

**ΠΑΚΕΤΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ (ΠΕ) 4- ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΥΧΑΣ ΤΡΟΦΗΣ ΜΕ PRAZIQUANTEL ΕΝΑΝΤΙΑ ΣΕ
ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ ΤΟΥ ΜΑΓΙΑΤΙΚΟΥ ΜΕ *Z. SERIOLAE* ΣΕ ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ
ΕΚΤΡΟΦΗΣ**

ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ Π4.1 (Π8): Εφαρμογή της θεραπευτικής αγωγής σε παραγωγικό επίπεδο για την καταπολέμηση του παράσιτου

Εισαγωγή

Το μονογενές εξωπαράσιτο *Zeuxapta seriolae* που προσβάλλει τα βράγχια των εκτρεφόμενων ψαριών, αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα για την παραγωγή του μαγιάτικου (*Seriola dumerili*) στην περιοχή της Μεσογείου, με 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 όπως το οξυζενέ στους κλωβούς, διαδικασίες όμως που χαρακτηρίζονται από λειτουργικές & πρακτικές δυσκολίες, καιρικά εμπόδια, υψηλό κόστος και μεγάλο αριθμό εργατοωρών. 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), ένα ευρέος φάσματος ανθελμινθικό φάρμακο, έχει δείξει ότι μπορεί να αποτελέσει ένα εξαιρετικά αποτελεσματικό εργαλείο έναντι μονογενών παρασίτων ιχθύων (Buchmann, 1987, Hirazawa et al., 2000; 2004). Η διατροφική χορήγηση του συγκεκριμένου φαρμάκου έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας σε πλήθος εκτρεφόμενων ιχθύων, προσδίδοντας ελπιδοφόρα αποτελέσματα (Bader et al. 2019). Τα αποτελέσματα της φαρμακοκινητικής μελέτης που αποκτήθηκαν σε προγενέστερα ΠΕ του έργου έδειξαν γρήγορη απορρόφηση της PZQ στο κυκλοφορικό σύστημα του μαγιάτικου έπειτα από τη διατροφική χορήγηση και στις δύο δοσολογίες που εξετάστηκαν (75 & 150 mg/kg ψαριού). 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 ουσίας στο πλάσμα μετρήθηκαν να είναι στατιστικά μεγαλύτερες στα περισσότερα χρονικά σημεία δείγματος κατά τη διάρκεια της ημέρας με εξαίρεση. Κλινική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε μαγιάτικο επιβεβαιώνει επίσης ότι η μεγάλη δόση (150 mg/kg ιχθύος για 3 ημέρες) είναι πιο 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). Ο κύριος όμως λόγος σε αυτήν την περίπτωση ήταν τα προβλήματα δεκτικότητας της φαρμακούχας τροφής που παρουσιάστηκαν στις μεγαλύτερες δοσολογίες. Πρέπει ωστόσο σε αυτό το σημείο να αναφερθεί ότι πέρα από τα προβλήματα δεκτικότητας που καταγράφηκαν για τις υψηλές δόσεις της PZQ, τα αποτελέσματα σχετικών 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).

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. 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. Τέλος, σε περίπτωση που δεν επιτευχθεί αποτελεσματική αντιμετώπιση του παρασίτου προτείνεται επανάληψη της θεραπείας έπειτα από 15 ημέρες.

ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ Π4.2 (Π9): Αξιολόγηση της θεραπευτικής αγωγής σε παραγωγικό επίπεδο με παρασιτολογική ανάλυση

Πρωτόκολλο θεραπευτικής αγωγής

Τριακόσια μαγιάτικα βάρους 125 ± 14 g μεταφέρθηκαν από υπάρχοντες κλωβούς της μονάδας, κατανεμήθηκαν τυχαία σε δυο ομάδες (ομάδα ελέγχου και ομάδα παρέμβασης εις τριπλούν) και τοποθετήθηκαν σε 6 κλωβούς (Εικόνα 1) μικρής χωρητικότητας ($3m^3$) (50 ιχθύες ανά κλωβό).



Εικόνα 1. Πειραματικά κλωβάκια τοποθετημένα σε εμπορικό κλωβό για τις ανάγκες του πειράματος

Η θερμοκρασία ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$) και το διαλυμένο οξυγόνο του νερού ελέγχθηκαν και καταγράφηκαν καθημερινά κατά τη διάρκεια του πειράματος. Τα μαγιάτικα εγκλιματίστηκαν για 10 ημέρες πριν την έναρξη της θεραπείας, περίοδος κατά την οποία τους χορηγήθηκε εμπορικό σιτηρέσιο σε ποσότητα που προτείνεται βάσει του μεταβολικού τους ρυθμού. Κατά την περίοδο του εγκλιματισμού, απώλειες ανά κλωβό καταγράφηκαν 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 δόθηκε τροφή. Ταυτόχρονα, αντιπροσωπευτικό δείγμα ανά κλωβό συλλέχθηκε και μετρήθηκε το παρασιτικό τους φορτίο στα βράγχια με τη βοήθεια στερεοσκοπίου. Ο συνολικός αριθμός των παρασίτων (ενήλικα & λάρβες) βρέθηκε να είναι 21 ± 6.4 πριν την έναρξη της θεραπείας. Η θεραπευτική αγωγή χορηγήθηκε για τρεις ημέρες. Κατά τη διάρκεια των ημερών αυτών και στις δυο ομάδες τα πειραματικά σιτηρέσια (Πίνακας 1) (φαρμακούχο ή μη) χορηγήθηκε δυο φορές ημερησίως (ανά 12 ώρες). 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 φαρμακούχα τροφή καταναλώθηκε χωρίς δυσκολίες από τα πειραματικά ψάρια. Παράλληλα, η τοποθέτηση των συγκεκριμένων μικρών κλωβών στον πειραματικό σχεδιασμό και η αποτελεσματική ολοκλήρωση του πειράματος, αναδεικνύει τα οφέλη της χρήσης τους και σε μελλοντικές μελέτες.

Συστατικό (g/100g)	Μάρτυρας	Φαρμακούχα
Fish meal	60.00	60.00
Krill meal	12.00	12.00
Wheat meal	18.25	17.50
Wheat gluten	3.00	3.00
Fish oil	5.00	5.00
Vitamins	0.25	0.25
Shrimp-based attractant	1.50	1.50
PZQ	0	0.75
Proximate composition (%)		
Moisture		7.31
Protein		51.68
Fat		14.72
Ash		8.793
NFEs		17.50

Πίνακας 1. Σύσταση των πειραματικών τροφών

Κατά τη διάρκεια του πειράματος δεν καταγράφηκαν θνησιμότητες αν και οι μετέπειτα παρασιτολογικές εξετάσεις έδειξαν ότι όλα τα ψάρια που συλλέχθηκαν για εξέταση ήταν προσβεβλημένα από το παράσιτο (prevalence 100%). Δύο ημέρες μετά την ολοκλήρωση της τριήμερης παρέμβασης δέκα ψάρια από κάθε κλωβό συλλέχθηκαν για εκτιμηθεί το παρασιτικό τους φορτίο στα βράγχια με τη βοήθεια στερεοσκοπίου. Στην εξέταση συμμετείχαν όλα τα βραγχιακά τόξα του κάθε ψαριού. Παράλληλα, έγινε σύγκριση με τις μετρήσεις στην ομάδα ελέγχου. Εκτός από την παρασιτολογική μέτρηση, αξιολογήθηκε και η συγκρινόμενη αποτελεσματικότητα % (efficacy %) βάση του παρακάτω τύπου:

$$\% \text{ Efficacy} = 100 - [100 * (\text{mean number of parasites in PZQ-treated group}) / (\text{mean number of parasites in control group})]$$

Η στατιστική σύγκριση του παρασιτικού φορτίου μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του τεστ non-parametric one-tail Kolmogorov-Smirnov test με επίπεδο σημαντικότητας στο 0.05 και λογισμικό SPSS. Παρόλο που η χορήγηση της PZQ δεν απομάκρυνε πλήρως τα παράσιτα στα πειραματικά ψάρια, η μείωση του παρασιτικού φορτίου μεταξύ των δύο ομάδων βρέθηκε να είναι σημαντική (P = 0.001) (Πίνακας 2). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την ανθελμινθική αξία της PZQ όπως διαφαίνεται ξεκάθαρα κι από την διαθέσιμη βιβλιογραφία (Bader et al., 2019). Επιπλέον, η υπολογιζόμενη αποτελεσματικότητα της θεραπείας ξεπέρασε το 80 %, πλησιάζοντας τις τιμές που έχουν βρεθεί για τη χορήγηση της ουσίας σε άλλα εκτρεφόμενα ψάρια (Hirazawa et al., 2000; Williams et al., 2007; Yamamoto et al., 2011; Forwood et al. 2016).

Πίνακας 2. Number of *Z. seriolae* (adults & oncomiracidia) infecting greater amberjack pre- and post-treatment and efficacy (%) of in feed-administrated PZQ at 150 mg PZQ/kg for three consecutive days. Data represent mean ± stdev (n=30)

Parasite	Total number of parasites			Efficacy (%)	P value
	Pre-treatment	Control group	PZQ-treated group		
<i>Zeuxapta seriolae</i>	21 ± 6.4	19.3 ± 9.8	3.8 ± 6.3	80.4	0.001

In

conclusion, the findings of this study confirm that dietary PZQ is an effective strategy against helminths of farmed *Seriola* spp. Particularly, oral PZQ treatment of 150 mg/kg fish for three days can considerably reduce *Z. seriolae* in greater amberjack and thus, efficiently replace the commonly used but time- and labour-consuming hydrogen peroxidase baths. Future attempts should concentrate on testing different PZQ dosing schedules. For example, whether an enhanced PZQ treatment schedule combining two dosing periods, is more effective than single treatments against *Z. seriolae* infections in greater amberjack, remains to be elucidated in following trials.

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 *Pseudodactylogyrus bini*. *Acta Vet. Scand.*, 28, 447-450.

Forwood, J.M., Bubner, E.J., Landos, M., Deveney, M.R., D'Antignana, 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 seriolae* 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.

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., 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 *Zeuxaptaseriolae* and *Benedeniaseriolae* (Monogenea) in yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 77(3), 199-205.

Yamamoto, S.; Shirakashi, S.; Morimoto, S.; Ishimaru, K.; Murata, O. Efficacy of oral praziquantel treatment against the skin fluke infection of cultured chub mackerel, *Scomber japonicus*. *Aquaculture* 2011, 319, 53-57, doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.045>.