duration (time) of their bath treatment.

The sampling (blood sampling), the processing of the samples as well as their preparation for the chromatographic analysis, were conducted in the Institute of Aquaculture of the Hellenic Centre for Marine Research, Agios Kosmas.

Tanks 800 L water and 70 breams weighing 300-350 gr each, were used for the needs of the experiment. While performing the experiment, the temperature of the seawater was 14-15 ° C. At first the flumequine was dissolved in a solution of NaOH 0.025 M and then in seawater, in the experimental tanks, where the fish had already been put for 48 h (adaptation period). Afterwards the samples in groups of four fish per sample for each predetermined time of 2, 4, 6, 8, 24 and 48 h of which a blood sample was taken and sent for analysis in the laboratory. From ydrochromatografiki analysis of blood plasma, we have results, the mean values ranging from 0.2 to 1.05 mg / mL plasma.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γεώργιο Ρήγο, Ερευνητή του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών, για την καθοδήγηση του στην εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης τον κ. Αθανάσιο Τυρπένου, Υγειονολόγο τροφίμων, για την αξιολόγηση του και τις εύστοχες όσο και χρήσιμες παρατηρήσεις του ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής.

Επίσης ευχαριστώ τον κ. Ιωάννη Παππά, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη συμβολή του ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής.

Αισθάνομαι επίσης την ανάγκη να ευχαριστήσω ξεχωριστά τους δικούς μου ανθρώπους. Την οικογένεια μου και ιδιαίτερα τους γονείς μου, τον "πατερούλη" αλλά και τον καλό μου φίλο Κώστα, για την ηθική και έμπρακτη συμπαράσταση που πάντα μου προσφέρουν και για όλα όσα μοιραζόμαστε.

Ελένη Π. Χρυσανθάκη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Εκτροφή ψαριών και νοσήματα.....	13
1.1.1 Αναφορά στα σημαντικότερα νοσήματα της τσιπούρας (<i>Sparus aurata</i> L.).....	15
1.1.2 Παθογόνα βακτήρια των ψαριών.....	17
1.2 Φάρμακα στις εκτροφές ψαριών.....	18
1.2.1 Αντιβιοτικά.....	23
1.2.2 Επιπτώσεις απο τη χρήση αντιβιοτικών στις εκτροφές ψαριών.....	27
1.2.3 Κινολόνες και φθοροκινολόνες.....	34
1.2.4 Φλουμεκίνη.....	38
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	41
2.1 Βιολογικός πειραματισμός.....	41
2.2 Πρώτο στάδιο.....	42
2.2.1 Δειγματοληψία.....	42
2.2.2 Επεξεργασία των δειγμάτων.....	43
2.3 Δεύτερο στάδιο.....	45
2.3.1 Εκχύλιση των δειγμάτων και χρωματογραφική ανάλυση.....	45

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	52
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	55
5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	60

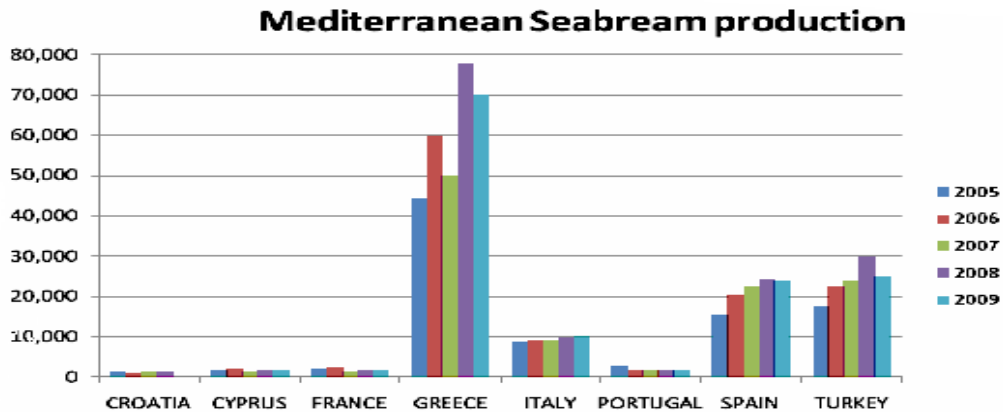
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η χώρα μας παρουσιάζει ιδανικές γεωμορφολογικές, υδρολογικές και κλιματολογικές συνθήκες για τη θαλάσσια ιχθυοτροφία. Μεγάλη έκταση ακτών, βαθιά νερά και υποθαλάσσια ρεύματα κοντά στην ακτή, καθαρές θάλασσες, θερμοκρασία νερών 26-28°C το καλοκαίρι και 14-16°C το χειμώνα (Κουσουρής; Φώτης & Κονίδης, 1995; Ψάλλας, 1997). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ευνοϊκό χρηματοδοτικό περιβάλλον που δημιουργήθηκε από τις κοινοτικές και εθνικές αρχές, έδωσαν την ώθηση που χρειαζόταν ο κλάδος (ΣΕΘ, 2011).

Είναι γεγονός ότι η Ελλάδα κατέχει την πρώτη θέση στην παραγωγή ευρύαλων ψαριών, κυρίως τσιπούρας και λαυρακιού, ανάμεσα στις χώρες της Μεσογειακής λεκάνης και της Ε.Ε. Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι, μεταξύ των χωρών της Μεσογειακής λεκάνης, το 2008 η Ελλάδα με παραγωγή 450 εκ. ιχθυδίων απέσπασε το 41% της συνολικής παραγωγής γόνου και με παραγωγή 120.000 τόνους τσιπούρας και λαβρακιού, το 50% περίπου της παραγωγής αυτών των ειδών ψαριών (ΣΕΘ, 2011).

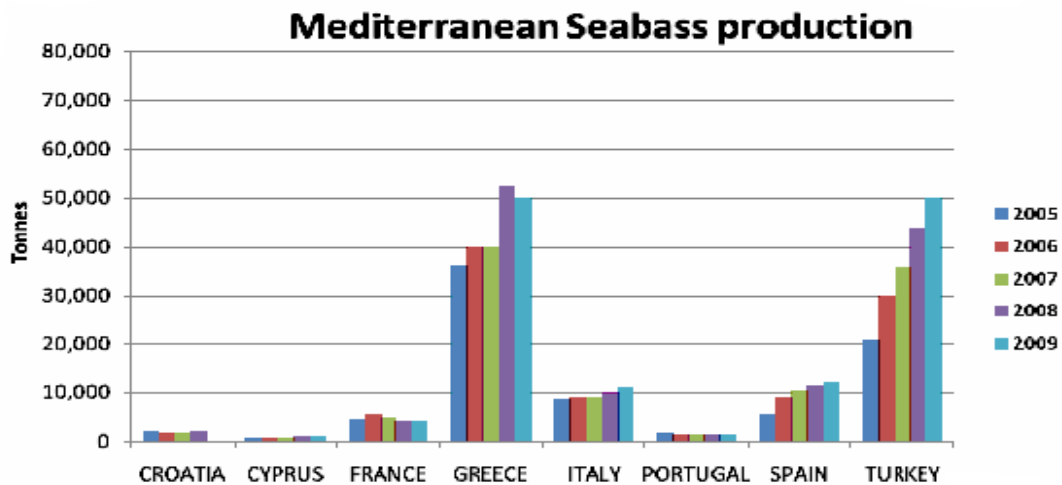
Η συστηματική εκτροφή ευρύαλων ψαριών στην Ελλάδα ξεκίνησε το 1982 με την ίδρυση της πρώτης μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας, όμως ο κλάδος άρχισε να εξελίσσεται από το 1986 και ύστερα, με τη λειτουργία των πρώτων 12 μονάδων εκτροφής. Από το σημείο αυτό έως σήμερα, παρατηρήθηκε αλματώδης ανάπτυξη του κλάδου (Αποστολόπουλος, 1994).

Παραγωγή τσιπούρας ανά χώρα (2005-2009).



Πηγή: Lara Barazi-Γερουλάνου, (2010) – Αναφορά CFCMF F.A.O, (ΣΕΘ, 2011).

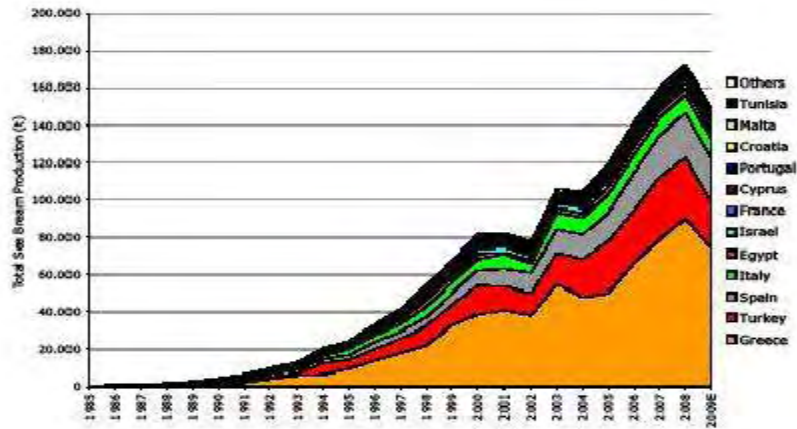
Παραγωγή λαυρακιού ανά χώρα (2005-2009).



Πηγή: Lara Barazi-Γερουλάνου, (2010) – Αναφορά CFCMF F.A.O,

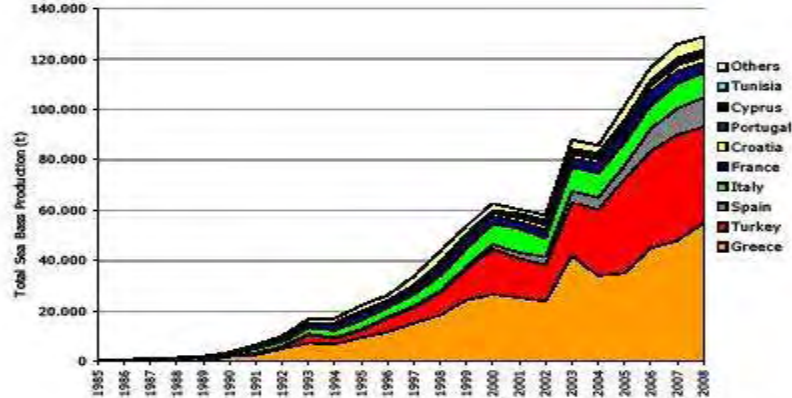
(ΣΕΘ, 2011).

Εξέλιξη της παραγωγής τσιπούρας στην Ε.Ε.(1985-2009).



Πηγή: (ΣΕΘ, 2011).

Εξέλιξη της παραγωγής λαυρακιού στην Ε.Ε. (1985-2009).



Πηγή: (ΣΕΘ, 2011).

Οι σημαντικότερες αιτίες της εντυπωσιακής αυτής ανάπτυξης του κλάδου στην Ελλάδα, αλλά και σε παγκόσμια κλίμακα είναι:

- Η διαφαινόμενη αδυναμία της φυτικής και ζωϊκής παραγωγής να καλύψουν τις ανάγκες σε τρόφιμα του παγκόσμιου πληθυσμού που αυξάνεται με γοργούς ρυθμούς.
- Η βαθμιαία μείωση της προσφοράς αλιευμάτων που προέρχονται από τη συλλεκτική και ελεύθερη αλιεία των θαλασσών και των εσωτερικών νερών (λιμνών, ποταμών), λόγω της υπεραλίευσης ή και της περιβαλλοντικής υποβάθμισης των βιοτόπων τους.
- Η συνεχής αύξηση της ζήτησης σε αλιεύματα λόγω του προτύπου υγιεινής διατροφής, που προβάλλεται σε πολλές οικονομικά αναπτυγμένες χώρες, στις απαιτήσεις του οποίου ανταποκρίνονται τα διαιτητικά χαρακτηριστικά των ψαριών (πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας, μεγάλη περιεκτικότητα σε ακόρεστα λιπαρά οξέα

κυρίως της σειράς ω-3 και χαμηλό ενεργειακό περιεχόμενο) (Hanson et al., 1994; Γραβινιώτης, 1997).

Όμως η εντατικοποίηση της εκτροφής των ψαριών, η οποία σημειώθηκε τα τελευταία χρόνια, συνοδεύθηκε και με ένα προβληματισμό για ζητήματα όπως είναι η διασφάλιση της ευζωίας των ψαριών εκτροφής. Παράλληλα, ως φυσικό επακόλουθο της εντατικοποίησης αυτής, εμφανίστηκαν διάφορα προβλήματα παθολογίας στις εκτροφές με ζημιογόνες οικονομικά επιπτώσεις για τις ιχθυοκαλλιεργητικές επιχειρήσεις, λόγω όχι μόνο του θανάτου των ψαριών, αλλά και του αυξημένου κόστους τόσο για την πρόληψη, όσο και την αντιμετώπιση των ασθενειών (Jacobsen & Berglund 1988; Samuelsen, 1993).

1.1 Εκτροφή ψαριών και νοσήματα.

Σε κάθε σύστημα εκτροφής, αφού επιτευχθεί η εμπορική αναπαραγωγή ενός είδους, η αυξητική πορεία της παραγωγής πολύ γρήγορα ανακόπτεται από παθογόνους οργανισμούς, που αρχικά μπορεί να είναι παράσιτα και κατόπιν βακτήρια και ιοί. Οι περισσότεροι από αυτούς προϋπάρχουν στο περιβάλλον και είτε η μολυσματική τους ικανότητα είναι περιορισμένη, είτε απαιτούν την εντατικοποίηση ώστε να εμφανιστούν (Αθανασοπούλου, 2008).

Ο συνωστισμός των ψαριών, αλλά και άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες, μαζί με τους χειρισμούς που εφαρμόζονται στις εκτροφές των ψαριών, λειτουργούν επιβαρυντικά στα εκτρεφόμενα ψάρια, προκαλώντας αναπόφευκτα στρές. Οι ανοσολογικές και οι φυσιολογικές διαταραχές των

ψαριών εκφράζονται με καταπόνηση και τα ψάρια γίνονται πιο ευάλωτα στην εκδήλωση κάποιας νόσου. Οι μοναδικά, ιδιαίτερες καταστάσεις, οι οποίες σημειώνονται στις εκτροφές των ψαριών, όπως είναι η αυξημένη ιχθυοπυκνότητα ανά μονάδα όγκου του νερού, έχουν ως αποτέλεσμα τη συχνότερη εκδήλωση νόσων και την ταχύτερη μετάδοση τους, σε σχέση με το χρόνο που θα σημειώνονταν στην ελεύθερη διαβίωση (Ruiter, 1996).

Στην Ελλάδα, η εκτροφή της τσιπούρας και του λαυρακιού είναι εντατική και οδήγησε στην εκδήλωση σοβαρών παθολογικών καταστάσεων, με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται υψηλός δείκτης θνησιμότητας με οικονομικές επιπτώσεις στις αποδόσεις (Φώτης & Αγγελίδης, 2001).

Τα νοσήματα των ψαριών χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τα νοσήματα μη μολυσματικού χαρακτήρα και αυτά με μολυσματικό χαρακτήρα. Τα νοσήματα μη μολυσματικού χαρακτήρα οφείλονται σε:

- λανθασμένη διατροφή
- σε νεοπλάσματα
- σε παράγοντες του περιβάλλοντος διαβίωσης
- στο σύνδρομο προσαρμογής κ.α. (Samuelsen, 1993).

Γενικά, τα νοσήματα μολυσματικού χαρακτήρα οφείλονται σε:

- ιούς
- μύκητες

- βακτήρια
- παράσιτα (Christofilogiannis, 1993; Φώτης, 1999).

1.1.1 Αναφορά στα σημαντικότερα νοσήματα που έχουν αναφερθεί για την τσιπούρα (*Sparus aurata* L.) στην Ελλάδα και γενικότερα στη Μεσογειακή λεκάνη.

1. Ιογενή νοσήματα:

- Οικογένεια *Iridoviridae*: Λεμφοκύστη (*Iridovirus*)

2. Βακτηριακά νοσήματα:

- Δονακίωση (*Vibrio anguillarum* ή *Listonella anguillarum*)
- Παστερέλλωση (*Photobacterium damsela* var *piscicida*)
- Προσβολή απο *Aeromonas spp*
- Προσβολή απο *Pseudomonas spp.*
- Προσβολή απο *Flexibacter spp.*

3. Παρασιτώσεις:

Ενδοπαρασιτώσεις:

- Κοκκίδια: Προσβολή απο *Eimeria spp.*
- Μυξοσπορίδια: Προσβολή απο *Myxidium leei*,
Προσβολή απο *Ceratomyxa spp.*
Προσβολή απο *Kudoa spp.*
Προσβολή απο *Leptotheca spp.*
- Μικροσπορίδια: Προσβολή απο *Clugea spp.*

Εξωπαρασιτώσεις:

- Μαστιγοφόρα πρωτόζωα: Προσβολή απο *Amyloodinium ocellatum*,
Προσβολή απο *Ichtyobodo spp.*
- Αμοιβάδες: Προσβολή απο *Paramoeba spp.*
- Βλεφαριδοφόρα πρωτόζωα: Προσβολή απο *Cryptocaryon irritans*
Προσβολή απο *Trichodina spp.*
- Μονογενή τρηματώδη: Προσβολή απο *Dactylogyrus spp.*
Προσβολή απο *Furnestia echeneis*
Προσβολή απο *Microcotyle chrysophrii*
- Αρθρόποδα: Προσβολή απο *Caligus minimus*
Προσβολή απο *Ceratothoa oestroides*
Προσβολή απο *Ergasilus spp*
Προσβολή απο *Lernanthropus kryoneri*

(Athanasopoulou, 1992, 1999, 2002; Alvarez-Pellitero et al., 1995; Cristophilogiannis, 1993; Colorni, 1998; Rodgers & Furones, 1998; Βαρβαρίγγος, 1999; Φώτης και Αγγελίδης, 2001; Zorrila et al., 2003; Βαγιάνου και συν., 2004; Κυρκούδης, 2006).

1.1.2 Παθογόνα βακτήρια των ψαριών.

Τα περισσότερα από τα παθογόνα βακτήρια των ψαριών είναι ευκαιριακά παθογόνα και προκαλούν παθολογικές καταστάσεις όταν συνδυάζονται κακές συνθήκες εκτροφής, με ευπαθείς οργανισμούς (Αθανασοπούλου, 2008). Έτσι ως δυνητικά παθογόνα, τα περισσότερα βακτήρια δεν προκαλούν παθολογικές καταστάσεις, αν η υγιεινή κατάσταση είναι καλή. Αν όμως τα ψάρια υποστούν καταπόνηση από παράγοντες όπως είναι η έλλειψη οξυγόνου, η αλλαγή της θερμοκρασίας, η αλλαγή του pH, η αύξηση της ιχθυοπυκνότητας, ή από τραυματισμούς και από μεταφορά, τότε κάμπτεται η άμυνα του οργανισμού των ψαριών και προκαλούν σοβαρές παθολογικές καταστάσεις (Μπιτχαβά, 2009).

Οι βακτηριακές μολύνσεις ξεκινούν είτε από την προσκόληση των βακτηρίων στα βράγχια, είτε στη βλέννα του δέρματος των ψαριών. Έχει αποδειχθεί ότι η βλέννα σε συνδυασμό με την υψηλή αλατότητα 35‰ και pH 8.1 αποτελούν ευνοϊκές συνθήκες για την προσκόληση και την ανάπτυξη των παθογόνων βακτηρίων στην τσιπούρα (Balebona, 1998).

Τα περισσότερα παθογόνα βακτήρια των ψαριών είναι αναερόβια ή προαιρετικά αναερόβια, κινητά, οξειδάση + και Gramm αρνητικά (Μπιτχαβά, 2009).

Στον πίνακα που ακολουθεί γίνεται σύνοψη των σημαντικών βακτηριακών νοσημάτων που πλήττουν τις καλλιέργειες ψαριών στη Μεσόγειο.

ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	ΕΥΑΙΣΘΗΤΑ ΕΙΔΗ ΨΑΡΙΩΝ
<i>Vibrio anguillarum</i> serotype 1b	D. labrax, S.aurata
<i>V. anguillarum</i> serotype 3	D. labrax
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. piscicida (formely Pausterella)	S. aurata, D. labrax, D. puntazzo, D. dentex
<i>V. alginolyticus</i>	D. labrax, S. aurata, D. puntazzo, D. dentex
<i>V. damsela</i>	D. labrax, P. puntazzo, S. aurata, D. dentex
<i>V. fluvialis</i>	D. labrax
<i>V. ordalii</i>	D. labrax
<i>V. splendidus</i>	S. aurata, D. puntazzo
<i>V. vulnificus</i>	D. puntazzo
<i>V. harveyi</i>	D. labrax, S. aurata, D. dentex
<i>Aeromonas hydrophila</i>	D. labrax, D. puntazzo
<i>Aeromonas</i> spp.	S. aurata
<i>Staphylococcus epidermatitis</i>	D. puntazzo
<i>Pseudomonas</i> spp.	S. aurata, D. labrax
<i>Flexibacter maritimus</i>	D. labrax
Cytophaga-like bacteria	S. aurata, D. labrax

Πηγή: Christophilogiannis et al. (1997a), Babelona et al. (1998), Doukas et al. (1998), Rigos et al. (1998), Athanassopoulou et al. (1999), Company et al. (1999), Le-Breton (1999), Zorrilla et al. (2003). Rigos & Troisi (2005)

1.2 Φάρμακα στις εκτροφές ψαριών.

Φάρμακο ονομάζεται κάθε ουσία που χρησιμοποιείται εντός και επί των ψαριών για την παρεμπόδιση, τον έλεγχο ή τον περιορισμό μιας νόσου, μιας διαταραχής ή κάποιου συμπτώματος (Stephen & Iwama, 1998).

Στα εκτρεφόμενα ψάρια χορηγούνται θεραπευτικές αγωγές οι οποίες διακρίνονται σε αντιπαρασιτικές και αντιμικροβιακές. Ως μέτρα ειδικής και μη ειδικής πρόληψης των νόσων των ψαριών, γίνεται χρήση εμβολίων και ανοσοενισχυτικών (Αθανασοπούλου, 2008). Επίσης η χρήση αναισθητικών ουσιών στα εκτρεφόμενα ψάρια είναι απαραίτητη, για την πραγματοποίηση ζωοτεχνικών καθώς και κτηνιατρικών χειρισμών (Γαλάτος, 2009).

Διεθνώς στην εκτροφή ψαριών λίγες χημικές ουσίες, από αυτές που χρησιμοποιούνται, είναι επίσημα εγκεκριμένες για τη χρήση τους στα ψάρια. Αυτό το δεδομένο οφείλεται στο γεγονός ότι τα τοξικολογικά δεδομένα δεν επαρκούν και απαιτούνται περισσότερα στοιχεία για την έγκριση της κυκλοφορίας τους (Ruiter et al., 1996).

Η χορήγηση των φαρμάκων στα εκτρεφόμενα ψάρια γίνεται με τις εξής μεθόδους χορήγησης:

1. Χορήγηση μέσω της ιχθυοτροφής: Αποτελεί τον συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο τρόπο χορήγησης φαρμάκων στα ψάρια. Εφαρμόζεται με την ενσωμάτωση των φαρμάκων στην ιχθυοτροφή, είτε σε ειδικές εγκαταστάσεις (feed mill), είτε επικαλύπτονται τα σύμπηκτα (pellets). Η από του στόματος χορήγηση των φαρμάκων στα ψάρια συντελείται λαμβάνοντας υπόψη τη ποσότητα τροφής στη βιομάζα, δηλαδή στο συνολικό βάρος των ψαριών και την ενσωμάτωση του φαρμάκου σε αυτή σε

ποσοστό ανάλογο. Αν και το σχήμα αυτό αποτελεί γενικά το πρότυπο, το ποσοστό αυτό και η αναλογία μπορούν να διαφοροποιηθούν. Γνωρίζοντας την ποσότητα της τροφής που πρέπει να καταναλωθεί ανά ημέρα και τη βιομάζα, μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα του φαρμάκου, η οποία αντιστοιχεί να προστεθεί ανά χιλιόγραμμο της τροφής. Η ποσότητα της χορηγούμενης τροφής στη βιομάζα κυμαίνεται από 0,5% έως 1%. Η χρονική διάρκεια της χορήγησης θεραπευτικής αγωγής διαφοροποιείται από χώρα σε χώρα, όμως συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 5 και 14 ημερών (Schneider, 1994). Μερικά από τα κυριότερα αίτια που οδηγούν σε αποτυχία αυτής της μεθόδου χορήγησης είναι τα ακόλουθα:

- Η λανθασμένη επιλογή αντιβιοτικού και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας.
- Η χαμηλή χορηγούμενη δοσολογία.
- Η ανεπαρκής δοσολογία ανάμειξης του αντιβιοτικού στην τροφή, η οποία οδηγεί σε ανομοιογενή κατανομή του στον ιχθυοπληθυσμό και η λήψη μικρότερης ποσότητας, από την επιβαλλόμενη, από πολλά ψάρια.
- Η μείωση της όρεξης, λόγω της εκδήλωσης της ασθένειας, της χαμηλής θερμοκρασίας ή λόγω καθυστέρησης της διάγνωσης (Αθανασοπούλου, 2008).

2. Χορήγηση μέσω λουτρών (εμβάπτιση): Εφαρμόζονται κυρίως για τη θεραπεία των εξωτερικών παρασιτώσεων των ψαριών, των νοσημάτων που

οφείλονται σε βακτήρια καθώς και σε ιούς, για την αποτροπή των πιθανών επιμολύνσεων (Schneider, 1994). Η μέθοδος αυτή υποδιαιρείται στις ακόλουθες μορφές:

- Μπάνιο: Εμβάπτιση σε σταθερό διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης για 30 έως 60 λεπτά.
- Παρατεταμμένη εμβάπτιση: Εμβάπτιση σε διάλυμα πολύ μικρής πυκνότητας για χρονικό διάστημα πάνω από 12 ώρες.
- Σύντομη εμβάπτιση: Εμβάπτιση σε υψηλής πυκνότητας διάλυμα για 1-5 λεπτά.
- Έκχυση: Μικρή ποσότητα στερεής χημικής ουσίας τοποθετείται στην είσοδο της παροχής του νερού, για διάλυση της με τη ροή του νερού.
- Θεραπεία ροής: Σταθερός όγκος διαλύματος χημικής ουσίας προστίθεται στην είσοδο της παροχής του νερού, σε τακτά χρονικά διαστήματα, ώστε να επιτυγχάνεται η απαιτούμενη συγκέντρωση (Αθανασοπούλου, 2008).

3. Ενέσιμη χορήγηση: Η ενέσιμη χορήγηση αποτελεί το μέσο χορήγησης των αντιβιοτικών καθώς και των εμβολίων, με σκοπό τον έλεγχο των νόσων στους γεννήτορες και την ανοσοποίηση των νεαρών ψαριών. Με τον ενέσιμο τρόπο χορήγησης ενός φαρμάκου, το μεγαλύτερο ποσοστό των

φαρμάκων παραμένει στον οργανισμό του ψαριού και μειώνεται η πιθανότητα να εισέλθουν στο περιβάλλον. Η ενέσιμη χορήγηση είναι η καταλληλότερη μέθοδος χορήγησης των φαρμάκων στα ψάρια, όμως σε αυτά τα στάδια της ανάπτυξης τους, είναι πιθανόν είτε να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα, είτε να διατεθούν για ανθρώπινη κατανάλωση, πριν το μεταβολισμό και τη πλήρη απέκκριση των φαρμάκων από τον οργανισμό τους. Επίσης η χειρονακτική εργασία που απαιτείται και η καταπόνηση που προκαλεί η μέθοδος στα ψάρια, περιορίζουν την εφαρμογή της μεθόδου (Schneider, 1994).

Στον πίνακα που ακολουθεί συνοψίζονται τα σκευάσματα των αντιβιοτικών τα οποία χορηγούνται στις εκτροφές ψαριών, οι δραστικές τους ουσίες, καθώς και οι παράμετροι της χορήγησης τους.

ΔΡΑΣΤΙΚΗ ΟΥΣΙΑ	ΕΜΠΟΡΙΚΟ ΣΚΕΥΑΣΜΑ	ΔΟΣΗ+	ΤΡΟΠΟΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ ΑΝΑΜΟΝΗΣ*
Τετρακυκλίνες	Tetraplex, Oxyvet terramycin	75-100mg/kg ΣΒ	Per os εμβάπτιση	7-10 ημέρες	400 βαθμοημέρες
Σουλφοναμίδες**	Sulphatrim	30mg/kg ΣΒ	Per os/	7 ημέρες	500 βαθμοημέρες
Ενισχ. Σουλφοναμίδες**	Tribrissen, optiprim	30mg/kg ΣΒ	Per os	7 ημέρες	500 βαθμοημέρες
Φλουμεκίνη	Flumix	8-30mg/kg ΣΒ	Per os / εμβάπτιση	7 ημέρες	-
Οξολινικό οξύ	Aqualinic, Aquinox, inoxyl	10-30mg /kg ΣΒ	Per os/ εμβάπτιση	7 ημέρες	5000 βαθμοημέρες
Αμοξυκιλλίνη	paracillin	80mg /kg ΣΒ 40-80 mg /kg ΣΒ	IM	7-10 ημέρες	Μόνο σε γεννήτορες

			Per os		
Μακρολίδια (Ερυθρομυκίνη)	Erytώραomycin		Per os	7-15 μέρες	
Ενροφλοξασίνη	Baytril				

**Salmonidae*, + η μεγαλύτερη δόση σε θαλασσινά ψάρια

** στα θαλασσινά ψάρια η παρατεταμένη χρήση προκαλεί κρυστάλλους στα νεφρά.

Πηγή: (Costello et al., 2001)

1.2.1 Αντιβιοτικά.

Γενικότερα, ως αντιβιοτικά ορίζονται οι χημικές ενώσεις που παρεμποδίζουν ή αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, μύκητες και πρωτόζωα. Ο αρχικός όρος περιλαμβάνει οποιαδήποτε ουσία έχει βιολογική δράση έναντι των ζωντανών οργανισμών όμως ο όρος πλέον χρησιμοποιείται για ουσίες που έχουν δράση αντιβακτηριακή, αντι-μυκητιακή και αντι-παρασιτική (Χριστοδούλου, 2008).

Ταξινομούνται με βάση:

1. Την προέλευση τους:

- Φυσικά: Χημικές ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς, συνήθως βακτήρια και μύκητες, και παρεμποδίζουν ή αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων. Για παράδειγμα, η ομάδα της πενικιλίνης που παράγεται από τους μύκητες του γένους *Penicillium* ή η στρεπτομυκίνη που προέρχεται από τα βακτήρια του γένους *Streptomyces*. Εκατοντάδες είναι τα φυσικά αντιβιοτικά που έχουν

ταυτοποιηθεί και περίπου 100 είναι αυτά που έχουν αναπτυχθεί σε τέτοιο στάδιο, που να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών.

- Ημισυνθετικά: Προέρχονται από τα φυσικά αντιβιοτικά με μικρές τροποποιήσεις στη δομή τους. Για παράδειγμα, μετά την ανακάλυψη της βενζυλοπενικιλίνης, μια μικρή τροποποίηση στον αυξητικό παράγοντα του *Penicillium*, οδήγησε στην εισαγωγή ενός μόνο ατόμου οξυγόνου στην αλυσίδα του φυσικού προϊόντος, σχηματίζοντας τη φαινοξυμεθυλοπενικιλίνη. Μετά απο τη χημική ταυτοποίηση πολλών φυσικών αντιβιοτικών, πλήθος παραγώγων προέκυψαν και συνεχίζουν να ανακαλύπτονται.
- Συνθετικά: Είναι προϊόντα χημικής σύνθεσης και χαρακτηρίζονται ως χημειοθεραπευτικά. Η πρόοδος της Οργανικής Χημείας είχε ως αποτέλεσμα πολλές κατηγορίες αντιβιοτικών να είναι προϊόντα χημικής σύνθεσης. Η πρώτη συνθετική ένωση σε κλινική χρήση ήταν το Prontosil, ένα αζω-παράγωγο με δομή παραπλήσια με εκείνη των σουλφονιλαμιδίων. Αργότερα αναπτύχθηκαν τα σουλφοναμίδια και τα πιο πρόσφατα παραδείγματα συνθετικών αντιβακτηριακών ουσιών είναι τα νιτροφουράνια και οι κινολόνες.

2. Την ομάδα απο την οποία πρέρχονται.

3. Τον τρόπο δράσης τους:

- Βακτηριοκτόνα: καταστρέφουν τα βακτήρια.
- Βακτηριοστατικά: αποτρέπουν το πολλαπλασιασμό τους.

ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΑ		ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΤΑΤΙΚΑ
Πενικιλίνες	Βανκομυκίνη	Μακρολίδια ²
Κεφαλοσπορίνες	Κυκλοσερίνη	Χλωραμφαινικόλη
Αμινογλυκοσίδες	Νευρομυκίνη	Τετρακυκλίνες ²
Νιτροφουράνια	Κινολόνες	Λινκοσαμίδες ²
Τριμεθοπρίμη + Σουλφαδιαζίνη	Τιαμουλίνη	Σουλφοναμίδες
Πολυμυξίνες ¹	Ριστοσετίνη ²	Νοβοβιοκίνη ²
¹ Δρουν τόσο στη φάση πολλαπλασιασμού, όσο και στη φάση ηρεμίας του βακτηριακού κυττάρου		
² Σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις δρουν βακτηριοκτόνα		

Πηγή: (Μούζουρας, 1996).

4. Το φάσμα της δράσης τους:

- Περιορισμένου φάσματος (narrow-spectrum): δρουν ενάντια σε συγκεκριμένου τύπου βακτήρια, όπως είναι τα Gram αρνητικά και τα Gram θετικά βακτήρια.
- Ευρέως φάσματος (broad spectrum): δρουν αποτελεσματικά ενάντια σε μεγαλύτερο εύρος βακτηρίων.

4. Το μηχανισμό της δράσης τους:

- αναστολλείς της σύνθεσης του νουκλεϊνικού οξέος.

- αναστολλείς της πρωτεϊνικής σύνθεσης.
- καταστρέφουν τις κυτταρικές μεμβράνες.
- παρεμποδίζουν την αντιγραφή
- δρούν ως αντιμεταβολίτες (EMEA, 1999).

Η αποτελεσματικότητα της δράσεως των αντιβιοτικών ποικίλλει, ανάλογα με τη θέση της μόλυνσεως, την ικανότητα του φαρμάκου να προσεγγίσει το σημείο της μόλυνσεως και τη δυνατότητα του μικροβίου να αλληλεπιδράσει με το αντιβιοτικό (EMEA 1999). Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της δράσεως των αντιβιοτικών αποτελεί η ελάχιστη ανασταλτική τους συγκέντρωση ενάντια σε σημαντικούς βακτηριακούς παράγοντες. Η ελάχιστη συγκέντρωση που απαιτείται για να δράσει ανασταλτικά ένα αντιβιοτικό στην ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) είναι καθοριστική της βακτηριακής του ευαισθησίας (Χριστοδούλου 2008). Γενικότερα, η ανθεκτικότητα των βακτηρίων θα πρέπει να εκφράζεται ποσοτικά με τιμές της MIC, παρά να χαρακτηρίζονται τα βακτήρια ως ευαίσθητα ή ανθεκτικά από κλινικής άποψης (EMEA, 1999).

Στην κτηνιατρική, τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία και τον έλεγχο των βακτηριακών μολύνσεων, αλλά και για αυξητικούς λόγους. Ο έλεγχος και η πρόληψη των βακτηριακών μολύνσεων επιτυγχάνεται με την προληπτική και την προφυλακτική χορήγηση αντιβιοτικών (Blasco et al., 2007).

Γενικά, τα σκευάσματα τα οποία προορίζονται για θεραπευτική αγωγή στα ψάρια, διακρίνονται στις εξείς κατηγορίες:

- Κινολόνες: (Ναλιδιζικό οξύ, Φλουμεκίνη, Οξολινικό οξύ, Εντροφλοξασίνη) Μακρολίδια (Ερυθρομυκίνη)
- Σουλφοναμίδες (Σουλφαμεραζίνη, Σουλφαδιμιδίνη, Σουλφαδιαζίνη, Σουλφαδιμεθοξίνη) Ενισχυμένες Σουλφοναμίδες
- Τετρακυκλίνες (Οξυτετρακυκλίνη, Τετρακυκλίνη)

Οι εγκεκριμένες αντιβιοτικές ουσίες για χρήση σε ασθένειες των ψαριών στην Ελλάδα είναι:

- Υδροχλωρική Οξυτετρακυκλίνη
- Σουλφαδιαζίνη σε συνδυασμό με Τριμεθοπρίμη
- Οξολινικό οξύ
- Φλουμεκίνη (ΕΟΦ 2001).

1.2.2 Επιπτώσεις απο τη χρήση αντιβιοτικών ουσιών στις εκτροφές των ψαριών.

Σε περιπτώσεις ζώων όπου η μόλυνση είναι συγκεκριμένη και η θεραπευτική αγωγή μπορεί να εφαρμοστεί αποκλειστικά σε εκείνα τα ζώα

που νοσούν, η χορήγηση των αντιβιοτικών πραγματοποιείται είτε από το στόμα, είτε μέσω της παρεντερικής οδού. Όμως σε μεγάλες ομάδες πληθυσμών, τα αντιβιοτικά χορηγούνται μαζικά μέσω της τροφής ή του νερού, με αποτέλεσμα να χορηγούνται σε ολόκληρο τον εκτρεφόμενο πληθυσμό, ακόμα και αν μόνο ένα μικρό μέρος του έχει προσβληθεί από το μολυσματικό βακτήριο (Blasco et al., 2007).

Όλα τα κτηνιατρικά φάρμακα τα οποία χορηγούνται στα ζώα, μεταφέρονται στους εδώδιμους ιστούς τους και στα προϊόντα τους. Οι υπολειμματικές τους συγκεντρώσεις (κατάλοιπα) μπορούν να μεταφερθούν, μέσω της κατανάλωσης, στον άνθρωπο (Bostoglou et al., 2001). Η χρήση αντιβιοτικών στις εκτροφές των ψαριών, μπορεί να προκαλέσει επιβάρυνση του ανθρώπου μέσω της κατανάλωσης ψαριών, τα οποία εμπεριέχουν στους εδώδιμους ιστούς τους κατάλοιπα των χορηγημένων φαρμάκων (Botsoglou & Fletouris 2001; Blasco et al., 2007).

Το ποσοστό των αντιβιοτικών που τελικά καταναλώνεται από τον άνθρωπο μέσω της διατροφής, εξαρτάται όχι μόνο από το επίπεδο των δόσεων που χορηγούνται στο ζώο, αλλά και από το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη χορήγηση μέχρι τη θανάτωση του, τη λεγόμενη περίοδο αναμονής, η οποία είναι ανάλογη με τη φαρμακοκινητική συμπεριφορά της φαρμακευτικής ουσίας (Bostoglou et al., 2001). Έτσι η επιβάρυνση του ανθρώπου μέσω της διατροφής, έχει σχέση με τη μη σωστή τήρηση των νομοθετικά απαιτούμενων χρόνων απομάκρυνσης (περίοδος αναμονής) (Botsoglou & Fletouris 2001; Blasco et al., 2007).

Ο Χρόνος Απομάκρυνσης (Withdrawal Period) μιας φαρμακευτικής ουσίας από τον οργανισμό των ψαριών έχει άμεση σχέση με τη θερμοκρασία του νερού, διαφοροποιείται ανάλογα με το είδος του

οργανισμού και είναι ανάλογος με τη τιμή που προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό της μέσης ημερήσιας θερμοκρασίας επί το σύνολο των ημερών θεραπείας (βαθμοημέρα) (Yndestad, 1993).

Για τη διασφάλιση της υγείας των καταναλωτών καθορίζονται ανώτατα όρια υπολειμμάτων (MLRs), βασισμένα σε στοιχεία που προκύπτουν από τις δοκιμές τοξικότητας των αντιβιοτικών. MLR είναι η μέγιστη συγκέντρωση των καταλοίπων που δοκιμάζονται χωρίς τοξικολογικό κίνδυνο. Στα προϊόντα ιχθυοκαλλιέργειας, για να εξασφαλιστεί ότι δεν υπάρχουν υπολείμματα στους βρώσιμους ιστούς των ψαριών πάνω από το MLR, ο χρόνος αναμονής για κάθε φαρμακευτική ουσία καθορίζεται βάσει το είδος του ψαριού σε διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες (Rigos & Troisi, 2005).

Στον πίνακα που ακολουθεί παραθέτονται τα ανώτατα όρια καταλοίπων (MLRs) για τις συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά στην ιχθυοκαλλιέργεια της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

ANTIBAKTΗΡΙΑΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	MLR (ng g ⁻¹)	ΠΗΓΗ
Tetracyclines		
Oxytetracycline*	100	EMEA (1995a)
Chlortetracycline	100	
(Fluoro)Quinolones		
Oxolinic acid*	100	EMEA (2003)
Flumequine*	600	EMEA (1999)
Sarafloxacin	30	EMEA (1998a)
Potentiated sulfa		
Sulfonamides (sulfadiazine)*	100**	EMEA (1995b)
Trimethoprim*	50	EMEA (1997)
nameend='c3'		
Penicillin derivatives		

Amoxycillin	50**	EMEA (undated)
Ampicillin	50**	EMEA (undated)
Chloramphenicol derivatives		
Florfenicol	1000	EMEA (2000)
Thiamphenicol	50	EMEA (1998b)

*Αδειοδοτημένα για χρήση στην Ελλάδα.

**MRLs καθορισμένα για χερσαία ζώα.

Πηγή: (Rigos & Troisi, 2005)

Όσο πιο εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών γίνεται, τόσο περισσότερο αντίστοιχα αναπτύσσεται και η βακτηριακή αντοχή (Lunestad, 1993). Στη φύση τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να συλλέγουν και να ανταλλάσσουν γενετικές πληροφορίες. Η βακτηριακή αντοχή έχει γενετική βάση, η οποία μπορεί να προέρχεται από ένα συγκεκριμένο σημείο του βακτηριακού γονιδιώματος ή να μεταφέρεται μεταξύ των βακτηρίων. Από τη χρήση των αντιβιοτικών, είναι αναπόφευκτη η ανάπτυξη της βακτηριακής αντοχής, είτε από μετάλλαξη, είτε από απόκτηση γονιδίου, είτε από τον συνδυασμό των δύο (EMEA, 1999).

Λόγω έλλειψης σχετικών μελετών για την φαρμακοδυναμική των αντιβιοτικών, τουλάχιστον στα Μεσογειακά είδη εκτρεφόμενων ψαριών, θεωρείται γενικά ότι οι συνήθεις χορηγούμενες δόσεις τους, στο θαλάσσιο περιβάλλον, δεν είναι ικανοποιητικές. Έτσι στην πράξη, οι δόσεις οι οποίες χορηγούνται στις θαλασσοκαλλιέργειες, διπλασιάζονται (Αθανασοπούλου, 2008).

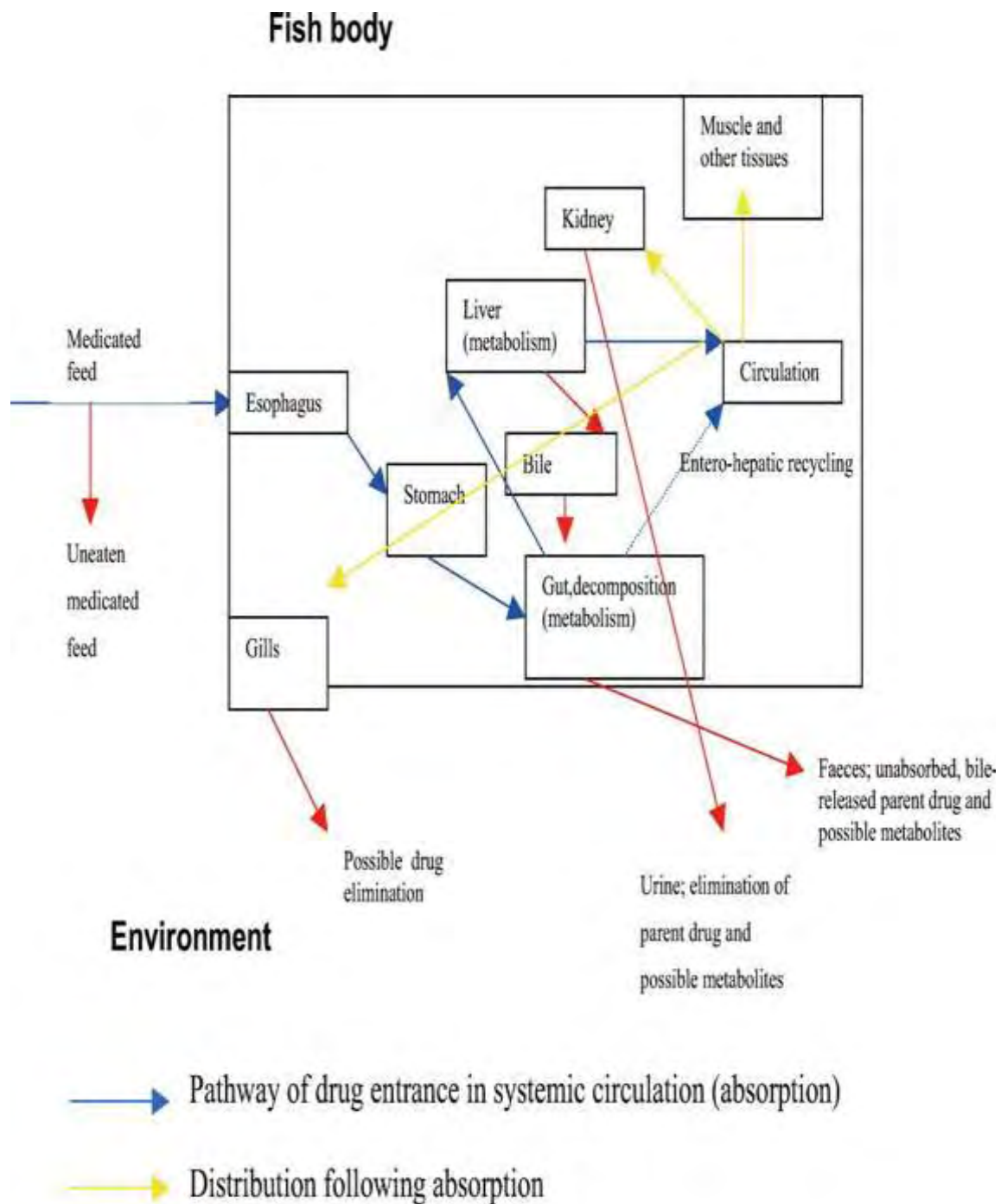
Επίσης η κατάληξη αντιβιοτικών στο υδάτινο περιβάλλον έχει άμεση σχέση με την απώλεια της τροφής κατά τη διατροφή των ψαριών στις εκτροφές, αλλά και με τα παραγόμενα από τα ψάρια περιττώματα κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Τα αντιβιοτικά καταλήγουν, όχι μόνο στα βιοτικά

μέρη της περιοχής όπου βρίσκεται η εκτροφή, αλλά και στα αβιοτικά μέρη του περιβάλλοντα χώρου της εγκατάστασης (Lunestad, 1993).

Με τον τρόπο αυτό διαταράσσεται σημαντικά η βακτηριακή χλωρίδα, ελαττώνεται η αντιβακτηριακή δράση των αντιβιοτικών και αυξάνεται σημαντικά η βακτηριακή αντοχή των μικροοργανισμών. Παράλληλα, μέρος των χημικών αυτών ουσιών εισέρχεται στη τροφική αλυσίδα και έτσι τα κατάλοιπα τους ανιχνεύονται σε μαλάκια, σε οστρακόδερμα και σε άγρια ψάρια της περιοχής γύρω από την εγκατάσταση της εκτροφής (Samuelsen, 1993; Mac Dougall & Black, 1999).

Υποθετικό μοντέλο της διαδρομής των χορηγούμενων αντιβιοτικών μέσω της τροφής στα ψάρια. Πηγή: (Rigos & Troisi, 2005)

Εναλλακτικές λύσεις στη χρήση αντιβιοτικών στα ψάρια αποτελούν οι



εξείς πρακτικές:

- Ο εμβολιασμός των γεννητόρων (*V. anguillarum* I & *Pasteurella*) παράλληλα με τη χρήση ατοκοφερόλης και ασκορβικού οξέος (ανοσοενισχυτικά).
- Ο εμβολιασμός του ιχθυοπληθυσμού στους κλωβούς.
- Η χρήση άλλων ανοσοενισχυτικών (β γλουκάνια η νεότερα Carazolol) στις λάρβες, ιδιαίτερα όταν δεν ανταποκρίνονται ικανοποιητικά σε θεραπείες.
- Η τακτική ιχθυοπαθολογική κάλυψη από ειδικευμένο προσωπικό και η επίβλεψη κτηνιάτρου, η χρήση φαρμακευτικών ουσιών μόνο μετά από συνταγογραφία (όπου χρειάζεται).
- Η μείωση του στρες μέσω της βελτίωσης της υγιεινής, της ρύπανσης και εφαρμογής εναλλακτικών ζωοτεχνικών μέτρων. (πχ θεραπεία *Anilocra*) (Αθανασοπούλου, 2008).

1.2.3 Κινολόνες και φθοροκινολόνες.

Οι κινολόνες αποτελούν μια σχετικά μεγάλη και αναπτυσσόμενη ομάδα συνθετικών ενώσεων, το πρώτο μέλος της οποίας ανακαλύφθηκε το 1962 και ήταν το αντιδραστήριο της ναφθυριδίνης (naphthyridine agent). Το αντιδραστήριο αυτό ονομάστηκε Ναλιδιξικό οξύ και δύο χρόνια μετά την ανακάλυψη του, ορίστηκε ο μηχανισμός της δράσης του ως αναστολέας της σύνθεσης της βακτηριακής DNA γυράσης κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης. Το 1990 ανακαλύφθηκε ένα ένζυμο ομόλογο της γυράσης, η τοποϊσομεράση IV, η οποία προκαλεί την αποσύνθεση των χρωμοσωμάτων. Τελικά αποδείχθηκε ότι οι αντιβακτηριακές κινολόνες έχουν διπλή δράση εναντίον των δύο ενζύμων, της DNA γυράσης και της τοποϊσομεράσης IV (Emmerson & Jones, 2003).

Η φαρμακοκινητική συμπεριφορά κάθε κινολόνης, δηλαδή ο τρόπος απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης, κατόπιν χορήγησης τους σε οποιονδήποτε ζωντανό οργανισμό, διαφέρει. Η βιοδιαθεσιμότητα τους (το κλάσμα του χορηγούμενου φαρμάκου που δεν έχει μεταβολιστεί και φτάνει στα ζωτικά όργανα), ο τρόπος με τον οποίο απορροφώνται από τον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά και από τον οργανισμό των ζώων, κυμαίνεται μεταξύ 60 και σχεδόν 100% ([http://www.chemicaland21.com/arokorhi/fc/FLUOROQUINOLONE S.htm](http://www.chemicaland21.com/arokorhi/fc/FLUOROQUINOLONE_S.htm) November 2007).

Όλες οι κινολόνες διαθέτουν στο μόριο τους μια καρβοξυλική ομάδα στη θέση 3 και μια καρβόνυλο ομάδα στη θέση 4 (EMA, 2009). Παρά το γεγονός ότι το ναλιδιξικό οξύ χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για την αντιμετώπιση περίπλοκων μολύνσεων του ουροποιητικού συστήματος, η

χρήση των κινολονών περιορίστηκε μέχρι τις δεκαετίες του 1970 και 1980, οπότε και ανακαλύφθηκαν οι κινολόνες δεύτερης γενιάς που ονομάστηκαν φθοροκινολόνες (Emmerson & Jones, 2003). Οι φθοροκινολόνες προέκυψαν από την εισαγωγή του φθορίου στη θέση 6 και της πιπεραζινυλικής ομάδας στη θέση 7 (EMEA, 1999)

Οι κινολόνες καθώς και τα μέλη της πρώτης γενιάς των αντιβιοτικών (ναλιδιξικό οξύ, φλουμεκίνη, οξολινικό οξύ), είναι κυρίως δραστικές κατά των Gram αρνητικών βακτηρίων (Χριστοδούλου, 2008). Η δεύτερη γενιά κινολονών, οι φθοροκινολόνες, ξεκίνησε μετά από τη σύνθεση της νορφλοξακίνης και στην αντιβακτηριακή δράση τους περιλαμβάνονται και Gramm θετικά βακτήρια (Samanidou et al., 2005).

ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ Α' ΓΕΝΕΑΣ

Δραστικές κυρίως έναντι των κατά Gram αρνητικών. Εξαίρεση αποτελεί το Οξολινικό οξύ που δρα επίσης κατά των σταφυλόκοκκων

Nalidixic acid (Ναλιδιξικό οξύ)

Oxolinic acid (Οξολινικό οξύ)

flumequine (Φλουμεκίνη)

ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ Β' ΓΕΝΕΑΣ

Διαθέτουν ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα που συμπεριλαμβάνει τα κατά Gram αρνητικά και τα θετικά βακτήρια, ψευδομονάδες και μυκοπλάσματα.

Enrofloxacin (Ενροφλοξακίνη)

Amifloxacin (Αμιφλοξακίνη)

Danofloxacin (Δανοφλοξακίνη)

Enoxacin (Ενοξακίνη)

Ciprofloxacin (Σιπροφλοξακίνη)
Lomefloxacin (Λομεφλοξακίνη)
Norfloxacin (Νορφλοξακίνη)
Pefloxacin (Πεφλοξακίνη)
Ofloxacin (Οφλοξακίνη)
Sparfloxacin (Σπαφλοξακίνη)
Terafloxacin (Τεμαφλοξακίνη)
Tosufloxacin (Τοσουφλοξακίνη)
Fleroxacin (Φεροφλοξακίνη) (Μούζουρας, 1996)

Οι φθοροκινολόνες έχουν διευρυμένο φάσμα δράσης και από φαρμακοκινητική άποψη συμπεριφέρονται καλύτερα από τους προκατόχους τους. Μέσα σε διάστημα δύο δεκαετιών οι φθοροκινολόνες, από μια μικρή ομάδα φαρμάκων, εξελίχθηκαν στις επικρατέστερες για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος και όχι μόνο.

Οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιούνται στη κλινική πρακτική πάνω από μια δεκαετία, διάστημα στο οποίο μελετήθηκαν οι δομές τους σε σχέση με το τρόπο δράσης τους. Οι μελέτες αυτές οδήγησαν στην ανακάλυψη καινούριων ενώσεων με ευρύτερο αντιμικροβιακό φάσμα δράσης και με βελτιωμένη φαρμακοκινητική συμπεριφορά.

Πολλές κλινικές μελέτες για τις φθοροκινολόνες βρίσκονται σε αρχικό στάδιο, ήδη όμως υπάρχουν ελπιδοφόρα μηνύματα για το προσεχές μέλλον. Η αντιβακτηριακή τους δράση διερευνάται ακόμα, αλλά η χρήση τους καθίσταται αναπόφευκτη λόγω της εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών (Emmerson & Jones, 2003).

Την τελευταία δεκαετία, στην κτηνιατρική, η χρήση των κινολονών και των φθοροκινολονών είναι σημαντική και συνεχώς αυξανόμενη. Η σαραφλοξακίνη υπήρξε η πρώτη φθοροκινολόνη, η χρήση της οποίας επιτράπηκε για θεραπευτικούς σκοπούς στα πουλερικά, από τον Αμερικάνικο Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (US Food and Drug Administration). Από το σημείο αυτό και μετά, οι κινολόνες και οι φθοροκινολόνες, χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία κτηνιατρικών νοσημάτων σε ζώα που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο, ενώ αρκετές από αυτές αναπτύχθηκαν αποκλειστικά για κτηνιατρική χρήση, όπως για παράδειγμα η ντανοφλοξακίνη, η ενροφλοξακίνη και η σαραφλοξακίνη που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία αναπνευστικών και εντερικών βακτηριακών μολύνσεων στη πτηνοτροφία, στη κτηνοτροφία και στις ιχθυοκαλλιέργειες (Bostoglou & Fletouris, 2001).

Στα ψάρια οι κινολόνες είναι δραστικότερες σε μικρότερες συγκεντρώσεις (0.1 – 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$) ενώ στα ψάρια των θαλασσοκαλλιεργειών, λόγω της ιδιότητας των κινολονών να σχηματίζουν σύμπλοκα με δισθενή κατιόντα, ιδιαίτερα με Mg^{++} , η χορήγηση κινολονών μέσω της τροφής έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία συμπλόκων στο έντερο των ψαριών. Η δημιουργία των συμπλόκων αυτών οφείλεται στην περιεκτικότητα σε κατιόντα Mg^{++} του θαλασσινού νερού (54 mMol Mg^{++}) σε συνδυασμό με τη συνεχή κατάπωση νερού από τα ψάρια και τη παράλληλη χορήγηση κινολονών (Παππάς, 2009).

Κατά τη χρήση τους οι κινολόνες δεν πρέπει να συνδυάζονται με τις τετρακυκλίνες, το συνδυασμό σουλοναμίδη – τριμεθοπρίμη και τα νιτροφουράνια (Μούζουρας, 1996).

1.2.4 Φλουμεκίνη.

Η φλουμεκίνη είναι η πρώτη μονοφθοριωμένη κινολόνη (Χριστοδούλου, 2008). Είναι λευκή μικροκρυσταλλική σκόνη, πρακτικώς αδιάλυτη στο νερό, ευδιάλυτη σε αλκαλικά υδροξείδια, ελάχιστα διαλυτή στο μεθυλενοχλωρίδιο, ελάχιστα διαλυτή στη μεθανόλη (http://lib.njutcm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/16_monographs/monographs_d-k/index.pdf, 2005). Η χημική της ονομασία είναι 9-φθορο-6,7-διυδρο-5-μεθυλ-L-0x0-1H,5H-βενζο-quinolizine-2-καρβοξυλικό οξύ (Χριστοδούλου, 2008). Η φλουμεκίνη εμπεριέχει όχι λιγότερο από 99,0% και όχι περισσότερο από το ισοδύναμο των 101,0 % του (RS)-9-φθορο-5-μεθυλο-1-οξο-6,7-διυδρο-1H, 5H-βενζο [i,i] quinolizine-2-καρβοξυλικό οξύ, το οποίο υπολογίζεται με αναφορά στη ξηρά ουσία (http://lib.njutcm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/16_monographs/monographs_d-k/index.pdf, 2005).

Ανήκει στην κατηγορία των συνθετικών αντιβιοτικών, στην πρώτη γενιά κινολονών και είναι κυρίως δραστική ενάντια στα Gram αρνητικά βακτήρια (EMEA, 1999). Χρησιμοποιείται κυρίως στα ζώα (Francis & Wells) και το φάσμα δράσης της περιλαμβάνει όχι μόνο Gram αρνητικά βακτήρια αλλά και μύκητες, πρωτόζωα, ακόμη και μερικούς παρασιτικούς σκώλικες (Γαππάς, 2009).

Η φλουμεκίνη αντικαθιστά βαθμιαία το οξολονικό οξύ στη θεραπευτική, λόγω των φαρμακοκινητικών της παραμέτρων (Γαππάς, 2009) και η χρήση της για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων στα ψάρια, οφείλεται κυρίως στις ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MIC) για τα πλέον ευαίσθητα παθογόνα των ψαριών (Martinsen, 1993).

Η δοσολογία της χορήγησης σε ψάρια γλυκού νερού είναι 100mg / kg

(12.5 $\mu\text{g} / \text{kg}$ για κύκλο θεραπείας 8 ημερών ή 20 $\mu\text{g} / \text{kg}$ για κύκλο θεραπείας 5 ημερών), ενώ σε ψάρια θαλασσινού νερού η δοσολογία χορήγησης είναι 125 – 200 $\mu\text{g} / \text{kg}$. Η συγκέντρωση της φλουμεκίνης στους διάφορους ιστούς των ψαριών ήταν ικανοποιητική μετά από χορήγηση είτε 6, είτε 12 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{ημέρα}$, ενώ ελαττωνόταν αισθητά 24 έως 48 ώρες μετά από τη διακοπή της χορήγησης (Γαππιάς, 2009).

Στον πίνακα που ακολουθεί αποτυπώνονται τα αποτελέσματα φαρμακοκινητικών μελετών για τη φλουμεκίνη σε ευρύαλα εκτροφόμενα είδη ψαριών.

$t_{1/2\alpha}$: absorption half life (plasma or tissue), $t_{1/2\beta}$: elimination half time (plasma or tissue), V_{dss} : apparent volume of distribution of FLU at a steady state, F: bioavailability, MIC: maximum concentration (tissue when no plasma was sampled) after oral dosing (single or multiple) Wts: withdrawal times, IV: intravascular, OR-S: oral single dose, OR-M: oral multiple dose, SB:European sea bass, GSB: gilthead sea bream.

$t_{1/2\alpha}$: absorption half life (plasma or tissue), $t_{1/2\beta}$: elimination half time (plasma or tissue), V_{dss} : apparent volume of distribution of FLU at a steady state, F: bioavailability, MIC: maximum concentration (tissue when no plasma was sampled) after oral dosing (single or multiple) Wts: withdrawal times, IV:

intravascular, OR-S: oral single dose, OR-M: oral multiple dose, SB:European sea bass, GSB: gilthead sea bream.

1: (Malvisi et al, 1997), 2: (Rigos et al, 2002e), 3: (Rigos et al, 2003c), 4: (Rigos et al, 2003c), 5: (Τυρpenou et al, 2003b).

Πηγή: (προσαρμοσμένο απο Rigos & Troisi, 2005).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να πάρουμε ερευνητικά στοιχεία και δεδομένα για την απορρόφηση της φλουμεκίνης από τα ψάρια, σε σχέση με τη διάρκεια του χρόνου εμφάνισης και την εμφάνιση των καταλοίπων της στο πλάσμα του αίματος.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ
ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βιολογικός
πειραματισμός.

Για το σκοπό του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 70 τσιπούρες απο μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας, χωρίς ιστορικό προηγούμενης θεραπείας, με εύρος βάρους 300-350 gr, οι οποίες δεν εμφάνιζαν συμπτώματα ασθένειας. Οι τσιπούρες εγκλιματίστηκαν για μια εβδομάδα πριν την έναρξη του πειράματος σε δεξαμενές χωρητικότητας 800 L νερού, με θερμοκρασία νερού 14-15 °C και αλατότητα 38‰. Εφαρμόστηκε νηστεία δύο ημερών στα ψάρια και στη συνέχεια χορηγήθηκε στο νερό η φλουμεκίνη, διαλυμένη σε NaOH 0.025 M, σε

συγκέντρωση 100 ppm. Πριν τη χορήγηση της φλουμεκίνης και κατά τη διάρκεια του χρόνου εμφάνισης των ψαριών (48 h), διακόπηκε η ανανέωση του νερού στη δεξαμενή ενώ παρεχόταν επαρκής οξυγόνωση.



Εικόνα 1: Το σκεύασμα φλουμεκίνης (κίτρινο δοχείο) το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες του πειράματος.

2.2 Πρώτο στάδιο.

2.2.1 Δειγματοληψία.

Οι αιμοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε δεδομένους χρόνους εμφάνισης. Έτσι κάθε 2η, 4η, 6η, 8η, 24η και 48η ώρα από τη στιγμή της ενσωμάτωσης της φλουμεκίνης στο νερό της δεξαμενής όπου βρίσκονταν τα ψάρια, λαμβάνονταν από τις δεξαμενές δείγματα ψαριών στην αναλογία τεσσάρων ψαριών / δείγμα. Ακολούθησε ηρέμηση των ψαριών με την αναισθητική ουσία 2-phenoxyethanol σε δοσολογία 0.2 mL/L νερού και στη συνέχεια παραλαβή δείγματος 1 mL αίματος με σύριγγα 21GA των 2 mL από την ουραία φλέβα. Το αίμα που λήφθηκε από κάθε

τσιπούρα μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο erendorff με σημειωμένη την χρονική στιγμή λήψης και τον αριθμό του δείγματος. Μετά την αιμοληψία τα ψάρια μεταφέρονταν σε διαφορετική δεξαμενή.



Εικόνα 2: Εμβάπτιση των ψαριών σε αναισθητικό πριν την αιμοληψία.



Εικόνα 3: Αιμοληψία.



Εικόνα 4: Έκχυση του αίματος σε ependorf.

2.2.2 Επεξεργασία των δειγμάτων.

Τα δείγματα του αίματος φυγοκεντρήθηκαν στις 14.000 rpm για 10 sec σε ψυχόμενη φυγόκεντρο. Το υπερκείμενο πλάσμα του αίματος, που διαχωρίστηκε από τα υπόλοιπα συστατικά του, μετατέθηκε σε νέο ependorf και ακολούθησε κατάψυξη των δειγμάτων στους -20°C μέχρι την ανάλυσή τους.



Εικόνα 5: Τοποθέτηση των δειγμάτων του αίματος σε ψυχόμενη φυγόκεντρο για τον διαχωρισμό του πλάσματος.



Εικόνα 6: Διαχωρισμός του πλάσματος μετά την φυγοκέντρωση.



Εικόνα 7: Παραλαβή του υπερκείμενου πλάσματος και μεταφορά σε νέα ependorf.

2.3 Δεύτερο στάδιο.

2.3.1 Εκχύλιση των δειγμάτων και χρωματογραφική ανάλυση.

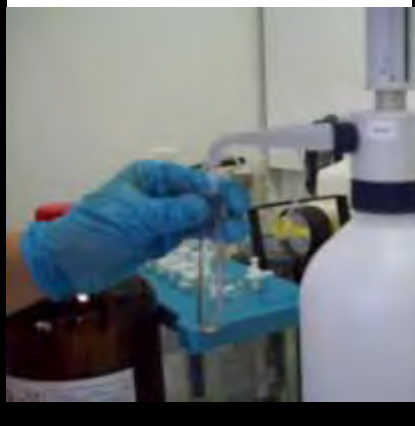
1. Προστέθηκε, με ακρίβεια, ποσότητα δείγματος 200 μL σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες.



Εικόνα 8: Βήμα 1.

2. Προστέθηκαν 2 mL
οξικού αιθυλεστέρα
και 0.3 gr άνυδρο
θειϊκό

νάτριο.



Εικόνα 9: Βήμα 2 και 6
(προσθήκη οξικού
αιθυλεστέρα).



Εικόνα 10: Βήμα 2
(άνυδρο θειϊκό νάτριο).

3. Ακολούθησε
ανάδευση σε μηχανικό
αναδευτήρα (vortex).



Εικόνα 11: Βήμα 3, 9 και

10 (ανάδευση-vortex).

4. Φυγοκέντρωση
στις 3.000 rpm για 10 sec.

Εικόνα 12: Βήμα 4, 6 και
11 (φυγοκέντρωση).

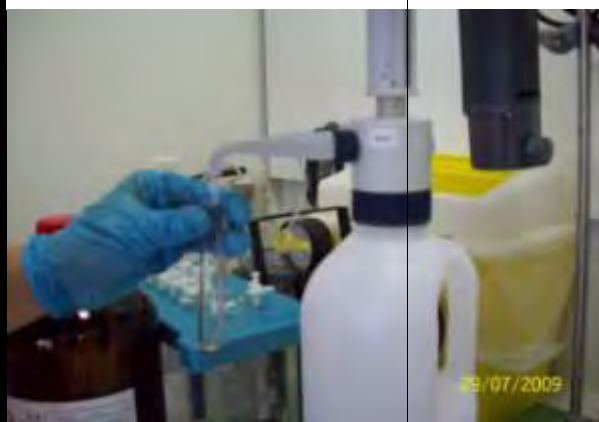
5. Το υπερκείμενο
εκχύλισμα
μεταφέρθηκε σε
άλλο δοκιμαστικό
σωλήνα και
εξατμίστηκε.



Εικόνα 13: Βήμα 5 και 7
(μεταφορά υπερκείμενου

εκγυλίματος σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα).

6. Στον αρχικό δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 0.5 mL οξικού αιθυλεστέρα και επαναλήφθηκε ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα (vortex) και φυγοκέντρηση στις 3.000 rpm για 10 sec.



Εικόνα 14: Βήμα 2 και 6 (προσθήκη οξικού αιθυλεστέρα).



Εικόνα 15: Βήμα 3, 6, 9
και 10 (ανάδευση-vortex).

Εικόνα 16: Βήμα 4,6 και
11 (φυγοκέντρωση).

7. Το υπερκείμενο εκχύλισμα μεταφέρθηκε στους δοκιμαστικούς σωλήνες του σταδίου 5, στους οποίους το πρώτο εκχύλισμα είχε εξατμιστεί σχεδόν έως ξηρού.

8. Ακολούθησε εξατμωση σε ρεύμα αζώτου.

9. Το υπόλειμμα ανασυστάθηκε σε

1.0 mL μίγματος
ύδατος/μεθανόλης
60/40 (v/v) και
ακολούθησε
ανάδευση σε
μηχανικό
αναδευτήρα
(vortex).



Εικόνα 17: Βήμα 3, 6, 9
και 10 (ανάδευση-
vortex).

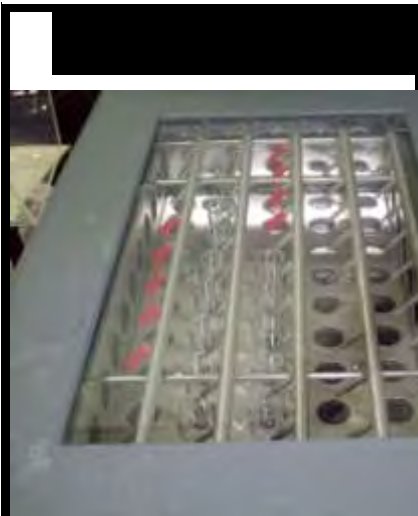
10. Στη συνέχεια
προστέθηκε 1 ml
κανονικού
επτανίου και
ακολούθησε
ανάδευση σε
μηχανικό

αναδευτήρα (vortex)
για περίπου 1 sec.



Εικόνα 18: Βήμα 3, 6, 9
και 10 (ανάδευση-vortex).

11. Το διφασικό σύστημα συνολικού όγκου 2 mL, τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας χαμηλότερης των 20 °C. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε με ταχύτητα 3.000 rpm για 15 sec.



Εικόνα 19: Βήμα 11
(υδατόλουτρο).

Εικόνα 20: Βήμα 4,6 και
11 (φυγοκέντρωση).

Η στιβάδα επτανίου απομακρύνθηκε και η κάτω στιβάδα διηθήθηκε με φίλτρο 0.22 μm σε φιαλίδιο (vial) αυτόματου δειγματολήπτη του υγρού χρωματογράφου.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον Πίνακα (1) μπορούμε να δούμε τις συγκεντρώσεις της φλουμεκίνης στο πλάσμα του αίματος της τσιπούρας, οι οποίες υπολογίσθηκαν υδροχρωματογραφικά, ανάλογα με τη διάρκεια

$t_{1/2\alpha}$: absorption half life (plasma or tissue), $t_{1/2\beta}$: elimination half time (plasma or tissue), V_{dss} : apparent volume of distribution of FLU at a steady state, F : bioavailability, MIC : maximum concentration (tissue when no plasma was sampled) after oral dosing (single or multiple) Wts: withdrawal times, IV : intravascular, $OR-S$: oral single dose, $OR-M$: oral multiple dose, SB :European sea bass, GSB : gilthead sea bream.

$t_{1/2\alpha}$: absorption half life (plasma or tissue), $t_{1/2\beta}$: elimination half time (plasma or tissue), V_{dss} : apparent volume of distribution of FLU at a steady state, F : bioavailability, MIC : maximum concentration (tissue when no plasma was sampled) after oral dosing (single or multiple) Wts: withdrawal times, IV : intravascular, $OR-S$: oral single dose, $OR-M$: oral multiple dose, SB :European sea bass, GSB : gilthead sea bream.

1: (Malvisi et al, 1997), 2: (Rigos et al, 2002e), 3: (Rigos et al, 2003c), 4: (Rigos et al, 2003c), 5: (Tyrpenou et al, 2003b).

Πηγή: (προσαρμοσμένο απο Rigos & Troisi, 2005).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να πάρουμε ερευνητικά στοιχεία και δεδομένα για την απορρόφηση της φλουμεκίνης από τα ψάρια, σε σχέση με τη διάρκεια του χρόνου εμβάπτισης και την εμφάνιση των καταλοίπων της στο πλάσμα του αίματος.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βιολογικός πειραματισμός.

Για το σκοπό του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 70 τσιπούρες απο μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας, χωρίς ιστορικό προηγούμενης θεραπείας, με εύρος βάρους 300-350 gr, οι οποίες δεν εμφάνιζαν συμπτώματα ασθένειας. Οι τσιπούρες εγκλιματίστηκαν για μια εβδομάδα πριν την έναρξη του πειράματος σε δεξαμενές χωρητικότητας 800 L νερού, με θερμοκρασία νερού 14-15 °C και αλατότητα 38‰. Εφαρμόστηκε νηστεία δύο ημερών στα ψάρια και στη συνέχεια χορηγήθηκε στο νερό η φλουμεκίνη, διαλυμένη σε NaOH 0.025 M, σε συγκέντρωση 100 ppm. Πριν τη χορήγηση της φλουμεκίνης και κατά τη διάρκεια του χρόνου εμβάπτισης των ψαριών (48 h), διακόπηκε η ανανέωση του νερού στη δεξαμενή ενώ παρέχόταν επαρκής

οξυγόνωση.



Εικόνα 1: Το σκεύασμα φλουμεκίνης (κίτρινο δοχείο) το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες του πειράματος.

2.2 Πρώτο στάδιο.

2.2.1 Δειγματοληψία.

Οι αιμοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε δεδομένους χρόνους εμφάνισης. Έτσι κάθε 2η, 4η, 6η, 8η, 24η και 48η ώρα από τη στιγμή της ενσωμάτωσης της φλουμεκίνης στο νερό της δεξαμενής όπου βρίσκονταν τα ψάρια, λαμβάνονταν από τις δεξαμενές δείγματα ψαριών στην αναλογία τεσσάρων ψαριών / δείγμα. Ακολούθησε ηρέμηση των ψαριών με την αναισθητική ουσία 2-phenoxyethanol σε δοσολογία 0.2 mL/L νερού και στη συνέχεια παραλαβή δείγματος 1 mL αίματος με σύριγγα 21GA των 2 mL από την ουραία φλέβα. Το αίμα που λήφθηκε από κάθε τσιπούρα μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο erendorff με σημειωμένη την χρονική στιγμή λήψης και τον αριθμό του δείγματος. Μετά την αιμοληψία τα ψάρια μεταφέρονταν σε διαφορετική δεξαμενή.



Εικόνα 2: Εμβάπτιση των ψαριών σε αναισθητικό πριν την αιμοληψία.



Εικόνα 3: Αιμοληψία.



Εικόνα 4: Έκχυση του αίματος σε ependorf.

2.2.2 Επεξεργασία των δειγμάτων.

Τα δείγματα του αίματος φυγοκεντρήθηκαν στις 14.000 rpm για 10 sec σε ψυχόμενη φυγόκεντρο. Το υπερκείμενο πλάσμα του αίματος, που διαχωρίστηκε από τα υπόλοιπα συστατικά του, μετατέθηκε σε νέο ependorf και ακολούθησε κατάψυξη των δειγμάτων στους -20°C μέχρι την ανάλυσή τους.



Εικόνα 5: Τοποθέτηση των δειγμάτων του αίματος σε ψυχόμενη φυγόκεντρο για τον διαχωρισμό του πλάσματος.



Εικόνα 6: Διαχωρισμός του πλάσματος μετά την φυγοκέντρηση.



Εικόνα 7: Παραλαβή του υπερκείμενου πλάσματος και μεταφορά σε νέα ependorf.

2.3 Δεύτερο στάδιο.

2.3.1 Εκχύλιση των δειγμάτων και χρωματογραφική ανάλυση.

1. Προστέθηκε, με ακρίβεια, ποσότητα δείγματος 200 μL σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες.



Εικόνα 8: Βήμα 1.

2. Προστέθηκαν 2 mL οξικού αιθυλεστέρα και 0.3 gr άνυδρο θειϊκό νάτριο.

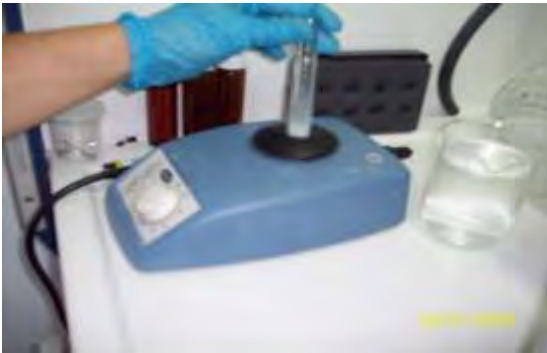


Εικόνα 9: Βήμα 2 και 6 (προσθήκη οξικού αιθυλεστέρα).



Εικόνα 10: Βήμα 2 (άνυδρο θειικό νάτριο).

3. Ακολούθησε ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα (vortex).



Εικόνα 11: Βήμα 3, 9 και 10 (ανάδευση-vortex).

4. Φυγοκέντρηση στις 3.000 rpm για 10 sec.



Εικόνα 12: Βήμα 4, 6 και 11 (φυγοκέντρηση).

5. Το υπερκείμενο εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα και εξατμίστηκε.



Εικόνα 13: Βήμα 5 και 7 (μεταφορά υπερκείμενου εκχυλίσματος σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα).

6. Στον αρχικό δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 0.5 mL οξικού αιθυλεστέρα και επαναλήφθηκε ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα (vortex) και φυγοκέντρηση στις 3.000 rpm για 10 sec.



Εικόνα 14: Βήμα 2 και 6 (προσθήκη οξικού αιθυλεστέρα).



Εικόνα 15: Βήμα 3, 6, 9 και 10 (ανάδευση-vortex).



Εικόνα 16: Βήμα 4,6 και 11 (φυγοκέντρηση).

7. Το υπερκείμενο εκχύλισμα μεταφέρθηκε στους δοκιμαστικούς σωλήνες του σταδίου 5, στους οποίους το πρώτο εκχύλισμα είχε εξατμιστεί σχεδόν έως ξηρού.
8. Ακολούθησε εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου.
9. Το υπόλειμμα ανασυστάθηκε σε 1.0 mL μίγματος ύδατος/μεθανόλης 60/40 (v/v) και ακολούθησε ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα (vortex).



Εικόνα 17: Βήμα 3, 6, 9 και 10 (ανάδευση-vortex).

10. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 ml κανονικού επτανίου και ακολούθησε ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα (vortex) για περίπου 1 sec.



Εικόνα 18: Βήμα 3, 6, 9 και 10 (ανάδευση-vortex).

11. Το διφασικό σύστημα συνολικού όγκου 2 mL, τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας χαμηλότερης των 20 °C. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε με ταχύτητα 3.000 rpm για 15 sec.



Εικόνα 19: Βήμα 11 (υδατόλουτρο).



Εικόνα 20: Βήμα 4,6 και 11 (φυγοκέντρηση).

Η στιβάδα επτανίου απομακρύνθηκε και η κάτω στιβάδα διηθήθηκε με φίλτρο 0.22 μm σε φιαλίδιο (vial) αυτόματου δειγματολήπτη του υγρού χρωματογράφου.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον Πίνακα (1) μπορούμε να δούμε τις συγκεντρώσεις της φλουμεκίνης στο πλάσμα του αίματος της τσιπούρας, οι οποίες υπολογίσθηκαν υγροχρωματογραφικά, ανάλογα με τη διάρκεια εμβάπτισης των ψαριών.

Δείγματα	μg FLU/mL πλάσματος
2h/1	0.2
2h/2	0.18
2h/3	0.2
2h/4	0.24
4h/1	0.55
4h/2	0.42
4h/3	0.31
4h/4	0.4

Δείγματα	μg FLU/mL πλάσματος
6h/1	0.49
6h/2	0.69
6h/3	0.5
6h/4	0.46
8h/1	0.61
8h/2	0.43
8h/3	0.74
8h/4	0.54
24h/1	0.66
24h/2	0.8
24h/3	0.67
24h/4	0.58

Δείγματα	μg FLU/mL πλάσματος
48h/1	1,24
48h/2	0.91
48h/3	0.93
48h/4	1,11

Πίνακας 1

Στον πίνακα (2) μπορούμε να δούμε τις μέσες συγκεντρώσεις της φλουμεκίνης στο πλάσμα του αίματος της τσιπούρας, απο τα τέσσερα δείγματα ψαριών με ανάλογη διάρκεια εμφάνισης, καθώς και την τυπική απόκλιση (\pm SD) των μέσων τιμών, βάσει των συγκεντρώσεων των δειγμάτων που υπολογίστηκαν υδροχρωματογραφικά.

Δείγματα	Μέση Συγκέντρωση (μg FLU/mL πλάσματος)	Τυπική Απόκλιση (\pmSD) (μg FLU/mL πλάσματος)
2h	0.2	0.02
4h	0.42	0.08

Δείγματα	Μέση Συγκέντρωση ($\mu\text{g FLU/mL}$ πλάσματος)	Τυπική Απόκλιση ($\pm\text{SD}$) ($\mu\text{g FLU/mL}$ πλάσματος)
6h	0.53	0.09
8h	0.58	0.11
24h	0.68	0.07
48h	1,05	0.13

Πίνακας 2

Από τις τιμές της φλουμεκίνης στο πλάσμα της τσιπούρας, φαίνεται ότι η απορρόφησή της από τον οργανισμό του ψαριού (ων), είναι σχετικά μικρή τις πρώτες ώρες, ενώ αυξάνει σημαντικά προς το τέλος της δειγματοληψίας (48h) ξεπερνώντας το $1 \mu\text{g/mL}$ πλάσματος.

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά τη διάρκεια του πειραματισμού μέσω εμφάνισης δεν παρατηρήθηκε κάποια ανωμαλία στη συμπεριφορά των ψαριών, ένδειξη ότι η δοσολογία του αντιβιοτικού δεν επέφερε ορατές παρενέργειες ή στρές.

Η υγροχρωματογραφική ανάλυση του πλάσματος, έδειξε ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις της φλουμεκίνης από τα πρώτα δειγματοληπτικά χρονικά σημεία οι οποίες αυξήθηκαν προοδευτικά έως και το σημείο των 48 ωρών εμφύσησης.

Στον Πίνακα (3) που παρατίθεται παρακάτω, συγκεντρώνονται οι συγκεντρώσεις αντιβιοτικών από σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές (προσαρμοσμένος από Rigos et al. 2006).

Αντιβιοτική ουσία	Είδος	Μέγεθος	Εμβάπτιση		Ιστοί ανάλυσης (µg/ml or g)		Βιβλιογραφία
			Μέγιστες τιμές	Μέγιστες τιμές	Μέγιστες τιμές	Μέγιστες τιμές	
			Διάρκεια (h)	Συγκέντρωση µg/mL	Πλάσμα ή ορός	Μύς	
FLU	Brown trout		5	50, 100, 500	38, 41, 49		O'Grady et al. (1988)
FLU	Atlantic salmon	35	1,25	50	35		O'Grady and Smith (1992)
FLU	Atlantic salmon	20-30	0.3	25	22.5-40.8	14-18.5	Hiney et al. (1995)
FLU, OA	Atlantic halibut	3.0-5.0	72	150-200		14.2, 9.4	Samuelsen and Lunestad (1996)
EF	Red pacu		5	2,5	0.17		Lewbart et al. (1997)
SDM, SMZ, SGD,	Atlantic halibut	2.0-4.0	72	200		2.1-32.6	Samuelsen et al. (1997)

Αντιβακτηριακή ουσία	Είδος	Μέγεθος	Εμβάπτιση		Ιστοί ανάλυσης (µg/ml or g)		Βιβλιογραφία
			Διάρκεια (h)	Συγκέντρωση µg/mL	Μέγιστες τιμές	Μύς	
SDD							
TMP						99	
FLU	Atlantic halibut	89	2	10	0.08		Hansen and Horsberg (1999)
	Turbot	210			0.14		
FLU	Atlantic cod	171	2	10	0.13		Hansen and Horsberg (2000)
	Goldsinny wrasse	38			0.09		
EF	Sea bass	200-300	4, 8, 24	5, 10, 50	0.17-1.12, 0.31-1.13, 0.72-1.43		Intorre et al. (2000)
FLU, OA	Corkwing wrasse		72	150, 200	1,1	5, 2,5	Samuelsen and Ervik (2001)
FLU, OA	Turbot	1,0-2,0	72	150, 200		10,2, 6,2	Samuelsen (2003)

Αντιβακτηριακή ουσία	Είδος	Μέγεθος	Εμβάπτιση		Ιστοί ανάλυσης (µg/ml or g)		Βιβλιογραφία
			Διάρκεια (h)	Συγκέντρωση µg/mL	Μέγιστες τιμές	Πλάσμα ή ορός	
OTC	Gilthead sea bream	360	24	50	0.05	0.1	Rigos et al. (2006)
FLU	Gilthead sea bream	300-350	48	100	1,05		Παρούσα εργασία

Πίνακας 3: FLU: φλουμεκίνη, OA: οξολινικό οξύ, EF: ενροφλοξασίνη, OTC: οξυτετρακυκλίνη, SDM: σουλφαδιμεθοξίνη, SMZ: σουλφαμεδοξαζόλη, SGD: σουλφαγουανιδίνη, SDD: σουλφαδιμιδίνη, TMP: τριμεθοπρίμη.

Οι μέγιστες τιμές της φλουμεκίνης που μετρήθηκαν στο πλάσμα της τσιπούρας στην παρούσα μελέτη (1.05 µg/mL) είναι κατά πολύ υψηλότερες συγκριτικά με αντίστοιχες που έχουν αναφερθεί από θεραπείες με εμβάπτιση στα είδη *Hippoglossus hippoglossus*, *Scophthalmus maximus*, *Gadus morhua* και *Ctenolabrus rupestris* (0.08-0.14 µg/mL) με χαμηλότερες ωστόσο τιμές συγκέντρωσης φαρμάκου στο νερό εμβάπτισης (10µg/mL) και μικρότερη διάρκεια εμβάπτισης (2 h) (Hansen & Horsberg, 1999; 2000). Αντίθετα, αντίστοιχα πειράματα με μεγαλύτερη συγκέντρωση φλουμεκίνης (50-150 µg/mL) έδειξαν παρόμοιες αλλά και σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις φαρμάκου (1-38 µg/mL) στο πλάσμα των ειδών *Salmo trutta* και *Symphodus melops* (O'Grady et al., 1988; O'Grady and Smith, 1992; Samuelsen & Ervik, 2001) και στη σάρκα των ειδών *Hippoglossus hippoglossus*, *Scophthalmus maximus* και *Ctenolabrus rupestris* (5-14

μg/mL) (Samuelsen & Lunestad, 1996; Samuelsen & Ervik, 2001; Samuelsen, 2003). Χορήγηση άλλων κινολονών, συμπεριλαμβανομένου του οξολινικού οξέος (OA) (200 μg/mL για 72 h) και της ενροφλοξασίνης (EF) (5-50 μg/mL για 4-24h) έδωσαν παρόμοιες τιμές στο πλάσμα (1 μg/mL) στο είδος *Symphodus melops* (Samuelsen & Ervik, 2001) και 0.17-1.43 μg/mL στο λαβράκι (*Disentrarchus labrax*) (Intorre et al., 2000). Επίσης, υψηλότερες συγκεντρώσεις σε ιστούς από αυτές της παρούσας μελέτης, ανιχνεύτηκαν σε θεραπεία μέσω εμβάπτισης (200 μg/mL για 72h) με ενισχυμένες σουλφοναμίδες στο είδος *Hippoglossus hippoglossus* (επίπεδα στη σάρκα 2.1-99 μg/g) (Samuelsen et al., 1997).

Οι διαφορές που προκύπτουν στην απορρόφηση των αντιβιοτικών που χορηγούνται με εμβάπτιση στα ψάρια. Πιθανώς να οφείλονται στη διαφορετικότητα των ειδών, στην πειραματική οργάνωση και κυρίως στις χημικές ιδιότητες των φαρμακευτικών ουσιών (Rigos et al. 2006). Οι διαφορές της χημικής σύνθεσης των αντιβιοτικών αλλάζουν στο νερό (φωτόλυση και υδρόλυση) και με αυτό τον τρόπο είναι πιθανό ένα πολύ μικρό μέρος του χορηγούμενου φαρμάκου να έχει αλλοιωθεί πριν εισέλθει στο ψάρι. Οι κινολόνες, όπως η φλουμεκίνη και το οξολινικό οξύ, έχουν μία λειτουργική ομάδα η οποία μπορεί να ιονιστεί (Park et al., 2000). Οι λιπόφιλες ιδιότητες των αντιβιοτικών, δηλαδή η ικανότητα τους να διαπερνούν τις βιολογικές μεμβράνες, τους δίνει αναλογικά και πλεονέκτημα ως προς την απορρόφηση. Για παράδειγμα, οι κινολόνες και οι σουλφοναμίδες είναι περισσότερο λιπόφιλες σε σχέση με τις τετρακυκλίνες (Oakacs-Novak et al., 1992; Herbert and Dorsey, 1995; Spaepen et al., 1997) και ως εκ τούτου διαπερνούν καλύτερα τις βιολογικές μεμβράνες των οργανισμών.

Ενδεικτικά, σε σχέση με την αποτελεσματικότητα της εφαρμογής της εμφάπτισης για την καταπολέμηση με φλουμεκίνη των βακτηριακών παθογόνων στην τσιπούρα, πρέπει να επισημανθεί ότι οι συγκεντρώσεις που καταγράφηκαν στο πλάσμα για 48 h (0.2 έως 1.05 µg/mL), υπερβαίνουν τις τιμές των MIC (0.019 – 1.2 µg/mL) για τα παθογόνα *Listonella (Vibrio) anguillarum* Serotype Ib, *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, *V. alginolyticus*, *V. damsela* και *V. fluvialis* (Rigos et al. 2003).

Συμπερασματικά, η θεραπεία με φλουμεκίνη στην τσιπούρα μέσω εμφάπτισης, έδωσε πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα, καθώς η συγκέντρωση του φαρμάκου ήταν σχετικά αρκετά υψηλή στο πλάσμα του ψαριού. Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η απορρόφηση του φαρμάκου στους ιστούς του ψαριού σε υψηλότερες θερμοκρασίες νερού θα είναι πιθανότατα και μεγαλύτερη, καθώς ο μεταβολισμός του ψαριού αυξάνεται με ανάλογη αύξηση της θερμοκρασίας.

Επίσης είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι η εφαρμογή των εμφαπτίσεων με αντιβιοτικά πρέπει να είναι περιορισμένη και να εφαρμόζεται μόνο σε πολύ ειδικές συνθήκες, καθώς το κόστος χορήγησης, η περιβαλλοντική επιβάρυνση και η πιθανότητα δημιουργίας ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών, είναι αυξημένα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1) Antibiotic Resistance in the European Union Associated with Therapeutic Use of Veterinary Medicines, EMEA/CVMP/342/99-corr-Final (14 July 1999).

- 2) Antibiotic Resistance in the European Union Associated with Therapeutic Use of Veterinary Medicines, (EMEA/MRL/707/99-FINAL November 1999)
- 3) BOSTOGLU, N. A., & FFLETOURIS, D. J. (2001). Quinolones. In: Drug Residues in Foods. Pharmacology, Food Safety, and Analysis. Chapter 29. Marcel Dekker, Inc. New York - Basel, pp. 950-961.
- 4) BLASCO, C., TORRES, C.M., PICO, Y. (2007). Trends in Analytical Chemistry, Progress in analysis of residual antibacterials in food, accepted manuscript.
- 5) CHRISTOFILOGIANNIS, P. (1993). The Veterinary Approach to Sea-bass and Sea-bream. In: Brown L.(ed), Aquaculture for Veterinarians. Fish Husbandry and Medicine, Pergamon Press, Oxford.New York.Seul.Tokyo, pp.379-393.
- 6) Costello, M.J., Grant, A., Davies, I.M., Cecchini, S., Papoutsoglou, S., Quingley, D. and Saroglia, M. (2001). The control of chemicals used in aquaculture in Europe. *J. Appl. Ichthyol.* 17, 173–180.
- 7) EMMERSON, A.M., JONES ,A.M. (2003). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 13-20.
- 8) FRANSIS, G., WELLS, R. Flumequine. Australian Government Analytical Laboratories.

- 9) HANSEN, M.K., HORSEBERG, T.E. (1999). Single-dose pharmacokinetics of flumequine in halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 22, 122-126.
- 10) HANSEN, M.K., HORSBERG, T.E. (2000). Single-dose pharmacokinetics of flumequine in cod (*Gadus morhua*) and goldsinny wrasse (*Ctenolabrus rupestris*). *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 23, 163-168.
- 11) HANSEN, G. D., RAUNIYAR, G. P. & R. O. HERMANN. (1994). Using consumer profiles to increase the U.S. market for seafood: implications for aquaculture. *Aquaculture*, 127: 303-316.
- 12) HINEY, M.P., COYNE, R., KERRY J, PURSELL L, SAMUELSEN, O.B., SMITH, P. (1995). Failure of Flumisol bath treatments during commercial transport of salmon smolts to prevent the activation of stress inducible furunculosis. *Aquaculture*, 136:31-42
- 13) LUNESTAD, B., HANSEN, P.K., SAMUELSEN, O.B., & ERVIK, A. (1993). Environmental effects of antibacterial agents from aquaculture. In: Haagsma N, Ruitter A, Czedik-Eysenberg PB, (eds). Proceedings of the EuroResidue II Conference, Veldhoven, The Netherlands, pp 460-464.
- 14) MAC DOUGALL, N., & BLACK, K.D. (1999). Determining sediment properties around a marine cage farm using acoustic ground discrimination: RoxAnn (the late). *Aquaculture Research*, **30** : 451-458.

- 15) MARTINSEN, B. (1993). Quinolones as antimicrobial drugs in aquaculture: antimicrobial activities and pharmacokinetic properties. Doctoral thesis, Norwegian College of Veterinary Medicine, As
- 16) O'GRADY, P., SMITH, P.R. (1992). Use of flumisol bath treatment to eliminate stress inducible furunculosis in salmon smolts. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 12, 201-203.
- 17) RIGOS, G., TYRPENOU, A., NENGAS, I. & ALEXIS, M. (2002). A pharmacokinetic study of flumequine in sea bass, *Disentrarchus labrax* (L.), after a single intravascular injection. *Journal of Fish Diseases*, **25**, 101-105.
- 18) RIGOS, G., TYRPENOU, A.E., NENGAS, I., YIAGNISI, M., KOUTSODIMOU, M., ALEXIS, M. & TROISI, G. (2003). Pharmacokinetics of flumequine in gilthead sea bream, *Sparus aurata* and *in vitro* activity against important bacterial fish pathogens. *Diseases of Aquatic Organisms* **54**, 35-41.
- 19) RIGOS, G. & TROISI, G. (2005). Antibacterial agents in Mediterranean finfish farming: A synopsis of drug pharmacokinetics in important euryhaline fish species and possible environmental implications. *Aquatic Toxicology* **69**, 281-288.
- 20) RIGOS, G., NENGAS, I. & ALEXIS, M. (2006). Oxytetracycline (OTC) uptake following bath treatment in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 261:1151-1155.

- 21) RUITTER, A, SCHERPENISSE P, and HAJEE C.A.J. (1996). Analysis of Drug Residues in Fish. In: Haagsma N, Ruiter A, Czedik-Eysenberg PB, (eds). Proceedings of the EuroResidue III Conference, Veldhoven, The Netherlands, pp 87-98.
- 22) SAMUELSEN, O.B. (2003). Administration of the antibacterial agents flumequine and oxolinic acid to small turbot (*Scophthalmus maximus L.*) by bath. J. Appl. Ichthyol. 19, 55-58.
- 23) SAMUELSEN, O.B., ERVIK, A. (2001). Absorption, tissue distribution and excretion of flumequine and oxolinic acid in corkwing wrasse (*Symphodus melops*) following a single intraperitoneal injection or bath treatment. J. Vet. Pharm. Ther. 24, 11-116.
- 24) SAMUELSEN, O.B., LUNESTAD, B.T., JERMERT, A. (1997). Pharmacokinetics and efficacy studies on bath-administered potentiated sulfonamides in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus L.* J. Fish Dis. 20, 287-296.
- 25) SCHNEIDER, J. (1994). Problems related to the use of veterinary drugs in aquaculture-a review. *Quimica Analytica*, Suppl. 1 : S34-S42.
- 26) S. SCHWARZ., E. CHASLUS-DANCLA, INRA, EDP Sciences, 32, 201-225 (2001).

- 27) STEPHEN, C., and IWAMA, G. (1998). Salmon Aquaculture Review. Fish Health Discussion Paper. Part C. Environmental Assessment Office (EAO). University of British Columbia, Canada.
- 28) TYRPENOU, A.E., KOTZAMANIS, Y.P., ALEXIS, M.N. (2003). Flumequine depletion from muscle plus skin tissue of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed flumequine medicated feed in seawater at 18 and 24°C. *Aquaculture*, 220: 633-642.
- 29) YNDESTAD, M. (1993). Problems with drug residues in farmed fish. In: Haagsma N, Ruiter A, Czedik-Eysenberg PB,[eds]. Proceedings of the EuroResidue II Conference, Veldhoven, The Netherlands, pp 115-124.
- 30) ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ, Φ. (2008). Διδακτικές σημειώσεις του ΠΜΣ "Παθολογικά προβλήματα εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών".
- 31) ΓΑΛΑΤΟΣ, Α. (2009). Διδακτικές σημειώσεις του ΠΜΣ "Παθολογικά προβλήματα εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών".
- 32) ΓΡΑΒΙΝΙΩΤΗΣ, Φ. (1997). Από καλλιέργεια το 1 στα 4 ψάρια που καταναλώνει ο άνθρωπος.
- 33) ΕΟΦ. (2001). Φάρμακα νοσημάτων των ιχθύων. Κεφάλαιο 14. Κτηνιατρικό Συνταγολόγιο. Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων. Pharmametrika Prinshop, σελ. 281-282.

- 34) ΜΟΥΖΟΥΡΑΣ, Γ. Σ. (1996). Κτηνιατρική φαρμακολογία.
- 35) ΜΠΙΤΧΑΒΑ, Κ. (2009). Διδακτικές σημειώσεις του ΠΜΣ "Παθολογικά προβλήματα εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών".
- 36) ΚΟΥΣΟΥΡΗΣ, Σ. Θ., ΦΩΤΗΣ, Δ. Γ., ΚΟΝΙΔΗΣ, Ι. Α. (1995). Περιβάλλον & Υδατοκαλλιέργεια: Η Αμφίρροπη Σχέση των Επιπτώσεων (σελ. 33, 101-104). Έκδοση της Α.Τ.Ε., Αθήνα.
- 37) ΚΥΡΚΟΥΔΗΣ, Ι. (2006). Συμβολή στη μελέτη της μικροβιακής χλωρίδας και ιδιαίτερα των *Vibrio spp.* σε ιχθυογεννητικούς σταθμούς στην Ελλάδα.
- 38) ΠΑΠΠΙΑΣ, Ι. (2009). Διδακτικές σημειώσεις του ΠΜΣ "Παθολογικά προβλήματα εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών".
- 39) ΦΩΤΗΣ, Γ. (1999). Υδάτινο περιβάλλον, Στοιχεία ιχθυολογίας, Ιχθυοτροφία και Ιχθυολογία. Τόμος Α'. Εκτροφή και Παθολογία Ιχθύων. Εκδόσεις «Σύγχρονη Παιδεία», Θεσσαλονίκη.
- 40) ΦΩΤΗΣ, Γ. & ΑΓΓΕΛΙΔΗΣ, Π., (2001). Εκτροφή και παθολογία ιχθύων. Τόμος Α' Εκδόσεις σύγχρονη παιδεία. Θεσσαλονίκη.

41) ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ, Ε. (2008). Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης για τον προσδιορισμό κινολονών σε διάφορα δείγματα τροφίμων ζωϊκής προέλευσης και σε φαρμακευτικά σκευάσματα.

42) ΨΑΛΛΑΣ, Ζ. (1997). Μειώνονται τα αλαιοθέματα των ωκεανών. ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ: Ειδική έκδοση του Οργανισμού HELLENEWS ΕΠΕ με τη συνεργασία της εφημερίδας ΕΞΠΡΕΣ, Σεπτέμβριος.

43)(http://www.fgm.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=76%3Aproduction&catid=44%3Aproduction&lang=el)

44)(http://www.fgm.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=155%3Amediterranean-sea-bream-production&catid=116%3Amed&Itemid=233&lang=el)

45)(http://www.fgm.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=152%3Amediterranean-seabas-sproduction&catid=116%3Amed&Itemid=233&lang=el)

http://www.fgm.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=154%3Amediterranean-mariculture-industry&catid=116%3Amed&Itemid=233&lang=el

47)(http://www.fgm.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=153%3Amediterranean-mariculture-industry&catid=116%3Amed&Itemid=233&lang=el)

48)(<http://www.chemicaland21.com/arokorhi/fc/FLUOROQUINOLONES.htm>
November 2007).

49)(http://lib.njutc.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/16_monographs/monographs_d-k/index.pdf, 2005)