

Protokoll

Bioassay med bendelmark (*Eubothrium sp.*) og praziquantel



Sigmund Sevattal
November 2014

Hensikt

Denne protokollen beskriver gjennomføring av bioassay med bendelmark (*Eubothrium* sp.) fra laks og regnbueørret, for måling av følsomhet mot praziquantel.

Gjennomføring av test – steg for steg

Før innsamling:

Klargjør stamløsning med praziquantel

Klargjør øvrig utstyr iht appendix 1

Innsamling:

Samle inn mager med bendelmark fra laks/ regnbueørret

Legges og transporteres på fysiologisk saltvann

Samle inn hele bendelmark dvs med scolex

Fortynning og eksponering:

Fortynn eksponeringsløsninger iht tabell 1

Eksponering i 12 timer, 12 °C

Evaluer respons, fyll inn evalueringsskjema (appendix 2)

Estimering av følsomhet

Valg av test (flere doser – «en-dose»)

Ved å benytte flere doser kan en verdi for LC₅₀ («Lethal Concentration» som dreper 50 % av individene) regnes ut. Det finnes validerte resultater fra den standardiserte testen som denne protokollen beskriver, for både følsom og resistent bendelmark. Dette gjør at kan verdier for LC₅₀ sammenlignes, vurderes og klassifiseres som følsom eller resistent.

Det er vanskelig og arbeidskrevende å samle inn 60 individer til en teste med 6 doser. Alternativet er å gjennomføre et «en-dose bioassay» med en konsentrasjon; 1.0 ppm + en kontrollgruppe. Denne testen er utviklet fra resultatene av testing med flere doser. Den vil ikke gi en LC₅₀ verdi, men vurderes ut fra antall levende og døde in den ene konsentrasjonen. Resultatet vil også si noe om frekvensen av resistente individer i populasjonen.

Dersom antallet innsamlede individer er < 60 bør det gjennomføres et «en-dose bioassay». Det bør benyttes minimum 10 individer i kontrollgruppen. Det kan med fordel benyttes replikater til testing i 1.0 ppm og kun 10 individer pr. replikat.

Identifikasjon av testsubstans

Praziquantel er et prazinoisoquinolin. Anbefalt dose til behandling av fisk er 10 mg/ kg (10 ppm) fordelt over 2 dager, dvs 5 mg/kg i 2 dager. Eksponering for praziquantel fører til en «transport» av Ca⁺⁺ ioner inn i parasitten, noe som medfører en irreversibel vakuolisering av parasittens integument. Dette medfører at parasitten dør.

Testsubstansen skal identifiseres ved at batchnummeret noteres på evalueringsskjemaet.

Identifikasjon av parasitt

Lokalitet, tidspunkt, involverte personer, behandlingshistorikk og fiskestørrelse skal fylles inn i evalueringsskjema.

Innsamling av mager med bendelmark

Fisk med bendelmark avlives og pylorus, mage og tarm tas ut. Magesekken klippes opp fram til pylorus og skylles i fysiologisk saltvann for å fjerne rester av fôr etc. Deretter legges magen med eksponerte parasitter i fysiologisk saltvann (10 – 20 mager i samme beholder).

Transport

Magene transporteres nedkjølt (på is) til der testen skal gjennomføres. Testen bør starte innen 4 timer etter innsamling av mager.

Innsamling av bendelmark

To (2) plastbakker (helst mørke – grå/ svart) bør være klargjort. En tom (plastbakke 1) og en med fysiologisk saltvann (plastbakke 2). Først helles innholdet, dvs magene i fysiologisk saltvann ned i plastbakke 1. Deretter tas en og en mage over i plastbakke 2. Undersøk deretter om det er hele bendelmark (med *scolex*) i plastbakke 1. En del bendelmark løsner av seg selv under oppbevaring og transport. Hele bendelmark legges i petriskåler med fysiologisk saltvann. Når innholdet i plastbakke 1 er undersøkt og eventuelle hele bendelmark er tatt vare på, kan dette kastes. Deretter undersøkes magene hver for seg i plastbakke 1. Parasitter som ligger kveilet i pylorus blindsekker klemmes ut. Dra forsiktig i parasittene slik at *scolex* løsner. Klipp av ca 7 cm bak scolex og legg delen med scolex i petriskål med fysiologisk saltvann.

Stamløsning og fortynning av praziquantel konsentrasjon til bioassay

Praziquantel løses dårlig i vann, men godt i etanol. Etanol benyttes derfor til stamløsning.

Det er ikke ønskelig med effekt av etanol på *Eubothrium* sp. i bioassay. For å unngå dette ved eksponering i høyeste dose (100 mg/ l), lages en stamløsningen med høy konsentrasjon.

Stamløsning:

500 mg (0.5 g) praziquantel + 50 ml etanol = 10 g / l

Tabell 1. Fortynning og eksponeringsløsninger

Stamløsning		Eksponeringsløsninger			
Fortynning	Konsentrasjon	Antall ml fys. saltvann	Tilsettes antall ml praz løsning	Konsentrasjon på tilsatt løsning	Konsentrasjon
500 mg + 50 ml etanol	10 g praz./ L	49.5	0.5	10 g/L - stamløsn	100 ppm (100 mg/L)
		45	5	100 ppm	10 ppm
		45	5	10 ppm	1 ppm
		45	5	1 ppm	100 ppb (0.1 ppm)
		45	5	100 ppb	10 ppb
		50	0	-	0

Gjennomføring

Det benyttes 45 – 50 ml i glass med skrulokk (polystyren) til hver gruppe. Dette volumet er lite nok til å få plass i en petriskål ved evaluering. Hele innholdet i glasset kan derfor helles over i en petriskål.

Eksponeringsglassene (inkl. lokket) merkes godt med vannfast tusj.

Eksponeringsløsningene på 50 ml kan lages direkte i eksponeringsglassene. Start med kontrollgruppen for å unngå kontaminering. Fyll eksponeringsglass med 49.5 ml og 45 ml fysiologisk saltvann iht tabell 1. lag deretter høyeste konsentrasjon (100 ppm) ved å tilsette 0.5 ml stamløsning. Ta 5 ml fra høyeste konsentrasjon over i nest høyeste kons, osv i henhold til tabell 1.

Deretter fordeles bendelmark tilfeldig i hver av eksponeringsløsningene. Det bør være like mange i hver konsentrasjon. Pass på at ikke kontrollgruppen kontamineres med pinsetten.

Bendelmark skal eksponeres 12 timer ved 12 C

Evaluering av respons

Etter 12 timers eksponering helles innholdet av hvert eksponeringsglass over i en petriskål. Antall levende bendelmark undersøkes mot en mørk bakgrunn. Bendelmark med bevegelser registreres som levende. Bendelmark uten bevegelser registreres som døde. Hvert individ undersøkes nøye ved gjentatt berøring med pinsett. Start med kontrollgruppen. Ta høyeste konsentrasjon tilslutt. Antall levende og døde noteres på evalueringsskjema.

Statistikk og evaluering av følsomhet

Respons regnes ut som LD₅₀ med probit analyse.

Grenseverdier

Grenseverdier for resistens / nedsatt følsomhet er satt til 1.0 ppm. Dersom LC₅₀ er lavere enn 1.0 ppm er det ikke definert som resistens / nedsatt følsomhet.

NB: Dersom respons i kontrollgruppen er $\geq 20\%$ bør testen forkastes.

«En-dose» bioassay

Dersom det er færre individer enn 60 til testing, kan grenseverdien på 1.0 ppm benyttes i et «en-dose bioassay», der innsamlede bendelmark fordeles på kun 2 konsentrasjoner; kontroll og 1.0 ppm.

Det bør benyttes minimum 10 individer i kontrollgruppen. Det kan med fordel benyttes flere grupper til testing i 1.0 ppm og kun 10 individer pr. gruppe.

De to eksponeringsløsningene lages iht. tabell 1. Respons evalueres på samme måte, men følsomhet vurderes ut fra % respons i 1.0 ppm gruppen.

< 70 % respons = følsom

> 70 % respons = resistens

NB: Dersom respons i kontrollgruppen er $\geq 20\%$ bør testen forkastes.

Appendix

Liste med nødvendig utstyr
Evalueringskjema

Appendix 1. Liste over nødvendig utstyr

Utstyr	Antall	Merknad
Stamløsning med praziquantel	1	10 g praziquantel/ liter
Fysiologisk saltvann	Minimum 2 liter	Helst 3 liter
Kniv	1	
Saks	1	
Pinsett	1	
Plastbøtte	1	Til skylling
Beholder med lokk	1 - 2	Til transport, størrelse avhenger av fiskestørrelse og antall mager
Plastbakke	2	
Eksporeringsglass	6	
Målesylinder, 50 ml	1	Minimum 5 ml inndeling
petriskåler	10	
Isoporeske	1	
Digitalt termometer	1	
Kjøleelement	1	
Autopipette (0.5 ml)	1	
Pipettespisser		

Appendix 2. Evalueringsskjema

Dato	Utført av	Lokalitet	Tidligere behandlet	
			Dato	Resultat
Fiskevekt:				
Batch praziquantel:				
Dose	Tot. antall	Ant. døde	Grenseverdier	
0			LD50 < 1.0 ppm = følsom LD50 > 1.0 ppm = resistent	
10 ppb				
100 ppb				
1 ppm			< 70 % respons = følsom > 70 % respons = resistens	
10 ppm				
100 ppm				