

ΠΑΚΕΤΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ (ΠΕ) 3- ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ PRAZIQUANTEL ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ ΤΟΥ ΜΑΓΙΑΤΙΚΟΥ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ (Π) 3.1 Πιστοποίηση πρωτοκόλλου ανάλυσης του praziquantel σε ιστούς του μαγιάτικου μέσω χρωματογραφίας

Εισαγωγή

Το μαγιάτικο (*Seriola dumerilli*) είναι ένα είδος που χαρακτηρίζεται από ταχείς ρυθμούς ανάπτυξης, υψηλή εμπορική αποδοχή και μεγάλα τελικά μεγέθη επιτρέποντας τη διεξόδου σε νέες αγορές και την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Επιπρόσθετα, σημαντικής εμπορικής σημασίας αποτελεί το γεγονός ότι η παραγωγή του συγκεκριμένου είδους δεν χαρακτηρίζεται ανταγωνιστική με την αντίστοιχη των επικρατέστερων ειδών και ειδικότερα της τσιπούρας (*Sparus aurata*) και του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*).

Αναφορικά με τα προβλήματα εκτροφής του μαγιάτικου, η πρόοδος που έχει σημειωθεί, λόγω της εκτεταμένης έρευνας τόσο σε εγχώριο όσο και σε διεθνές επίπεδο, είναι σημαντική. Ωστόσο, σε εξέλιξη βρίσκονται οι έρευνες που εστιάζουν στην αποτελεσματική και πρακτική αντιμετώπιση μονογενών εξωπαρασίτων (*Zeuxapta seriolae*) που προσβάλλουν τα βράγχια και δημιουργούν σοβαρές εποχιακές θνησιμότητες στο εκτρεφόμενο μαγιάτικο (Montero et al., 2004; Lu et al., 2012).

Για την αντιμετώπιση της παρασίτωσης έχει αξιολογηθεί η εφαρμογή εμβαπτίσεων με τη χρήση διάφορων ουσιών στους κλωβούς, διαδικασίες όμως που χαρακτηρίζονται από σοβαρές πρακτικές δυσκολίες και ανά περίπτωση, περιβαλλοντικές παρενέργειες. Ιδανικά, η αντιμετώπιση της ασθένειας μέσω χορήγησης φαρμακούχας τροφής θα πρόσδιδε πολλαπλά οφέλη περιορίζοντας σημαντικά τα προβλήματα που συνδέονται με την εφαρμογή εμβαπτίσεων.

Το Praziquantel (PZQ) είναι ένα ευρέου φάσματος ανθελμινθικό φάρμακο (Watson, 2009), το οποίο είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό έναντι μονογενών παρασίτων ιχθύων (Buchmann, 1987, Hirazawa et al., 2000, 2004). Η εφαρμογή εμβαπτίσεων με τη χρήση PZQ είναι επίσης αποτελεσματική (Kim and Cho, 2000) αλλά φέρει παρόμοιες δυσκολίες και περιβαλλοντικές επιπτώσεις με τις λοιπές δοκιμασμένες ουσίες. Η διατροφική χορήγηση του συγκεκριμένου φαρμάκου έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας σε πλήθος εκτρεφόμενων ιχθυρών. Αν και μέχρι σήμερα πρόκληση για την αποτελεσματική εκ του στόματος χορήγηση του PZQ σε ιχθύες αποτελεί η δεκτικότητα της τροφής, λόγω της δυσάρεστης γεύσης του (Williams et al., 2007, Hirazawa et al., 2013, Partridge et al., 2016), τα προκαταρκτικά αποτελέσματα της διατροφικής

του χρήσης για την αντιμετώπιση μονογενών παρασίτων είναι ελπιδοφόρα (Hirazawa et al., 2004; Sitja-Bobadilla et al., 2006; Tubbs and Tingle, 2006; Williams et al., 2007; Yamamoto et al., 2011).

Όσον αφορά στην ασφάλειά του χρήση από πλευράς ασφαλούς κατανάλωσης, σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό Γραφείο Αξιολόγησης Φαρμακευτικών Προϊόντων (EMA, 1998) δεν υπάρχει αναγκαιότητα καθορισμού του μεγίστου ορίου καταλοίπων (Minimum Residue Limit, MRL) για το PZQ στα εκτρεφόμενα ζώα. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι, κατάλοιπα της ουσίας παραμένουν για τουλάχιστον 4 ημέρες μετά τη χορήγηση μέσω της τροφής σε εκτρεφόμενα ψάρια (Kim et al. 2001) και 7 παράγωγα μεταβολισμού από υδροξυλίωση έχουν ανιχνευθεί σε συγγενικό είδος του μαγιάτικου (Tubbs et al., 2008).

Σε αυτή την υποενότητα εργασίας (παραδοτέο) περιγράφονται οι μέθοδοι εκχύλισης και προσδιορισμού με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας (HPLC) του ανθελμινθικού φαρμάκου PZQ που δοκιμάστηκαν στους υπό εξέταση ιστούς μαγιάτικου (αίμα, βράγχια και μυς με δέρμα). Τα ευρήματα των αναλύσεων αξιολογήθηκαν ώστε να επιλεγθούν οι καταλληλότερες πρακτικές, αυτές δηλαδή που επιτρέπουν την υψηλότερη εκατοστιαία ανάκτηση της ουσίας από τους ελεγχένους ιστούς, επιτρέποντας τον ασφαλή προσδιορισμό της από αυτούς και οι οποίες παρουσιάζονται κατωτέρω. Οι επιλεγμένες μέθοδοι θα εφαρμοστούν για τον έλεγχο των ποσοτήτων του PZQ σε δείγματα πλάσματος, βράγχιων και μυός (με δέρμα) έπειτα από διατροφική χορήγηση του ώστε να αποκτηθεί γνώση της φαρμακοκινητικής του PZQ στο εκτρεφόμενο μαγιάτικο.

Υλικά και μέθοδοι

Ιχθύες: Ιχθύες (*Seriola dumerili*) μέσου βάρους 84 ± 12 g μεταφέρθηκαν από μονάδα παραγωγής της εταιρίας Αργοσαρωνικός και τοποθετηθήκαν σε πειραματικούς κλωβούς στις πειραματικές εγκαταστάσεις του ΕΛΚΕΘΕ. Ιστοί και συγκεκριμένα αίμα, βράγχια και μυς με δέρμα παραλήφθηκαν από 20 υποκείμενα. Μετά την απομόνωση του πλάσματος από το αίμα, με προσθήκη ηπαρίνης και φυγοκέντρωση, οι ιστοί αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι περαιτέρω ανάλυσης.

Μέθοδος εκχύλισης για την παραλαβή του PZQ από πλάσμα: Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ανθελμινθικού φαρμάκου PZQ στους πλάσμα έγινε με τη βοήθεια υγρής χρωματογραφίας μετά από δοκιμές δημοσιευμένων μεθοδολογιών με ή χωρίς τροποποιήσεις.

Η αναλυτική διαδικασία προπαρασκευής του κάθε δείγματος ιστού και της υγρής χρωματογραφίας δίνεται παρακάτω:

Τυφλός προσδιορισμός: Με αυτόματη επαναλαμβανόμενη πιπέτα παραλήφθηκαν 500μL πλάσματος και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα φυγοκέντρου των 12mL. Στο πλάσμα προστέθηκαν στάγδην υπό ανάδευση 100μL διαλύματος ZnSO₄ συγκέντρωσης 0.2M. Ακολούθως, προστέθηκαν 2mL ακετονιτριλίου επίσης στάγδην και υπό ανάδευση. Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε μαγνητική πλάκα όπου πραγματοποιήθηκε ανάδευση του δείγματος για 10min. Στη συνέχεια, έπειτα από φυγοκέντρωση (συνθήκες φυγοκέντρωσης: 10,000g, 10min, 10°C) πραγματοποιήθηκε παραλαβή του υπερκειμένου. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα πολυπρετυλενίου των 15mL και το εναπομένον ίζημα εκχυλίστηκε για ακόμα μία φορά έπειτα από προσθήκη 2mL ακετονιτριλίου στάγδην και υπό ανάδευση. Το ομογενοποίηση αναδεύτηκε, φυγοκετρήθηκε εκ νέου, όπως περιγράφεται ανωτέρω και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε ομοίως στον προαναφερθέν δοκιμαστικό σωλήνα. Τα 4mL εξατμίστηκαν έως ξηρού υπό ρεύμα N₂ σε υδατόλουτρο υπό σταθερή θερμοκρασία (45°C). Ακολούθησε ανασύσταση με την προσθήκη αρχικά 350μL ακετονιτριλίου και στη συνέχεια 750μL υπερκάθου νερού. Το δείγμα φιλτραρίστηκε (0.22μm) και μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο των 2mL ώστε να αναλυθεί σε HPLC UV.

Εμβολιασμός με διάλυμα PZQ γνωστής συγκέντρωσης: Στο δείγμα πλάσματος (500μL) προστέθηκε κατάλληλος όγκος διαλύματος PZQ γνωστής συγκέντρωσης (0.01-10μg/mL), ώστε να εκτιμηθεί η ικανότητα ανάκτησης του φαρμάκου. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στη συνέχεια είναι όμοια με αυτή που περιγράφεται ανωτέρω για τον τυφλό προσδιορισμό.

Μέθοδος εκχύλισης για την παραλαβή του PZQ από μυ και βράγχια: Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ανθελμινθικού φαρμάκου PZQ σε ιστούς μυός και βράγχιων έγινε με τη βοήθεια υγρής χρωματογραφίας μετά από δοκιμές δημοσιευμένων μεθοδολογιών με τροποποιήσεις (Tubbs & Tingle, 2006).

Τυφλός προσδιορισμός: Οι ιστοί (0.5g) τεμαχίστηκαν με τη βοήθεια ψαλιδιού και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα φυγοκέντρου των 12mL. Ακολούθησε προσθήκη 3mL οξικού αιθυλεστέρας και το δείγμα ομοιογενοποιήθηκε. Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε μαγνητική πλάκα όπου πραγματοποιήθηκε ανάδευση του δείγματος για 10min. Στη συνέχεια, έπειτα από φυγοκέντρωση (συνθήκες φυγοκέντρωσης: 10,000g, 10min, 10°C) πραγματοποιήθηκε παραλαβή του υπερκειμένου και μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα πολυπρετυλενίου των 15mL. Ακολούθως η υγρή εκχύλιση επαναλήφθηκε με οξικό αιθυλεστέρα (2mL). Το ομογενοποίηση αναδεύτηκε, φυγοκετρήθηκε εκ νέου, όπως περιγράφεται ανωτέρω και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε ομοίως στον προαναφερθέν δοκιμαστικό σωλήνα. Τα 5mL εξατμίστηκαν έως ξηρού υπό ρεύμα N₂ σε υδατόλουτρο υπό σταθερή θερμοκρασία (45°C). Το ξηρανθέν υπόλειμμα επαναιωρήθηκε σε εξάνιο (2.5mL), αναδεύτηκε και φορτώθηκε σε ενεργοποιημένη στήλη ενεργοποιημένης πυριτίου

(Isolute 500 mg SI, IST). Η στήλη στη συνέχεια ξεπλύθηκε με 15% v/v διαιθυλαιθέρα-εξάνιο (2.5mL). Το PZQ εκλούστηκε από τη στήλη με 70% ακετόνη σε εξάνιο (2.5mL) και εξατμίστηκε όπως παραπάνω. Ακολούθησε ανασύσταση με την προσθήκη αρχικά 350μL ακετονιτριλίου και στη συνέχεια 750μL υπερκάθαρου νερού. Το δείγμα φιλτραρίστηκε (0.22μm) και μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο των 2mL ώστε να αναλυθεί σε HPLC UV.

Εμβολιασμός με διάλυμα PZQ γνωστής συγκέντρωσης: Στο δείγμα προστέθηκε κατάλληλος όγκος διαλύματος PZQ γνωστής συγκέντρωσης (0.01-10μg/mL), ώστε να εκτιμηθεί η ικανότητα ανάκτησης του φαρμάκου. Έπειτα από 5min αναμονής, η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι όμοια με αυτή που περιγράφεται ανωτέρω για τον τυφλό προσδιορισμό.

Μέθοδος έκλουσης HPLC-UV:

Στήλη: Luna C18 150x4.6mm, 5μ

Προστήλη: C18 4x3.00mm

Κινητή φάση (πίνακας 1): H₂O (A)/Ακετονιτρίλιο (B)

Πίνακας 1. Βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης

Χρόνος (min)	Ροή (mL/min)	A%	B%	Καμπύλη (curve)
	1.00	65	35	
20.00	1.00	65	35	11
21.00	1.00		100	6
35.00	1.00		100	11
36.00	1.00	65	35	6

Ανιχνευτής UV: 210nm

Θερμοκρασία στήλης: 30°C

Θερμοκρασία αυτόματου δειγματολήπτη: 20°C

Πιστοποίηση μεθόδου:

Επιλεκτικότητα και ευαισθησία

Η εκλεκτικότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε με την παρασκευή και ανάλυση 20 τυφλών και εμβολιασμένων δειγμάτων. Οι πιθανές παρεμβολές από ενδογενείς ουσίες εκτιμήθηκαν παρατηρώντας τα χρωματογραφήματα των τυφλών δειγμάτων και των δειγμάτων ιστών.

Η ευαισθησία της μεθόδου αξιολογήθηκε με τα όρια ανίχνευσης (LODs) και τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQs). Το όριο ανίχνευσης μιας μεθόδου είναι η ελαχίστη συγκέντρωση μιας ουσίας που μπορεί να μετρηθεί με τη μέθοδο αυτή. Η συγκέντρωση αυτή δεν αποτελεί αξιόπιστη μέτρηση και αποτελεί απλά μια τιμή συγκέντρωσης πάνω από αυτή του τυφλού. Μαθηματικά υπολογίστηκε ως η ελαχίστη συγκέντρωση της ουσίας που έχει συγκέντρωση τριπλάσια από την τυπική απόκλιση διαδοχικών μετρήσεων του τυφλού.

Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) ή λειτουργική ευαισθησία είναι η ελαχίστη συγκέντρωση της μετρούμενης παραμέτρου που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με αποδεκτή ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Μαθηματικά υπολογίστηκε ως η ελαχίστη συγκέντρωση της ουσίας που έχει συγκέντρωση δεκαπλάσια από την τυπική απόκλιση διαδοχικών μετρήσεων του τυφλού.

Γραμμικότητα

Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με βάση το εμβαδόν των κορυφών και τις συγκεντρώσεις προτύπων διαλυμάτων εργασίας. Οι συγκεντρώσεις που εκτιμήθηκαν ήταν οι 10.0, 5.0, 2.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.10, 0.05, 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ που παρασκευάστηκαν με αραιώση του μητρικού διαλύματος (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) με ακετονιτρίλιο-νερό (35:65, v/v). Η ανάλυση έγινε με ισοκρατική έκλουση και πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

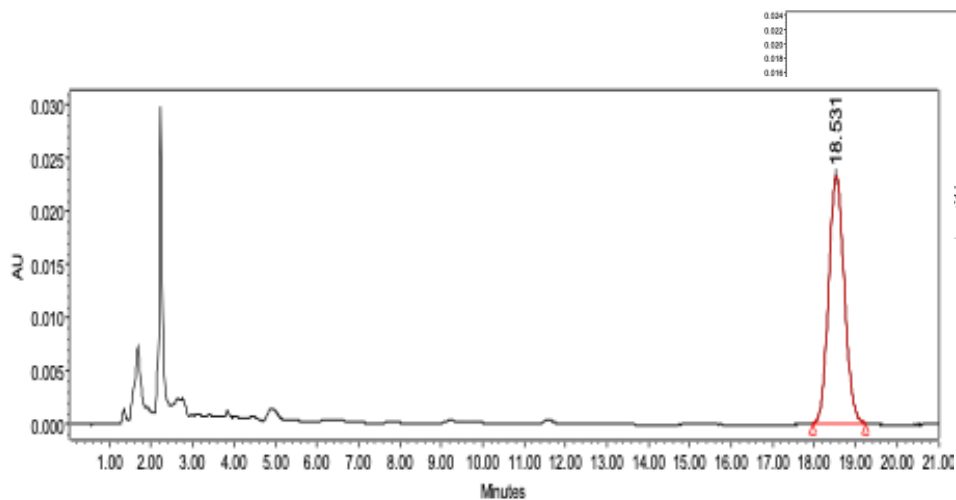
Ακρίβεια

Η ακρίβεια της μεθόδου αξιολογήθηκαν με προσδιορισμό της εκατοστιαίας ανάκτησης του PZQ στα δείγματα ιστών σε συγκεντρώσεις 0.05, 0.5, 1 και 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ εις επταπλούν. Η ανάκτηση της μεθόδου υπολογίστηκε συγκρίνοντας την προσδιορισμένη συγκέντρωση των εμβολιασμένων δειγμάτων με τις θεωρητικές συγκεντρώσεις.

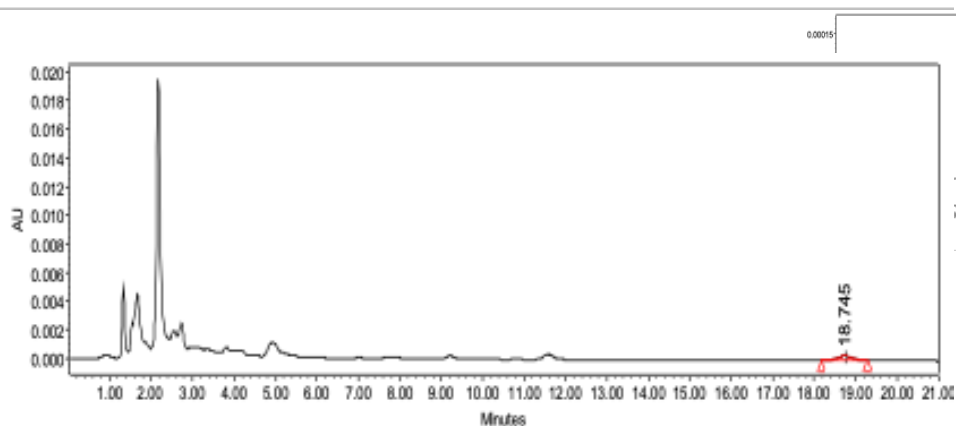
Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Επιλεκτικότητα και ευαισθησία

Δεν παρατηρήθηκε σημαντική παρεμβολή στον χρόνο έκλουσης. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα τυφλών δειγμάτων και εμβολιασμένων δειγμάτων παρουσιάζονται στο σχήμα 1.



A. Εμβολιασμένο δείγμα



B. Τυφλό δείγμα

Σχήμα 1. A. Χρωματογραφήματα HPLC εμβολιασμένου δείγματος (1μg/mL), B. χρωματογραφήματα HPLC τυφλού δείγματος

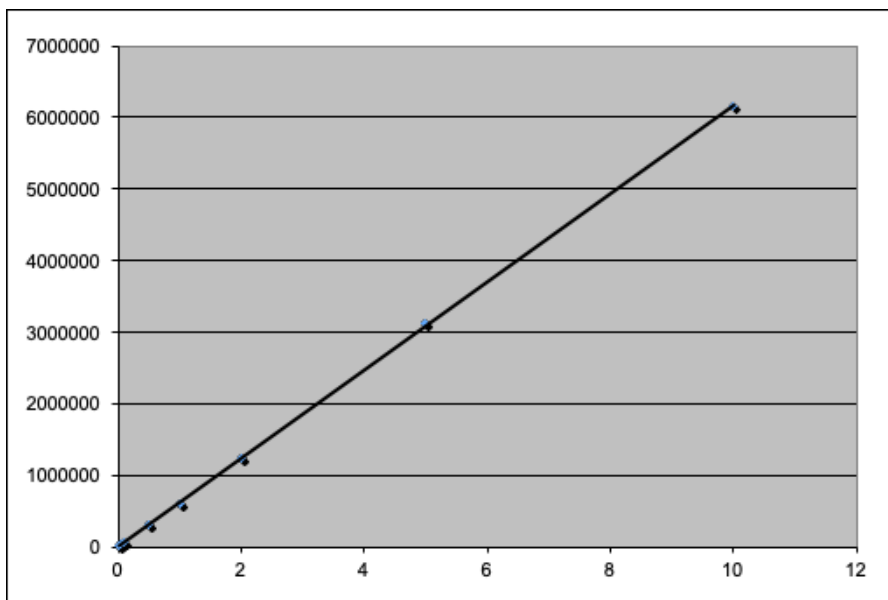
Οι τιμές LOD και LOQ ήταν για τα δείγματα πλάσματος υπολογίσθηκαν 0.015μg/mL και 0.025μg/mL, αντίστοιχα.

Γραμμικότητα

Η καμπύλη αναφοράς (σχήμα 2) ήταν της μορφής $Y = aX + b$, όπου Y είναι το εμβαδόν της κορυφής της υπό εξέταση ουσίας, X είναι η συγκέντρωση (μg/mL), a είναι η κλίση και b είναι η τεταγμένη επί την αρχή. Οι τιμές των παραμέτρων παλινδρόμησης παρουσιάζονται αναλυτικότερα στον πίνακα 2.

Πίνακας 2. Εξίσωση και παράμετροι παλινδρόμησης του PZQ

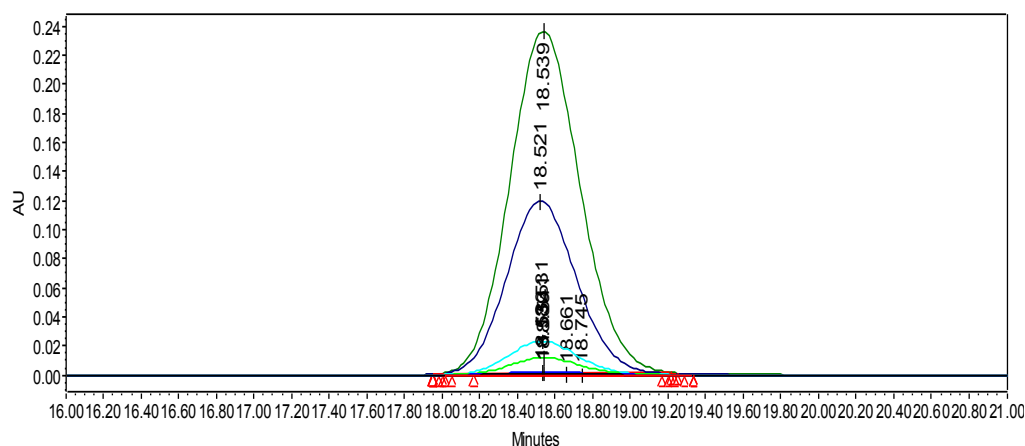
Εξίσωση	Κλίση	Τεταγμένη	Εύρος (μg/mL)	R ²
$Y = 616515X + 5948.4$	616515	5948.4	0.01-10	1



Σχήμα 2. Πρότυπη καμπύλη PZQ

Ακρίβεια

Στα εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος σε επίπεδα 0.05, 0.5, 1 και 5μg/mL οι τιμές ανάκτησης του αντιπαρασιτικού φαρμάκου PZQ προσδιορίστηκαν μεταξύ 88.5-101.5%.



Σχήμα 3. Χρωματογράφημα εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό του αντιπαρασιτικού φαρμάκου PZQ στα δείγματα ιστού μαγιάτικου είναι ευαίσθητη και ακριβής. Η εκχύλιση πολλαπλών σταδίων και ο χρόνος έκλουσης της ουσίας από τη χρωματογραφική στήλη (18.5min) απαιτούν χρόνο, ωστόσο η εκατοστιαία ανάκτηση είναι σε υψηλά επίπεδα, συγκριτικά με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Hormazabal & Yndestad, 1995, Tubbs & Tingle, 2006) ενώ το κόστος των αναλωσίμων που απαιτούνται για τη μέθοδο είναι σχετικά χαμηλό.

Βιβλιογραφία

- Buchmann, K. (1987). Effects of praziquantel on the monogenean gill parasite *Pseudodactylogyrus bini*. *Acta Vet. Scand.*, 28, 447-450.
- EMA (1998) The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines Evaluation Unit. EMA/MRL/523/98-FINAL. COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS. PRAZIQUANTEL. REPORT (2)
- Hirazawa, N., Akiyama, K., & Umeda, N. (2013). Differences in sensitivity to the anthelmintic praziquantel by the skin-parasitic monogeneans *Benedenia seriolae* and *Neobenedenia girellae*. *Aquaculture*, 404, 59-64.
- Hirazawa, N., Mitsuboshi, T., Hirata, T., & Shirasu, K. (2004). Susceptibility of spotted halibut *Verasper variegatus* (Pleuronectidae) to infection by the monogenean *Neobenedenia girellae* (Capsalidae) and oral therapy trials using praziquantel. *Aquaculture*, 238(1-4), 83-95.
- Hirazawa, N., Mitsuboshi, T., Hirata, T., & Shirasu, K. (2004). Susceptibility of spotted halibut *Verasper variegatus* (Pleuronectidae) to infection by the monogenean *Neobenedenia girellae* (Capsalidae) and oral therapy trials using praziquantel. *Aquaculture*, 238(1-4), 83-95.
- Hirazawa, N., Ohtaka, T., & Hata, K. (2000). Challenge trials on the anthelmintic effect of drugs and natural agents against the monogenean *Heterobothrium okamotoi* in the tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Aquaculture*, 188(1-2), 1-13.
- Hormazabal, V., & Yndestad, M. (1995). High-performance liquid chromatographic determination of praziquantel in plasma and tissues of cultured fish for residue and pharmacokinetic studies. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 18(3), 589-597.
- Kim, K. H., & Cho, J. B. (2000). Treatment of *Microcotyle sebastis* (Monogenea: Polyopisthocotylea) infestation with praziquantel in an experimental cage simulating commercial rockfish *Sebastes schlegeli* culture conditions. *Diseases of aquatic organisms*, 40(3), 229-231.
- Kim, K. H., Kim, C. S., & Kim, J. W. (2001). Depletion of praziquantel in plasma and muscle tissue of cultured rockfish *Sebastes schlegeli* after oral and bath treatment. *Diseases of aquatic organisms*, 45(3), 203-207.
- Lu, C. H., Ku, C. C., Wen, C. M., & Chen, S. N. (2012). Effects of the Gill Parasite *Zeuxapta seriolae* (Monogenea: Heteraxinidae) on the Sea Cage-cultured Amberjack *Seriola dumerili* (Risso, 1810) at Penghu Island (Pescadores), Taiwan. *J. Fish. Soc. Taiwan*, 39(2), 107-114.
- Montero, F. E., Crespo, S., Padrós, F., De la Gándara, F., García, A., & Raga, J. A. (2004). Effects of the gill parasite *Zeuxapta seriolae* (Monogenea: Heteraxinidae) on the amberjack *Seriola dumerili* Risso (Teleostei: Carangidae). *Aquaculture*, 232(1-4), 153-163.
- Partridge, G. J., Burge, T., & Lymbery, A. J. (2017). A comparison of the palatability of racemic praziquantel and its two enantioseparated isomers in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833). *Aquaculture research*, 48(4), 1735-1743.
- Sitjà-Bobadilla, A., de Felipe, M. C., & Alvarez-Pellitero, P. (2006). In vivo and in vitro treatments against *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Microcotylidae) parasitizing the gills of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 261(3), 856-864.
- Tubbs, L. A., & Tingle, M. D. (2006). Bioavailability and pharmacokinetics of a praziquantel bolus in kingfish *Seriola lalandi*. *Diseases of aquatic organisms*, 69(2-3), 233-238.
- Tubbs, L., Mathieson, T., & Tingle, M. (2008). Metabolism of praziquantel in kingfish *Seriola lalandi*. *Diseases of aquatic organisms*, 78(3), 225-233.
- Watson, M. (2009). Praziquantel. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18(3), 229-231.

Williams, R. E., Ernst, I., Chambers, C. B., & Whittington, I. D. (2007). Efficacy of orally administered praziquantel against *Zeuxapta seriolae* and *Benedenia seriolae* (Monogenea) in yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 77(3), 199-205.

Yamamoto, S., Shirakashi, S., Morimoto, S., Ishimaru, K., & Murata, O. (2011). Efficacy of oral praziquantel treatment against the skin fluke infection of cultured chub mackerel, *Scomber japonicus*. *Aquaculture*, 319(1-2), 53-57.

Filename: παραδοτέο 3.1 final.docx
Folder: /Users/dimitrakogiannou/Library/Containers/com.microsoft.Word/Data/Documents
Template: /Users/dimitrakogiannou/Library/Group Containers/UBF8T346G9.Office/User Content.localized/Templates.localized/Normal.dotm
Title:
Subject:
Author: grigos
Keywords:
Comments:
Creation Date: 26/03/2019 12:25
Change Number: 2
Last Saved On: 26/03/2019 12:25
Last Saved By: Microsoft Office User
Total Editing Time: 0 Minutes
Last Printed On: 26/03/2019 12:25
As of Last Complete Printing
Number of Pages: 9
Number of Words: 2.408 (approx.)
Number of Characters: 13.730 (approx.)

ΠΑΚΕΤΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ (ΠΕ) 3- ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ PRAZIQUANTEL ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ Π3.2 Φαρμακοκινητική ανάλυση της praziquantel σε ιστούς του μαγιάτικου μέσω χρωματογραφίας

Εισαγωγή

Η εκτροφή του μαγιάτικου (*Seriola dumerili*) μαστίζεται από μονογενή παράσιτα (*Zeuxaptas seriolae*) που προσβάλλουν τα βράγχια του ψαριού και δημιουργούν σοβαρές εποχιακές θνησιμότητες (Montero et al., 2004; Lu et al., 2012). Οι θνησιμότητες μπορούν να ξεπεράσουν περιστασιακά το 60-70% με καταστροφικές συνέπειες στην τελική παραγωγή του συγκεκριμένου είδους. Η εύρεση μίας αποτελεσματικής θεραπευτικής αγωγής που θα χορηγείται μέσω της τροφής, θα αυξήσει εμφανώς την τελική παραγωγή του προϊόντος, θα ελαχιστοποιήσει τις πρακτικές δυσκολίες θεραπειών με εμβλαπτίσεις και φυσικά θα μειώσει τις περιβαλλοντικές παρενέργειες. Η πραζικουαντέλη (Praziquantel-PZQ) είναι ένα ευρέος φάσματος ανθελμινθικό φάρμακο και αποτελεί την ιδανική αντιπαρασιτική ουσία για την αντιμετώπιση των συγκεκριμένων παρασίτων η οποία φαίνεται να είναι εξαιρετικά αποτελεσματική έναντι μονογενών παρασίτων ιχθύων (Buchmann, 1987, Hirazawa et al., 2000; 2004; 2013). Προβληματισμός υπάρχει για την αποτελεσματική διατροφική χορήγηση της PZQ σε εκτρεφόμενα ψάρια λόγω της πικρής γεύσης της (Williams et al., 2007, Hirazawa et al., 2013, Partridge et al., 2016). Σχετικά με την ασφαλή κατανάλωση ιχθύων που τους έχει χορηγηθεί η ουσία, σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό Γραφείο Αξιολόγησης Φαρμακευτικών Προϊόντων (EMA, 1998), δεν υπάρχει αναγκαιότητα καθορισμού του μεγίστου ορίου καταλοίπων (Maximum Residue Limit, MRL) της PZQ στα εκτρεφόμενα ζώα/ψάρια, λόγω της μη συσσώρευσης της στους ζωικούς ιστούς.

Σε αυτό το παραδοτέο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης της PZQ με τη χρήση επιλεγμένων μεθόδων σε δείγματα πλάσματος (κατά τη διάρκεια της θεραπείας), βράγχιων και μυός με δέρμα (μετά την αποπεράτωση της θεραπείας) έπειτα από διατροφική χορήγηση της ώστε να αποκτηθεί γνώση της φαρμακοκινητικής στο εκτρεφόμενο μαγιάτικο.

Υλικά και μέθοδοι

Ιχθύες: Μαγιάτικα (*Seriola dumerili*) μέσου βάρους 84 ± 12 g μεταφέρθηκαν από μονάδα παραγωγής της εταιρίας Αργοσαρωνικός και τοποθετήθηκαν σε πειραματικούς κλωβούς στις πειραματικές

εγκαταστάσεις του ΕΛΚΕΘΕ στην Αττική. Εβδομήντα οχτώ ιχθύες τοποθετήθηκαν σε τέσσερις κλωβούς χωρητικότητας 1m³ τοποθετημένους σε τσιμεντένια δεξαμενή (50m³), με αποτέλεσμα η συνολική βιομάζα ανά κλωβό να ισούται με περίπου 6.5kg. Η θερμοκρασία και η αλατότητα του νερού κατά τη διάρκεια της δοκιμής ήταν 24.5°C και 38‰, αντίστοιχα. Οι ιχθύες εγκλιματίστηκαν για 10 ημέρες πριν την έναρξη της δοκιμής, περίοδος κατά την οποία τους δόθηκε εμπορικό σιτηρέσιο (της εταιρείας Ζωονομή Πίνακας 1) σε ποσότητα ίση με 2% του σωματικού τους βάρους. Με σκοπό να εξασφαλιστεί η ίδια διατροφική κατάσταση, 24 ώρες πριν από τη χορήγηση της φαρμακευτικής τροφής στους ιχθύες δεν δόθηκε τροφή.

Πίνακας 1. Εκατοστιαία σύσταση εμπορικού σιτηρεσίου

Σύσταση εμπορικού σιτηρεσίου %	
Πρωτεΐνη	55.0
Λίπος	17.0
Τέφρα	13.0
Ινώδη	0.4

Παρασκευή φαρμακούχων τροφών: Η παρασκευή των φαρμακούχων πειραματικών σιτηρεσίων πραγματοποιήθηκε με συσκευή Hobart. Αναλυτικά, παρασκευάστηκαν δύο σιτηρέσια διαφορετικής συγκέντρωσης πραζικουαντέλης (100% PZQ), για το Trial A: 75mg και το Trial B: 150mg/kg ιχθύος. Η εκατοστιαία περιεκτικότητα των πρώτων υλών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των τροφών παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 1. Εκατοστιαία περιεκτικότητα των πρώτων υλών των φαρμακούχων σιτηρεσίων

Σύσταση %	
Fish meal 68	60.00
Krill meal	12.00
Wheat meal	18.25
Wheat gluten	3.00
Fish oil	5.00
Vitamins	0.27
Attractant	1.50
PZQ TRIAL A	0.75
PZQ TRIAL B	1.50

Χορήγηση φαρμακούχας τροφής: Η χορήγηση της φαρμακούχας τροφής πραγματοποιούνταν μια φορά ημερησίως για 5 ημέρες, στις 12:00μ.μ σε ποσότητα ίση με 2% του σωματικού τους βάρους. Η δεκτικότητα και συγκεκριμένα η κατανάλωση της τροφής καταγραφόταν καθημερινά. Η τελική υπολογισμένη δοσολογία της φαρμακούχας ουσίας ήταν στο Trial A 75mg/kg ιχθύος ανά ημέρα και Trial B 150mg/kg ιχθύος ανά ημέρα.

Συλλογή δειγμάτων πλάσματος: Η συνολική διάρκεια συλλογής δειγμάτων ήταν 6 ημέρες. 7-10 ιχθύες/χρονικό σημείο/Trial μεταφέρονταν σε 5l θαλασσινού νερού παρουσία αναισθητικού (1ppm γαρυφαλέλαιο 10%) και δείγμα αίματος παραλαμβάνονταν μεταξύ του ουριαίου πτερυγίου και της έδρας με σύριγγα (2ml) που περιείχε 250μl ηπαρίνης (5000IU/ml). Την πρώτη ημέρα της μελέτης και για τα δυο Trial δείγματα παραλήφθηκαν ύστερα από 2, 4, 8 και 24 ώρες από τη χορήγηση της φαρμακούχας τροφής ενώ τις υπόλοιπες ημέρες της πειραματικής διαδικασίας δείγματα παραλήφθηκαν αποκλειστικά έπειτα από 24 ώρες από την εκάστοτε χορήγηση των φαρμακώχων σιτηρεσιών (ημέρα 2-ημέρα 5). Τα δείγματα αίματος τοποθετήθηκαν σε φιαλίδιο τύπου erpendorf (1.5ml) όπου φυγοκεντρήθηκαν για 10min στις 14,000rpm. Τα δείγματα πλάσματος μεταφέρθηκαν σε νέο σε φιαλίδιο και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη (-20°C) έως ότου αναλυθούν. Τα δείγματα πλάσματος που συνολικά συλλέχθηκαν ισούταν με 118.

Συλλογή δειγμάτων μυός με δέρμα και βράγχιων: Η συνολική διάρκεια συλλογής δειγμάτων ήταν 6 ημέρες. Σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία έπειτα από τη χορήγηση της φαρμακούχας τροφής (ημέρες: 6, 7, 8, 9, 10 και 12 έπειτα της παρέμβαση) 10 ιχθύες/χρονικό σημείο/Trial θανατώθηκαν με περίσσεια αναισθητικού και δείγματα θωρακικού μυός με δέρμα (10 δείγματα) καθώς και βράγχιων (5 δείγματα) παρελήφθησαν και αποθηκεύτηκαν (-20°C) έως ότου αναλυθούν. Τα δείγματα μυός και βραγχίων που συνολικά συλλέχθηκαν ισούταν με 120 και 60, αντίστοιχα.

Μέθοδος εκχύλισης για την παραλαβή του PZQ από πλάσμα: Με αυτόματη επαναλαμβανόμενη πιπέτα παραλήφθηκαν 500μl πλάσματος και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα φυγοκέντρου των 12ml. Στο πλάσμα προστέθηκαν στάγδην υπό ανάδευση 100μl διαλύματος ZnSO₄ συγκέντρωσης 0.2M. Ακολούθως, προστέθηκαν 2ml ακετονιτριλίου επίσης στάγδην και υπό ανάδευση. Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε μαγνητική πλάκα όπου πραγματοποιήθηκε ανάδευση του δείγματος για 10min. Στη συνέχεια, έπειτα από φυγοκέντρωση (συνθήκες φυγοκέντρωσης: 10,000g, 10min, 10°C) πραγματοποιήθηκε παραλαβή του υπερκείμενου. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα πολυπρεπυλενίου των 15ml και το εναπομένον ίζημα εκχυλίστηκε για ακόμα μία φορά έπειτα από προσθήκη 2ml ακετονιτριλίου στάγδην και υπό ανάδευση. Το ομογενοποίημα αναδεύτηκε, φυγοκετρήθηκε εκ νέου, όπως περιγράφεται ανωτέρω και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε ομοίως στον προαναφερθέν δοκιμαστικό σωλήνα. Τα 4ml εξατμίστηκαν έως ξηρού υπό ρεύμα N₂ σε υδατόλουτρο υπό σταθερή θερμοκρασία (45°C). Ακολούθησε ανασύσταση με την προσθήκη αρχικά 350μl ακετονιτριλίου και στη συνέχεια 750μl υπερκάθαρου νερού. Το δείγμα φιλτραρίστηκε (0.22μm) και μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο των 2ml ώστε να αναλυθεί σε HPLC UV.

Μέθοδος εκχύλισης για την παραλαβή του PZQ από μυ και βράγχια: Οι ιστοί (1g) τεμαχίστηκαν με τη βοήθεια ψαλιδιού και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα φυγοκέντρου των 50ml. Ακολούθησε

προσθήκη 6ml οξικού αιθυλεστέρας και το δείγμα ομοιογενοποιήθηκε. Οι σωλίνες τοποθετήθηκαν σε μαγνητική πλάκα όπου πραγματοποιήθηκε ανάδευση του δείγματος για 10min. Στη συνέχεια, έπειτα από φυγοκέντρηση (συνθήκες φυγοκέντρησης: 10,000g, 10min, 10°C) πραγματοποιήθηκε παραλαβή του υπερκείμενου και μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα πολυρεπυλενίου των 15ml. Ακολούθως η υγρή εκχύλιση επαναλήφθηκε με οξικό αιθυλεστέρα (4ml). Το ομογενοποίημα αναδεύτηκε, φυγοκετρήθηκε εκ νέου, όπως περιγράφεται ανωτέρω και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε ομοίως στον προαναφεθέν δοκιμαστικό σωλήνα. Τα 10ml εξατμίστηκαν έως ξηρού υπό ρεύμα N₂ σε υδατόλουτρο υπό σταθερή θερμοκρασία (45°C). Το ξηρανθέν υπόλειμμα επαναιωρήθηκε σε εξάνιο (2.5ml), αναδεύτηκε και φορτώθηκε σε ενεργοποιημένη στήλη ενεργοποιημένης πυριτίου (Isolute 500 mg SI, IST). Η στήλη στη συνέχεια ξεπλύθηκε με 15% v/v διαιθυλαιθέρα-εξάνιο (5ml). Το PZQ εκλούστηκε από τη στήλη με 70% ακετόνη σε εξάνιο (5ml) και εξατμίστηκε όπως παραπάνω. Ακολούθησε ανασύσταση με την προσθήκη αρχικά 350μl ακετονιτρίλιου και στη συνέχεια 750μl υπερκάθαρου νερού. Το δείγμα φιλτραρίστηκε (0.22μm) και μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο των 2ml ώστε να αναλυθεί σε HPLC UV.

Μέθοδος έκλουσης HPLC-UV:

Στήλη: Luna C18 150×4.6mm, 5μ

Προστήλη: C18 4x3.00mm

Κινητή φάση (πίνακας 1): H₂O (A)/Ακετονιτρίλιο (B)

Πίνακας 3. Βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης

ΧΡΟΝΟΣ (min)	ΡΟΗ (ml/min)	A%	B%	ΚΑΜΠΥΛΗ (CURVE)
	1.00	65	35	
20.00	1.00	65	35	11
21.00	1.00		100	6
35.00	1.00		100	11
36.00	1.00	65	35	6

Ανιχνευτής UV: 210nm

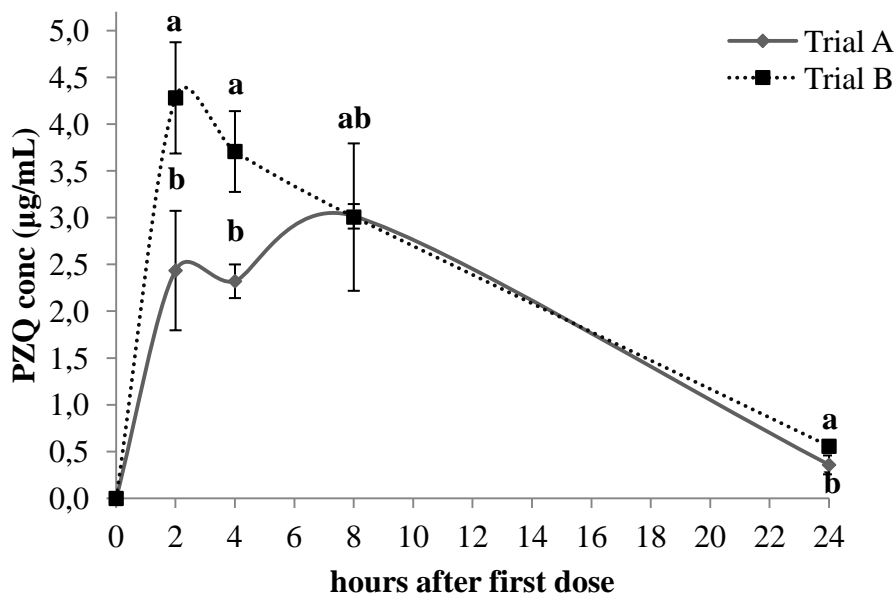
Θερμοκρασία στήλης: 30°C

Θερμοκρασία αυτόματου δειγματολήπτη: 20°C

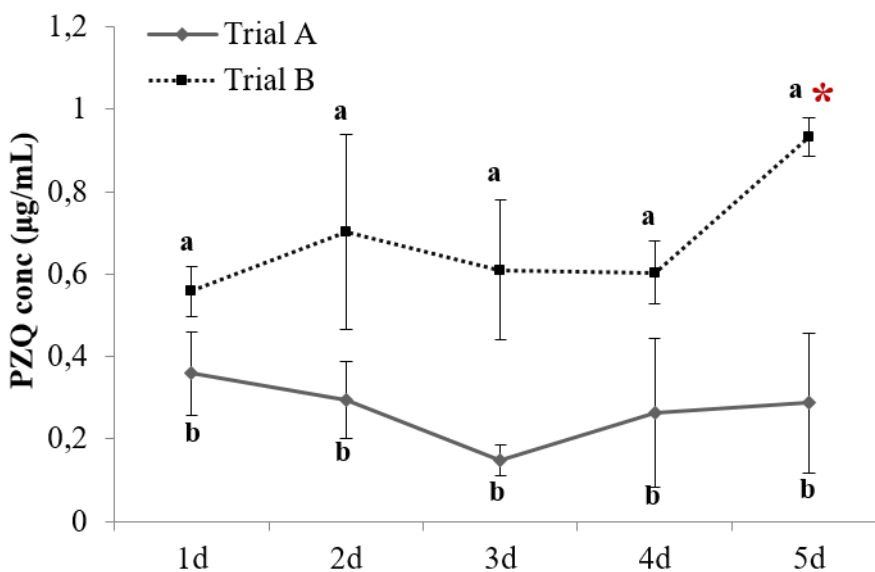
Αποτελέσματα

Στη συγκεκριμένη υποενότητα μελετήθηκε η απορρόφηση και η αποδρομή του PZQ στο μαγιάτικο έπειτα από διατροφική χορήγηση του σε δυο συγκεντρώσεις. Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης βρέθηκε ότι η αντιπαρασιτική ουσία απορροφάται καθώς εντοπίζεται στο πλάσμα του μαγιάτικου έπειτα από διατροφική χορήγηση και στις δυο συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 1, η συγκέντρωση PZQ στο πλάσμα του μαγιάτικου μετρήθηκε ίση με 2.6μg/ml και 2.3μg/ml έπειτα από 2 και 4 ώρες, αντίστοιχα, έπειτα από τη λήψη του φαρμακούχου σιτηρεσίου για το Trial A, ενώ οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις για το Trial B βρέθηκαν 4.3μg/ml και 3.7μg/ml. Συνεχίζοντας, η μέγιστη συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα του μαγιάτικου (C_{max}) έπειτα από χορήγηση 75mg/kg BW (Trial A) παρατηρήθηκε 8 ώρες από τη λήψη του φαρμακούχου σιτηρεσίου και ήταν 3.0μg/ml, ενώ η C_{max} έπειτα από χορήγηση 150mg/kg BW (Trial B) παρατηρήθηκε 2 ώρες μετά τη σίτιση και ήταν ίση με 4.3μg/ml (Εικόνα 1). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δυο δοκιμών προκύπτει ότι η αύξηση στη χορηγούμενη δόση οδήγησε μόνο σε 76% αύξηση στη μέση συγκέντρωση PZQ στο πλάσμα 2 ώρες μετά τη θεραπεία. Λόγω της μεγάλης διακύμανσης μεταξύ των δειγμάτων και για τις δυο δοκιμές που μελετήθηκαν, δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων συγκεντρώσεων PZQ έπειτα από 8 ώρες από τη λήψη του φαρμάκου, ενώ οι διαφορές ήταν σημαντικές σε όλα τα υπόλοιπα χρονικά σημεία των δύο θεραπευτικών σχημάτων.

Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της μελέτης και παρουσιάζονται στην Εικόνα 2, η απομάκρυνση της PZQ από το κυκλοφορικό του μαγιάτικου ήταν ταχεία, καθώς η συγκέντρωση της στο πλάσμα και στις δυο δοκιμές μειώθηκε 24 ώρες μετά τη χορήγηση. Επιπλέον, δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων συγκεντρώσεων PZQ έπειτα από χορήγηση 75mg/kg BW (Trial A), γεγονός που υποδηλώνει ότι το φάρμακο δεν συσσωρεύεται στο πλάσμα κατά τη διάρκεια των ημερών θεραπείας. Αντίθετα, έπειτα από χορήγηση 150mg/kg BW (Trial B), συσσώρευση του φαρμάκου στο πλάσμα καταγράφηκε την 5 ημέρα της θεραπείας. Το παραπάνω προκύπτει καθώς καταγράφηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της μέσης συγκέντρωσης της ουσίας στο πλάσμα του μαγιάτικου την πέμπτη ημέρα συγκριτικά με τις προηγούμενες ημέρες χορήγησης της φαρμακευτικής αγωγής (Εικόνα2).



Εικόνα 1. Μέση συγκέντρωση της PZQ (µg/ml) στο πλάσμα μαγιάτικου (N=10) τις ώρες που ακολούθησαν την πρώτη χορήγηση των φαρμακούχων σιτηρεσίων συγκέντρωσης 75mg/kg BW (Trial A) και 150mg/kg BW (Trial B). Διαφορετικοί δείκτες υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των δοκιμών (α, β)



Εικόνα 2. Μέση συγκέντρωση της PZQ (µg/ml) στο πλάσμα μαγιάτικου (N=10) 24h από χορήγηση των φαρμακούχων σιτηρεσίων συγκέντρωσης 75mg/kg BW (Trial A) και 150mg/kg BW (Trial B). Διαφορετικοί δείκτες υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των δοκιμών (α, β), ενώ ο * υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μεταξύ των ημερών χορήγησης

Τα αποτελέσματα της απομάκρυνσης της PZQ από τα δείγματα μυός με δέρμα και από τα βράγχια μαγιάτικου μετά από τη διατροφική του χορήγηση σε δυο συγκεντρώσεις (75mg/kg BW (Trial A) και 150mg/kg BW (Trial B) παρουσιάζονται στους Πίνακες 4 και 5, αντίστοιχα. Όπως παρουσιάζεται στους Πίνακες 4 και 5, η αντιπαρασιτική ουσία παρουσιάζει παρόμοια επίπεδα συγκεντρώσεων στο μυ με δέρμα και στα βράγχια. Επιπρόσθετα, από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι η αντιπαρασιτική ουσία απομακρύνεται ταχύτατα από τους ιστούς που εξετάστηκαν και στις δυο συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν και συγκεκριμένα στο Trial A το φάρμακο εντοπίζεται πάνω από το LOQ μέχρι τη δεύτερη ημέρα έπειτα από τη χορήγηση της φαρμακούχας τροφής και στους δυο ιστούς που εξετάστηκαν, ενώ στο Trial B, μέχρι τη τρίτη. Οι μέσες συγκεντρώσεις ανά ιστό για το Trial B βρέθηκαν περίπου διπλάσιες από τις αντίστοιχες του Trial A, καθώς οι ιχθύες λάμβαναν διπλάσια συγκέντρωση του φαρμάκου, εύρημα ωστόσο που δεν επαληθεύεται στατιστικά λόγω της μεγάλης διακύμανσης μεταξύ των δειγμάτων σε όλες τις περιπτώσεις.

Πίνακας 4. Μέση συγκέντρωση της PZQ (µg/ml) σε δείγματα μυός με δέρμα μαγιάτικου (N=10) τις ημέρες που ακολούθησαν τη χορήγηση των φαρμακούχων σιτηρεσίων συγκέντρωσης 75mg/kg BW (Trial A) και 150mg/kg BW (Trial B)

<i>Ημέρες από την τελευταία χορήγηση φαρμακούχας τροφής</i>	<i>Trial A (µ.ο ± τ.α)</i>	<i>Trial B (µ.ο ± τ.α)</i>
1	0.10 ± 0.10	0.19 ± 0.06
2	0.04 ± 0.03	0.06 ± 0.02
3	< LOQ	0.03 ± 0.01
4	< LOD	< LOQ
5	< LOD	< LOD
7	< LOD	< LOD

Πίνακας 5. Μέση συγκέντρωση της PZQ (µg/ml) στα βράγχια μαγιάτικου (N=5) τις ημέρες που ακολούθησαν τη χορήγηση των φαρμακούχων σιτηρεσίων συγκέντρωσης 75mg/kg BW (Trial A) και 150mg/kg BW (Trial B)

<i>Ημέρες από την τελευταία χορήγηση φαρμακούχας τροφής</i>	<i>Trial A (µ.ο ± τ.α)</i>	<i>Trial B (µ.ο ± τ.α)</i>
1	0.12 ± 0.01	0.19 ± 0.05
2	0.06 ± 0.04	0.10 ± 0.02
3	< LOQ	0.04 ± 0.01
4	< LOD	< LOQ
5	< LOD	< LOD
7	< LOD	< LOD

Συμπεράσματα

Μικρά δείγματα μειωμένης δεκτικότητας παρουσιάστηκαν στον συγκεκριμένο πειραματισμό που θεωρούνται πολύ ελπιδοφόρα για τη χρήση της PZQ στο μαγιάτικο καθώς σε άλλα εκτρεφόμενα

είδη η χορήγηση φαρμακικών με PZQ τροφών παρουσιάστηκε προβληματική (Partridge, et al. 2014), καθιστώντας αναγκαία την επικάλυψη της φαρμακούχας τροφής με ελκυστικές ουσίες (Pilmer, 2016) για να αυξηθεί η δεκτικότητά της.

Τα αποτελέσματα της φαρμακοκινητικής δεικνύουν γρήγορη και σχετικά μικρή απορρόφηση της PZQ στο κυκλοφορικό σύστημα του μαγιάτικου μετά τη διατροφική χορήγηση και στα δύο θεραπευτικά σχήματα, ενώ η αναμενόμενη συσσώρευση μετά τις επαναλαμβανόμενες ημερήσιες χορηγήσεις δεν εμφανίστηκε κάτι το οποίο δεν αποτελεί ασυνήθιστο φαινόμενο στη χρήση αντιμικροβιακών στα εκτρεφόμενα ψάρια. Γρήγορη απορρόφηση της PZQ μετά από διατροφική χορήγηση έχει αναφερθεί και σε συγγενικό είδος του μαγιάτικου όπως το *S. lalandi* (Tubbs and Tingle, 2006). Η μικρή συγκέντρωση της PZQ στο μαγιάτικο συμφωνεί με τα επίπεδα που μετρήθηκαν και σε άλλα εκτρεφόμενα είδη όπως το *Sebastes schlegeli* (Kim, et al., 2001). Οι χαμηλές συγκεντρώσεις που βρέθηκαν πιθανότατα συνδέονται περισσότερο με τους βιολογικούς μηχανισμούς απομάκρυνσης (ένζυμα κλπ) του ζώου παρά με χαμηλή απορρόφηση της ουσίας. Σε συνάρτηση με τις μετρήσεις σε 24ώρη βάση, η απομάκρυνση της PZQ από το κυκλοφορικό του μαγιάτικου φάνηκε να είναι γρήγορη, και η συγκέντρωση της στο πλάσμα των ψαριών που τους χορηγήθηκαν οι δύο συγκεντρώσεις δεν αυξήθηκε. Επιπλέον, δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων συγκεντρώσεων της ουσίας έπειτα από χορήγηση της μικρής δόσης γεγονός που υποδηλώνει ότι το φάρμακο δεν συσσωρεύεται στο κυκλοφορικό σύστημα κατά τη διάρκεια των ημερών θεραπείας. Συγκριτικά, το θεραπευτικό σχήμα με τη μεγαλύτερη δοσολογία, δεδομένου ότι είναι αποδεκτό από το ψάρι, πλεονεκτεί σε σχέση με αυτό της μικρής δόσης, καθώς οι σχετικές συγκεντρώσεις της PZQ στο πλάσμα μετρήθηκαν να είναι στατιστικά μεγαλύτερες σε όλα τα εξεταζόμενα χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της ημέρας με εξαίρεση εκείνου των 8 ωρών λόγω της μεγάλης διακύμανσης μεταξύ των δειγμάτων στις δυο δοκιμές που μελετήθηκαν.

Η ανάλυση της PZQ στους βρώσιμους ιστούς έδειξε γρήγορη απομάκρυνση της ουσίας από τους ιστούς που εξετάστηκαν και στις δυο συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα στα ψάρια που τους χορηγήθηκε η χαμηλή δοσολογία, το φάρμακο εντοπίζεται πάνω ότι το LOQ μέχρι τη δεύτερη ημέρα μετά την αποπεράτωση της θεραπείας και στους δυο ιστούς που εξετάστηκαν, ενώ σε εκείνα που τους δόθηκε η υψηλή δοσολογία PZQ, μέχρι τη τρίτη. Οι μέσες συγκεντρώσεις ανά ιστό ψαριών της υψηλής δοσολογίας PZQ βρέθηκαν περίπου διπλάσιες από τις αντίστοιχες των ψαριών της χαμηλής καθώς λάμβαναν συγκριτικά διπλάσια συγκέντρωση του φαρμάκου, εύρημα ωστόσο που δεν επαληθεύεται στατιστικά λόγω της μεγάλης διακύμανσης μεταξύ των δειγμάτων σε όλες τις περιπτώσεις. Σχετικά με την ασφαλή κατανάλωση εκτρεφόμενων ζώων που τους έχει χορηγηθεί PZQ, σύμφωνα με την οδηγία της EMEA (1998), δεν υπάρχει αναγκαιότητα καθορισμού του MRL

της PZQ στα εκτρεφόμενα ζώα/ψάρια, λόγω της μη συσσώρευσης της στους ζωικούς ιστούς. Να επισημανθεί ότι η PZQ δεν αποτελεί ακόμα εγγεγραμμένη αντιμικροβιακή ουσία για χρήση σε εκτρεφόμενα ψάρια αλλά μπορεί να χορηγηθεί με τη διαδικασία 'off label' βάση συγκεκριμένης νομοθεσίας (Council Directive 90/676/EEC). Η διαδικασία αυτή απαιτεί 500 βαθμομημέρες αναμονή πριν την κατανάλωση παρόλο που στη χρήση του σε άλλα παραγωγικά ζώα, παρόλο που το απαιτούμενο MRL όπως αναφέρθηκε παραπάνω είναι μηδενικό.

Συμπερασματικά, το θεραπευτικό σχήμα της μεγάλης δοσολογίας (150 mg/kg PZQ), που η χορήγησή του συνδυάζεται, συγκριτικά με το σχήμα της χαμηλής δόσης, με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο κυκλοφορικό σύστημα του μαγιάτικου, είναι και το προτεινόμενο για την αντιμετώπιση των μονογενών παρασίτων που προσβάλλουν το ψάρι. Επίσης, η γρήγορη απορρόφηση της ουσίας συνιστά δύο ημερήσια θεραπευτικά γεύματα της ίδιας συνολικής δοσολογίας ώστε να διατηρηθεί η συγκέντρωση της PZQ σε υψηλά επίπεδα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα την περίοδο της ημέρας.

Βιβλιογραφία

Buchmann, K. (1987). Effects of praziquantel on the monogenean gill parasite *Pseudodactylogyrus* bini. *Acta Vet. Scand.*, 28, 447-450.

EMA (1998) The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines Evaluation Unit. EMA/MRL/523/98-FINAL. COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS. PRAZIQUANTEL. REPORT (2)

Hirazawa, N., Akiyama, K., & Umeda, N. (2013). Differences in sensitivity to the anthelmintic praziquantel by the skin-parasitic monogeneans *Benedeniaseriolaria* and *Neobenedeniagirellae*. *Aquaculture*, 404, 59-64.

Hirazawa, N., Mitsuboshi, T., Hirata, T., & Shirasu, K. (2004). Susceptibility of spotted halibut *Veraspervariiegatus* (Pleuronectidae) to infection by the monogenean *Neobenedeniagirellae* (Capsalidae) and oral therapy trials using praziquantel. *Aquaculture*, 238(1-4), 83-95.

Hirazawa, N., Ohtaka, T., & Hata, K. (2000). Challenge trials on the anthelmintic effect of drugs and natural agents against the monogenean *Heterobothrium* *okamotoi* in the tiger puffer *Takifugurubripes*. *Aquaculture*, 188(1-2), 1-13.

Hormazabal, V., & Yndestad, M. (1995). High-performance liquid chromatographic determination of praziquantel in plasma and tissues of cultured fish for residue and pharmacokinetic studies. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 18(3), 589-597.

Kim, K. H., & Cho, J. B. (2000). Treatment of *Microcotyle* *sebastis* (Monogenea: Polyopisthocotylea) infestation with praziquantel in an experimental cage simulating commercial rockfish *Sebastes* *schlegelii* culture conditions. *Diseases of aquatic organisms*, 40(3), 229-231.

Kim, K. H., Kim, C. S., & Kim, J. W. (2001). Depletion of praziquantel in plasma and muscle tissue of cultured rockfish *Sebastes* *schlegelii* after oral and bath treatment. *Diseases of aquatic organisms*, 45(3), 203-207.

Lu, C. H., Ku, C. C., Wen, C. M., & Chen, S. N. (2012). Effects of the Gill Parasite *Zeuxaptaseriolae* (Monogenea: Heteraxinidae) on the Sea Cage-cultured Amberjack *Serioladumerili* (Risso, 1810) at Penghu Island (Pescadores), Taiwan. *J. Fish. Soc. Taiwan*, 39(2), 107-114.

Montero, F. E., Crespo, S., Padrós, F., De la Gándara, F., García, A., & Raga, J. A. (2004). Effects of the gill parasite *Zeuxaptaseriolae* (Monogenea: Heteraxinidae) on the amberjack *Serioladumerili* Risso (Teleostei: Carangidae). *Aquaculture*, 232(1-4), 153-163.

Partridge, G. J., Burge, T., & Lymbery, A. J. (2017). A comparison of the palatability of racemic praziquantel and its two enantioseparated isomers in yellowtail kingfish *Seriolalalandi* (Valenciennes, 1833). *Aquaculture research*, 48(4), 1735-1743.

Pilmer, L., 2016. Novel methods of improving the palatability of feeds containing praziquantel for commercially cultured yellowtail kingfish, Honours thesis. Murdoch University.

Sitjà-Bobadilla, A., de Felipe, M. C., & Alvarez-Pellitero, P. (2006). In vivo and in vitro treatments against *Sparicotylechrysophrii* (Monogenea: Microcotylidae) parasitizing the gills of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 261(3), 856-864.

Tubbs, L. A., & Tingle, M. D. (2006). Bioavailability and pharmacokinetics of a praziquantel bolus in kingfish *Seriolalalandi*. *Diseases of aquatic organisms*, 69(2-3), 233-238.

Tubbs, L., Mathieson, T., & Tingle, M. (2008). Metabolism of praziquantel in kingfish *Seriolalalandi*. *Diseases of aquatic organisms*, 78(3), 225-233.

Watson, M. (2009). Praziquantel. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18(3), 229-231.

Williams, R. E., Ernst, I., Chambers, C. B., & Whittington, I. D. (2007). Efficacy of orally administered praziquantel against *Zeuxaptaseriolae* and *Benedeniaseriolae* (Monogenea) in yellowtail kingfish *Seriolalalandi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 77(3), 199-205.

Yamamoto, S., Shirakashi, S., Morimoto, S., Ishimaru, K., & Murata, O. (2011). Efficacy of oral praziquantel treatment against the skin fluke infection of cultured chub mackerel, *Scomberjaponicus*. *Aquaculture*, 319(1-2), 53-57.

ΠΑΚΕΤΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ (ΠΕ) 3- ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ PRAZIQUANTEL ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ Π3.3 Σχεδιασμός θεραπευτικής αγωγής για εφαρμογή σε παραγωγικό επίπεδο

Εισαγωγή

Η εκτροφή του μαγιάτικου (*Seriola dumerili*) αντιμετωπίζει σοβαρά παθολογικά προβλήματα, τα οποία αναφορικά με την εκτροφή του είδους στην περιοχή της Μεσογείου, περιορίζονται κυρίως σε μολύνσεις των βραγχίων από μονογενή παράσιτα όπως το *Zeuxapta seriolae*, που δημιουργούν σημαντικές εποχιακές θνησιμότητες που φτάνουν έως και 70% (Montero et al., 2004; Lu et al., 2012). Για την αντιμετώπιση της παρασίτωσης έχει αξιολογηθεί η εφαρμογή εμβαπτίσεων με τη χρήση διάφορων αποτελεσματικών ουσιών (πχ. οξυζενέ) στους κλωβούς, διαδικασίες όμως που χαρακτηρίζονται από σοβαρές πρακτικές δυσκολίες (χρήση σάκου), καιρικά εμπόδια και ανά περίπτωση, περιβαλλοντικές παρενέργειες (πχ. φορμόλη). Ιδανικά, η αντιμετώπιση της ασθένειας μέσω χορήγησης φαρμακούχας τροφής θα πρόσδιδε πολλαπλά οφέλη περιορίζοντας σημαντικά τα προβλήματα που συνδέονται με την εφαρμογή εμβαπτίσεων.

Η πραζικουαντέλη (Praziquantel-PZQ) είναι ένα ευρέος φάσματος ανθελμινθικό φάρμακο (Watson, 2009), το οποίο είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό έναντι μονογενών παρασίτων ιχθύων (Buchmann, 1987, Hirazawa et al., 2000, Hirazawa et al 2004). Η εφαρμογή εμβαπτίσεων με τη χρήση PZQ είναι επίσης αποτελεσματική (Kim and Cho, 2000) αλλά φέρει παρόμοιες δυσκολίες και περιβαλλοντικές επιπτώσεις με τις λοιπές δοκιμασμένες ουσίες. Η διατροφική χορήγηση του συγκεκριμένου φαρμάκου έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας σε πλήθος εκτρεφόμενων ιχθύων, προσδίδοντας ελπιδοφόρα αποτελέσματα. (Bader et al. 2019). Πιθανότατα η PZQ να αποτελέσει ένα από τα πιο σημαντικά αντιμικροβιακά για χρήση στις υδατοκαλλιέργειες με την προϋπόθεση πάντα ότι εκτενείς μελέτες φαρμακοκινητικής θα προηγηθούν στοχευόμενα σε επιλεγμένα εκτρεφόμενα είδη ψαριών.

Οι μελέτες φαρμακοκινητικής μπορούν να συνδράμουν στο σχεδιασμό αποδοτικών θεραπευτικών αγωγών παρέχοντας χρήσιμες γνώσεις και για αυτό θα πρέπει να προηγούνται των κλινικών δοκιμών. Στην περίπτωση της διατροφικής χορήγησης της PZQ, αυτές οι πληροφορίες θα ήταν ωφέλιμες ώστε να μειωθεί το κόστος του φαρμακούχου σιτηρέσιου και να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανότητες ανάπτυξης ανθεκτικότητας ως αποτέλεσμα παρατεταμένης έκθεσης των παρασίτων σε χαμηλές και κατά συνέπεια ανεπαρκείς δόσεις του φαρμάκου (Tubbs, Tingle, 2006).

Τα αποτελέσματα της φαρμακοκινητικής μελέτης που αποκτήθηκαν στο Π3.2 έδειξαν γρήγορη και σχετικά μικρή απορρόφηση της PZQ στο κυκλοφορικό σύστημα του μαγιάτικου έπειτα από τη διατροφική χορήγηση και στα δύο θεραπευτικά σχήματα που εξετάστηκαν (Trial A: 75 mg/kg ιχθύος για 5 ημέρες και Trial B: 150 mg/kg ιχθύος για 5 ημέρες). Από τη συγκριτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δύο δόσεων που μελετήθηκαν προκύπτει ότι, το θεραπευτικό σχήμα με τη μεγαλύτερη δοσολογία, πλεονεκτεί σε σχέση με αυτό της μικρής δόσης, καθώς οι σχετικές συγκεντρώσεις της PZQ στο πλάσμα μετρήθηκαν να είναι στατιστικά μεγαλύτερες σε όλα τα εξεταζόμενα χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της ημέρας με εξαίρεση εκείνου των 8 ωρών λόγω της μεγάλης διακύμανσης μεταξύ των δειγμάτων στις δυο δοκιμές. Κλινική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε μαγιάτικο επιβεβαιώνει ότι η μεγάλη δόση (150 mg/kg ιχθύος για 3 ημέρες) είναι αποτελεσματική στην αντιμετώπιση του μονογενούς *Benedenian seriolae* (Hirazawa et al., 2013). Αντίθετα, σε κλινικές μελέτη στο *S. lalandi*, συγγενικό είδος του μαγιάτικου, βρέθηκε ότι η χορήγηση χαμηλότερων δόσεων, σε αυτήν την περίπτωση συγκρίσιμων με τη χαμηλή δόση (Trial A), δηλαδή 50-75 mg/kg ιχθύος για 3 ημέρες ήταν αποτελεσματικότερη στην αντιμετώπιση των *B. seriolae* και *Z. seriolae* (Williams et al., 2007, Forwood et al., 2016). Πρέπει ωστόσο σε αυτό το σημείο να αναφερθεί ότι πέρα από τα προβλήματα δεκτικότητας που καταγράφηκαν για τις υψηλές δόσεις της PZQ και εν μέρει ερμηνεύουν τα προαναφερθέντα ευρήματα, τα αποτελέσματα φαρμακοκινητικών μελετών στο *S. lalandi* φανερώνουν ότι η απορρόφηση της PZQ στο κυκλοφορικό σύστημα του συγκεκριμένου είδους είναι συγκριτικά πολύ μεγαλύτερη (C_{max} =9.3-10.6 μg/ml vs 3.0-4.2 μg/ml) ακόμα και έπειτα από τη χορήγηση μικρότερων δόσεων (40-50 mg/kg ιχθύος) (Tubbs, Tingle, 2006, Patridge et al., 2019). Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι η απομάκρυνση της PZQ από το πλάσμα του μαγιάτικου ήταν ταχεία και στις δύο δοκιμές καθώς οι συγκεντρώσεις της μειώθηκαν σε 0.31 (Trial A) και 0.56 (Trial B) μg/ml 24 ώρες μετά τη χορήγηση ενώ δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων συγκεντρώσεων της ουσίας έπειτα από χορήγηση της μικρής δόσης γεγονός που υποδηλώνει ότι το φάρμακο δεν συσσωρεύεται στο κυκλοφορικό σύστημα κατά τη διάρκεια των ημερών θεραπείας. Το τελευταίο δεν αποτελεί ασυνήθιστο φαινόμενο στη χρήση αντιμικροβιακών στα εκτρεφόμενα ψάρια. Ιδία τάση για γρήγορη απομάκρυνση καταγράφηκε και στα βράγχια. Αναπόφευκτα, η ταχεία απομάκρυνση οδηγεί σε χαμηλή διαθεσιμότητα φαρμάκου, επομένως η χορήγηση της PZQ δυο φορές ημερησίως (ανά 12 ώρες) προτείνεται ως πιο αποτελεσματική για την εξάλειψη των παρασίτων του μαγιάτικου.

Σχετικά με την ασφαλή κατανάλωση εκτρεφόμενων ζώων που τους έχει χορηγηθεί PZQ, σύμφωνα με την οδηγία του Ευρωπαϊκού Γραφείου Αξιολόγησης Φαρμακευτικών Προϊόντων (EMA, 1998) δεν υπάρχει αναγκαιότητα καθορισμού του Μέγιστου Ορίου Υπολειμμάτων

(Maximum Residue Level, MRL) της PZQ στα εκτρεφόμενα ζώα/ψάρια, λόγω της μη συσσώρευσης της στους ζωικούς ιστούς. Να επισημανθεί ότι η PZQ δεν αποτελεί ακόμα εγγεγραμμένη αντιμικροβιακή ουσία για χρήση σε εκτρεφόμενα ψάρια αλλά μπορεί να χορηγηθεί με τη διαδικασία 'off label' βάση συγκεκριμένης νομοθεσίας (Council Directive 90/676/EEC). Η διαδικασία αυτή απαιτεί 500 βαθμο-ημέρες αναμονή πριν την κατανάλωση, παρόλο που το απαιτούμενο MRL όπως αναφέρθηκε παραπάνω είναι μηδενικό. Η ανάλυση της PZQ στους βρώσιμους ιστούς έδειξε γρήγορη απομάκρυνση της ουσίας από τους ιστούς που εξετάστηκαν και στις δυο συγκεντρώσεις έπειτα από 5 ημέρες χορήγησης. Συγκεκριμένα, στα ψάρια που τους χορηγήθηκε η χαμηλή δοσολογία, το φάρμακο εντοπίζεται πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) μέχρι τη δεύτερη ημέρα μετά την αποπεράτωση της θεραπείας, ενώ σε εκείνα που τους δόθηκε η υψηλή δοσολογία PZQ, μέχρι την τρίτη. Οι μέσες συγκεντρώσεις ανά ιστό ψαριών της υψηλής δοσολογίας PZQ βρέθηκαν περίπου διπλάσιες από τις αντίστοιχες των ψαριών της χαμηλής, καθώς λάμβαναν συγκριτικά διπλάσια συγκέντρωση του φαρμάκου, εύρημα ωστόσο που δεν επαληθεύεται στατιστικά λόγω της μεγάλης διακύμανσης μεταξύ των δειγμάτων σε όλες τις περιπτώσεις. Η αύξηση του χρόνου απομάκρυνσης του φαρμάκου από τους εδώδιμους ιστούς έπειτα διπλασιασμό της χορηγούμενης ποσότητας PZQ έχει επιβεβαιωθεί και βιβλιογραφικά (Kim et al., 2003). Μια ακόμα σημαντική παράμετρος που επιδρά στον χρόνο απομάκρυνσης της PZQ από τους εδώδιμους ιστούς είναι και η διάρκεια της θεραπευτικής αγωγής και για αυτό θα πρέπει να λαμβάνεται σημαντικά υπόψη κατά τον σχεδιασμό θεραπευτικών πρωτοκόλλων. Συγκεκριμένα, αύξηση του χρόνου απομάκρυνσης, κατά μία ημέρα, παρατηρήθηκε επίσης όταν χορηγήθηκε δόση PZQ ίση με 400 mg/kg ιχθύος για 3 ημέρες έναντι μονή διατροφικής χορήγησης σε *Sebastes schlegeli* (Kim et al., 2001 2003).

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, το θεραπευτικό σχήμα της μεγάλης δοσολογίας (150 mg/kg PZQ) δεδομένου ότι δεν καταγράφηκαν προβλήματα στη δεκτικότητα του φαρμακούχου σιτηρέσιου και που η χορήγησή του συνδυάζεται, συγκριτικά με το σχήμα της χαμηλής δόσης, με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο κυκλοφορικό σύστημα του μαγιάτικου, είναι και το προτεινόμενο για την αντιμετώπιση των μονογενών παρασίτων και ειδικά του *Z. seriolae* που προκαλεί υψηλές θνησιμότητες κυρίως την καλοκαιρινή περίοδο στο εκτρεφόμενο μαγιάτικο. Επίσης, η γρήγορη απομάκρυνση της ουσίας συνιστά δύο ημερήσια θεραπευτικά γεύματα της ίδιας συνολικής δοσολογίας ώστε να διατηρηθεί η συγκέντρωση της PZQ σε υψηλά επίπεδα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα κατά την περίοδο της ημέρας. Με έμφαση στην ασφάλεια του καταναλωτή και καθώς οι ημέρες της θεραπευτικής αγωγής επιδρούν στον χρόνο απομάκρυνσης της PZQ προτείνεται αυτές να είναι τρεις δεδομένου επίσης ότι βιβλιογραφικά βρέθηκαν αποτελεσματικές στην καταπολέμηση του παρασίτου και ότι η φαρμακοκινητική μελέτη δεν

κατέδειξε πλεονεκτήματα από την πενθήμερη χορήγηση της PZQ στο μαγιάτικο. Τέλος, σε περίπτωση που δεν επιτευχθεί αποτελεσματική αντιμετώπιση του παρασίτου προτείνεται επανάληψη της θεραπείας έπειτα από 15 ημέρες.

Πρωτόκολλο θεραπευτικής αγωγής

Πριν την έναρξη της θεραπευτικής αγωγής: Μαγιάτικα θα ζυγιστούν δειγματοληπτικά, θα κατανεμηθούν τυχαία σε δυο ομάδες (ομάδα ελέγχου και ομάδα παρέμβασης εις διπλούν) και θα τοποθετηθούν σε 4 κλωβούς μικρής χωρητικότητας (τουλάχιστον 50 ιχθύες ανά κλωβό). Η θερμοκρασία και το διαλυμένο οξυγόνο του νερού θα ελέγχονται και θα καταγράφονται καθημερινά. Οι ιχθύες θα εγκλιματιστούν για 5 ημέρες τουλάχιστον πριν την έναρξη της δοκιμής, περίοδος κατά την οποία θα τους δοθεί εμπορικό σιτηρέσιο σε ποσότητα που προτείνεται βάσει του μεταβολικού τους ρυθμού. Κατά την περίοδο του εγκλιματισμού, τυχόν απώλειες ανά κλωβό θα καταγράφονται καθημερινά ώστε να υπολογιστεί η θνησιμότητα. Με σκοπό να εξασφαλιστεί η ίδια διατροφική κατάσταση, 24 ώρες πριν από τη χορήγηση της φαρμακευτικής τροφής στους ιχθύες της ομάδας παρέμβασης στο σύνολο των ιχθύων δεν θα δοθεί τροφή. Ταυτόχρονα, αντιπροσωπευτικό δείγμα ανά κλωβό θα συλλεχθεί, θα θανατωθεί και θα εκτιμηθεί το παρασιτικό τους φορτίο στα βράγχια με τη βοήθεια στερεοσκοπίου.

Κατά τη διάρκεια της θεραπευτικής αγωγής: Η θεραπευτική αγωγή θα χορηγηθεί σε πρώτη φάση για τρεις ημέρες. Κατά τη διάρκεια των ημερών αυτών και στις δυο ομάδες θα παρέχεται σιτηρέσιο (φαρμακούχο ή μη) δυο φορές ημερησίως (ανά 12 ώρες). Η ποσότητα που θα δίνεται και στις δυο ομάδες θα είναι υπολογισμένη βάσει του μεταβολικού τους ρυθμού. Στην ομάδα παρέμβασης συγκεκριμένα η ποσότητα του φαρμάκου θα πρέπει να είναι ίση με 75 mg/kg ιχθύος ανά γεύμα, ούτως ώστε η ημερήσια καταναλισκόμενη ποσότητα φαρμάκου να είναι 150 mg/kg ιχθύος ανά ημέρα. Η ποσότητα της τροφής που δεν καταναλώνεται θα ζυγίζεται και θα καταγράφεται ημερησίως. Κατά τη διάρκεια της θεραπείας επίσης, τυχόν απώλειες ανά κλωβό θα καταγράφονται καθημερινά ώστε να υπολογιστεί η θνησιμότητα. Μετά την ολοκλήρωση της τριήμερης παρέμβασης αντιπροσωπευτικό δείγμα ανά κλωβό θα συλλεχθεί, θα θανατωθεί και θα εκτιμηθεί το παρασιτικό τους φορτίο στα βράγχια με τη βοήθεια στερεοσκοπίου. Παράλληλα, θα γίνει σύγκριση με τις μετρήσεις στην ομάδα ελέγχου.

Σε περίπτωση που η αντιμετώπιση του παρασίτου δεν είναι αποτελεσματική η ίδια θεραπευτική αγωγή θα επαναληφθεί μέσα σε διάστημα 15 ημερών, όπως ακριβώς παρουσιάζεται ανωτέρω. Συνεπώς, οι δυο ομάδες ιχθύων θα παραμείνουν στους κλωβούς και θα λαμβάνουν εμπορικό

σιτηρέσιο, ενώ και σε αυτήν την περίπτωση τυχόν απώλειες ανά κλωβό θα καταγράφονται καθημερινά ώστε να υπολογιστεί η θνησιμότητα.

Βιβλιογραφία

Bader, C., Starling, D.E., Jones, D.E., Brewer, M.T., 2019. Use of praziquantel to control platyhelminth parasites of fish. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 42, 139-153.

Buchmann, K. (1987). Effects of praziquantel on the monogenean gill parasite *Pseudodactylogyus bini*. *Acta Vet. Scand.*, 28, 447-450.

EMA (1998) The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines Evaluation Unit. EMA/MRL/523/98-FINAL. COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS. PRAZIQUANTEL. REPORT (2)

Forwood, J.M., Bubner, E.J., Landos, M., Deveney, M.R., DeAntignana, T., 2016. Praziquantel delivery via moist pellets to treat monogenean parasites of yellowtail kingfish *Seriola lalandi*: efficacy and feed acceptance. *Diseases of Aquatic Organisms*. 121, 201-209.

Hirazawa, N., Akiyama, K., & Umeda, N. (2013). Differences in sensitivity to the anthelmintic praziquantel by the skin-parasitic monogeneans *Benedenia seriola* and *Neobenedeniagirellae*. *Aquaculture*, 404, 59-64.

Hirazawa, N., Mitsuboshi, T., Hirata, T., & Shirasu, K. (2004). Susceptibility of spotted halibut *Verasper variegatus* (Pleuronectidae) to infection by the monogenean *Neobenedenia girellae* (Capsalidae) and oral therapy trials using praziquantel. *Aquaculture*, 238(1-4), 83-95.

Hirazawa, N., Ohtaka, T., & Hata, K. (2000). Challenge trials on the anthelmintic effect of drugs and natural agents against the monogenean *Heterobothrium okamotoi* in the tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Aquaculture*, 188(1-2), 1-13.

Kim, C. S., Cho, J. B., Ahn, K. J., Lee, J. I., & Kim, K. H. (2003). Depletion of praziquantel in muscle tissue and skin of cultured rockfish (*Sebastes schlegeli*) under the commercial culture conditions. *Aquaculture*, 219(1-4), 1-7.

Kim, K., Kim, C., Kim, J.H., 2001. Depletion of praziquantel in plasma and muscle tissue of cultured rockfish *Sebastes schlegeli* after oral and bath treatment. *Diseases of Aquatic Organisms*. 45, 203-207.

Lu, C. H., Ku, C. C., Wen, C. M., & Chen, S. N. (2012). Effects of the Gill Parasite *Zeuxaptaseriola* (Monogenea: Heteraxinidae) on the Sea Cage-cultured Amberjack *Serioladumerili* (Risso, 1810) at Penghu Island (Pescadores), Taiwan. *J. Fish. Soc. Taiwan*, 39(2), 107-114.

Montero, F. E., Crespo, S., Padrós, F., De la Gándara, F., García, A., & Raga, J. A. (2004). Effects of the gill parasite *Zeuxaptaseriola* (Monogenea: Heteraxinidae) on the amberjack *Serioladumerili* Risso (Teleostei: Carangidae). *Aquaculture*, 232(1-4), 153-163.

Partridge, G.J., Rao, S., Woolley, L.D., Pilmer, L., Lymbery, A.J., Prestidge, C.A., 2019. Bioavailability and palatability of praziquantel incorporated into solid-lipid nanoparticles fed to

yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 218, 14-20.

Tubbs, L. A., & Tingle, M. D. (2006). Bioavailability and pharmacokinetics of a praziquantel bolus in kingfish *Seriola lalandi*. *Diseases of aquatic organisms*, 69(2-3), 233-238.

Williams, R. E., Ernst, I., Chambers, C. B., & Whittington, I. D. (2007). Efficacy of orally administered praziquantel against *Zeuxapta seriola* and *Benedenia seriola* (Monogenea) in yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 77(3), 199-205.