

## Eficacia del praziquantel frente a metacercarias *Brachylaima* sp. en gasterópodos terrestres de consumo humano. Requisitos EMA/VICH.

Laia Gállego y Mercedes Gracenea  
Secció Departamental de Parasitologia  
Departament de Biologia, Sanitat i Medi Ambient  
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació

Introducción

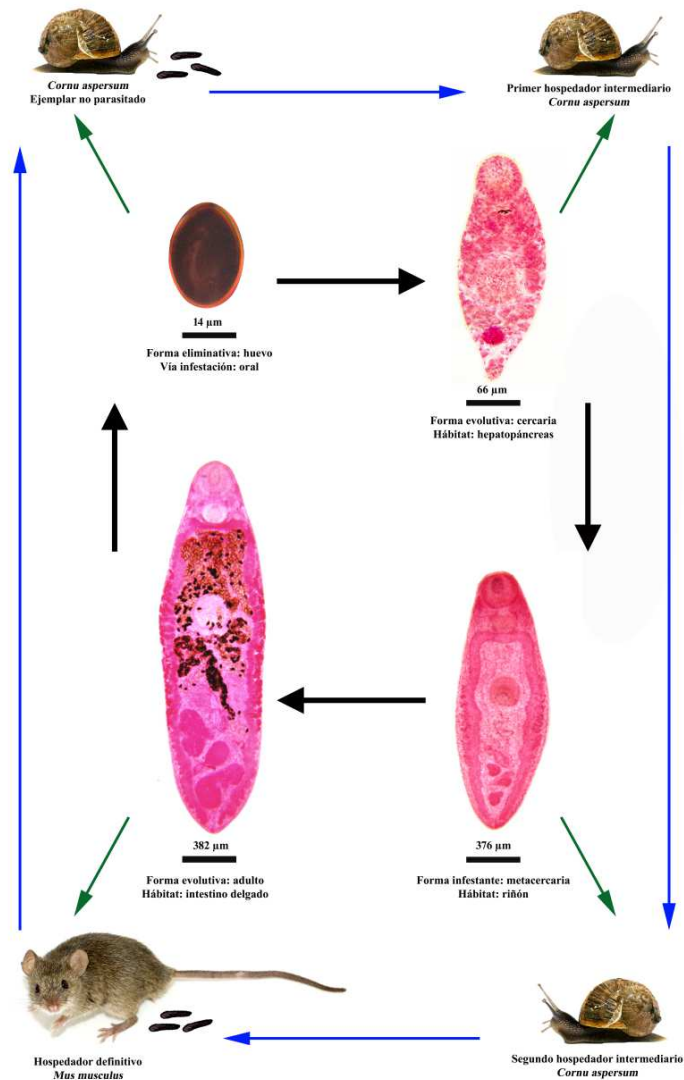
Conceptos

Diseño

Resultados

Conclusiones

## Ciclo biológico de *Brachylaima* sp.



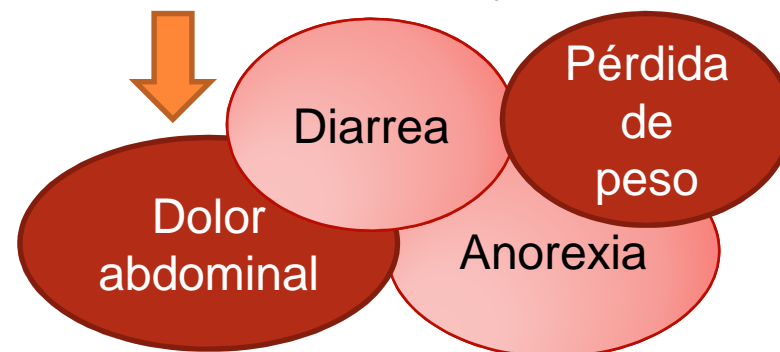
- **Emisor:** emite cercarias que parasitan al propio emisor y al resto de caracoles *C. aspersum*

**METACERCARIAS**



**Adultos**

- **Forma infestante:** metacercarias
- **Huésped definitivo:** pequeños mamíferos, el hombre
- **Hábitat:** intestino delgado
- **Parasitosis:** brachylaimiasis



Introducción

Conceptos

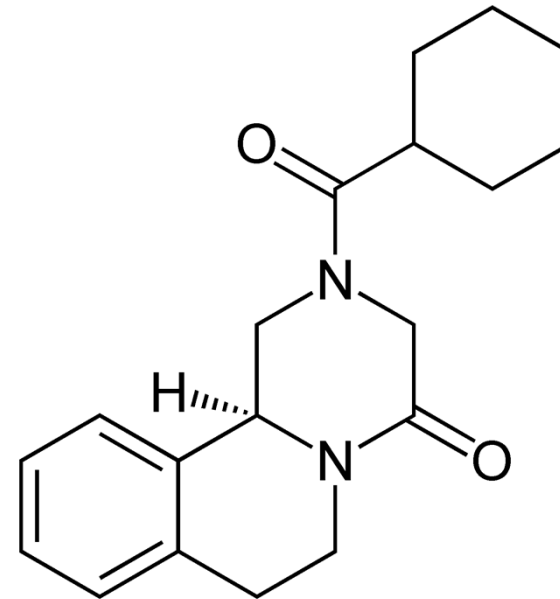
Diseño

Resultados

Conclusiones

# Praziquantel

- Tratamiento antihelmíntico de elección para trematodos.
- Fuera de España está autorizado el uso humano para el tratamiento de la schistosomiasis.
- En España está autorizado para uso veterinario.
- Su mecanismo de acción es desconocido.
- El praziquantel produce contracción de los parásitos y vacuolización del tegumento produciéndose así su eliminación.



Introducción

Conceptos

Diseño

Resultados

Conclusiones

# ¿Cómo se demuestra la eficacia de un antihelmíntico de uso veterinario para el registro de una nueva indicación?

VICH GL7 (ANTHELMINTICS GENERAL)  
November 2000  
For implementation at Step 7

## **EFFICACY OF ANTHELMINTICS: GENERAL REQUIREMENTS**

VICH is a trilateral (EU-Japan-USA) programme aimed at harmonising technical requirements for veterinary product registration. Its full title is the **International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products**. VICH was officially launched in April 1996.





## Ensayos controlados: conceptos básicos

Un **ensayo controlado** siempre tiene un **grupo control** y un **grupo tratamiento**.

Al **grupo control** se le puede asignar:

- Si se permite por GCP, un **placebo** o nada (grupo de no intervención)
- **Tratamiento de referencia**

Al **grupo tratamiento** se le asigna el **fármaco** que quiere evaluarse su eficacia.





# Ensayos controlados: conceptos básicos

## Ensayo de determinación de dosis

### 1 - Dose Determination Studies

Dose titration trials shall from now on be referred to as dose determination studies, **their purpose being to determine the dose rate to be recommended for the particular target animal.** The studies may or may not be conducted using the final formulation. However, if not, any changes in the formulation must be scientifically justified. Some regulatory authorities may waive the requirement for a dose determination study where alternative data are presented to support the intended dosage. For generic products, where the optimum dose of the active ingredient has already been generally adopted, dose determination studies are not necessary.

## Ensayo de confirmación de dosis

### 2 - Dose Confirmation Studies

These studies **should be conducted using the final formulation of the drug** to be commercialized. The dose confirmation work should not be conducted on known drug resistant strains of parasites. To investigate effectiveness against adult parasites, **naturally infected animals are preferred.**





## Ensayos controlados: conceptos básicos

### Criterio(s) de inclusión:

- Una serie de puntos que deben cumplirse para formar parte del ensayo controlado.
- En el caso de animales para un antihelmíntico, puede ser **“la adecuación de la infestación”**.

*Ejemplo:* que la población que participe en el ensayo controlado tenga una prevalencia superior al 80%.





# Eficacia en antihelmínticos

- Según la VICH:

## 5 - Standards of Effectiveness

A compound should be declared effective only when effectiveness against each parasite declared on the labelling stands at 90% or above, based on calculation of geometric means using pooled data (when appropriate), and there is a statistically significant difference in parasite numbers between control and treated animals. However, there are regional differences where the epizootiology of certain parasitic infections may require higher minimal effectiveness, especially when the aim for drug effectiveness is focussed specifically on preventing pasture contamination. These will be covered in the individual host species guidelines. Effectiveness below 90% may be adequate when the claimed parasites do not have any other effective treatment.

## ¿A qué se refiere con una eficacia del $\geq 90\%$ ?

En el caso de antihelmínticos se refiere a la reducción de la carga parasitaria de por lo menos el 90%, basada en el cálculo de medias geométricas

$$\%Eficacia = \frac{MG_{Grupo\ Control} - MG_{Grupo\ Tratamiento}}{MG_{Grupo\ Control}} \cdot 100 \geq 90\%$$





Introducción

Conceptos

Diseño

Resultados

Conclusiones

## Eficacia en antihelmínticos

- Según la VICH GL7:

### 5 - Standards of Effectiveness

A compound should be declared effective only when effectiveness against each parasite declared on the labelling stands at 90% or above, based on calculation of geometric means using pooled data (when appropriate), and there is a statistically significant difference in parasite numbers between control and treated animals. However, there are regional differences where the epizootiology of certain parasitic infections may require higher minimal effectiveness, especially when the aim for drug effectiveness is focussed specifically on preventing pasture contamination. These will be covered in the individual host species guidelines. Effectiveness below 90% may be adequate when the claimed parasites do not have any other effective treatment.

$$\left( \prod_{i=1}^n a_i \right)^{1/n} = \sqrt[n]{a_1 a_2 a_3 \dots a_n}$$

Ejemplo:

GRUPO A  
(n=6)

5  
1  
3  
8  
20  
212



¿Por qué se utiliza la media geométrica en vez de la media aritmética?

Media Aritmética 41,50

Media Geométrica 8,93

La intensidad de los parásitos es muy variable de un huésped a otro, la media geométrica da un valor más real de la parasitación del grupo.



Introducción

Conceptos

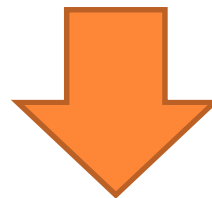
Diseño

Resultados

Conclusiones

## Problemas en el caso de *Brachylaima* sp.

- 1) Sólo podemos detectar la infestación por metacercarias mediante disección y la consecuente muerte del caracol, ¿cómo podemos asegurar la adecuación de la infestación en la población que usaremos en los ensayos?
- 2) Trabajaremos con grupos que contienen caracoles sanos por lo que la media geométrica será 0 y no podremos utilizarla. ¿Qué podemos utilizar?
- 3) ¿Cómo administraremos el praziquantel a los caracoles?



# SOLUCIONES



Introducción

Conceptos

Diseño

Resultados

Conclusiones

## Problemas en el caso de *Brachylaima* sp.

**1) Sólo podemos detectar la infestación por metacercarias mediante disección y la consecuente muerte del caracol, ¿cómo podemos asegurar la adecuación de la infestación en la población que usaremos en los ensayos?**

Estableciendo un criterio de inclusión que nos asegure que la mayor parte de la población que vamos a distribuir entre grupo control y grupo tratamiento está parasitada.

*“El límite inferior del intervalo de confianza 95% para la prevalencia será  $\geq 60\%$ .”*

$$p_{inferior}, p_{superior} = p \pm Z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}}$$

p=prevalencia;  $Z_{(\alpha/2)}=1.96$  para  $\alpha=0.05$ ;  $q=1-p$ ;  
n=número de especímenes analizados





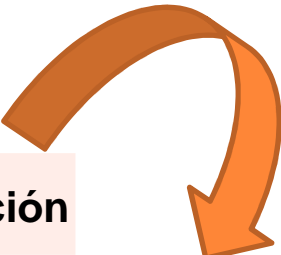
## Problemas en el caso de *Brachylaima* sp.

- 2) Trabajaremos con grupos que contienen caracoles sanos por lo que la media geométrica será 0 y no podremos utilizarla. ¿Qué podemos utilizar?

Existe una corrección llamada “**Media de Williams**” que consiste en sumar 1 a todos los valores, calcular la media geométrica y restar 1 al resultado.

*Ejemplo:*

GRUPO A (n=7)	Corrección
0	1
5	6
1	2
0	1
8	9
20	21
212	213



Media Geométrica	6,49
Media de Williams	5,49



Introducción

Conceptos

Diseño

Resultados

Conclusiones

## Problemas en el caso de *Brachylaima* sp.

### 3) ¿Cómo administraremos el praziquantel a los caracoles?

En una granja de caracoles hay miles de caracoles, aunque la vía inyectable fuera viable en laboratorio, luego no sería viable en granjas.

La forma más sencilla de administrar el fármaco es con el pienso de engorde, fácil de realizar en el laboratorio y posteriormente viable en las granjas.



*Detalle de las lonas de descanso para los caracoles y el sistema de alimentación. (Fotografía: Laia Gállego, derechos ElServier©).*



- Test de determinación de dosis: administración individual (1 caja = 1 caracol).
- Test de confirmación de dosis: administración en grupo (1 caja = 10 caracoles).



Introducción

Conceptos

Diseño

Resultados

Conclusiones

## Test estadísticos

- No basta con todo lo anterior, debemos asegurar que la eficacia del  $\geq 90\%$  es significativa.
- El test que utilizaremos debe estar definido antes de cualquier análisis de datos.

### 4.1 Data analysis recommendations

The statistical analysis of the study is a two-stage procedure. The requirements for approval of an anthelmintic product are based on significant statistical differences between the treated and control groups and on calculated percent effectiveness of 90% or more.

The type of statistical analyses must be determined by the sponsor in the protocol stage prior to any data analyses. Nonparametric or parametric procedures are acceptable. If the sponsor is able

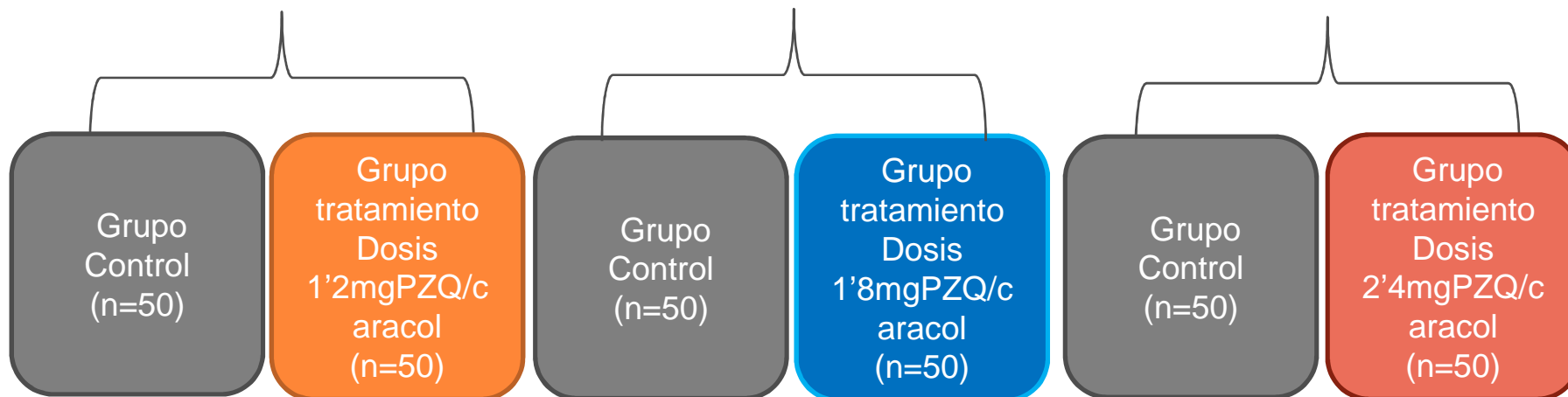
- Test Mann-Whitney (o Wilcoxon) es un test no paramétrico (podemos usarlo en poblaciones de distribución no normal) que compara rangos de datos de dos grupos.



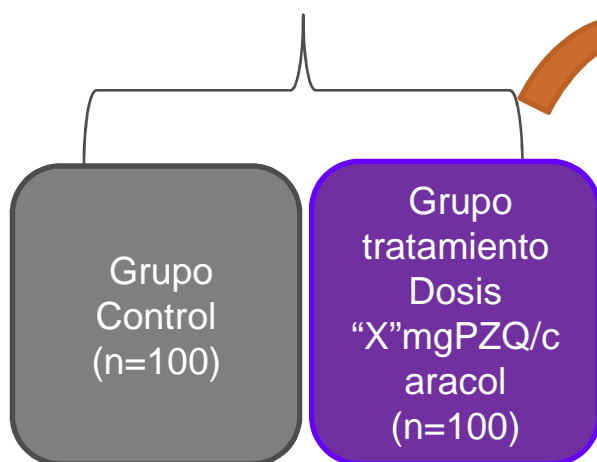


# Diseño del ensayo controlado

## TEST DE DETERMINACIÓN DE DOSIS: individual



## TEST DE CONFIRMACIÓN DE DOSIS: en cajas de 10 ejemplares



Se utilizará la dosis que mejores resultados haya obtenido en el test de determinación.



Introducción

Conceptos

Diseño

Resultados

Conclusiones

# Diseño del ensayo controlado

## TEST DE DETERMINACIÓN DE DOSIS: INDIVIDUAL

- ❑ Se dispuso en cada grupo de forma individual la dosis correspondiente, cuando el caracol acabó su dosis asignada se analizó.
- ❑ Se dejó 10 días para que los caracoles pudieran comer ya que muchos permanecen dentro de sus cáscaras.
- ❑ Normalmente, cuando despiertan y comen, consumen la dosis asignada como “dosis única”. Los grupos control se analizaron directamente (grupo de no intervención).
- Dosis **1'2mgPZQ/caracol** (100 mg de pienso 12mgPZQ/g) en cada caja.
- Dosis **1'8 mgPZQ/caracol** (150 mg de pienso 12mgPZQ/g) en cada caja.
- Dosis de **2'4 mgPZQ/caracol** (200 mg de pienso 12mgPZQ/g) en cada caja.





Introducción

Conceptos

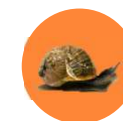
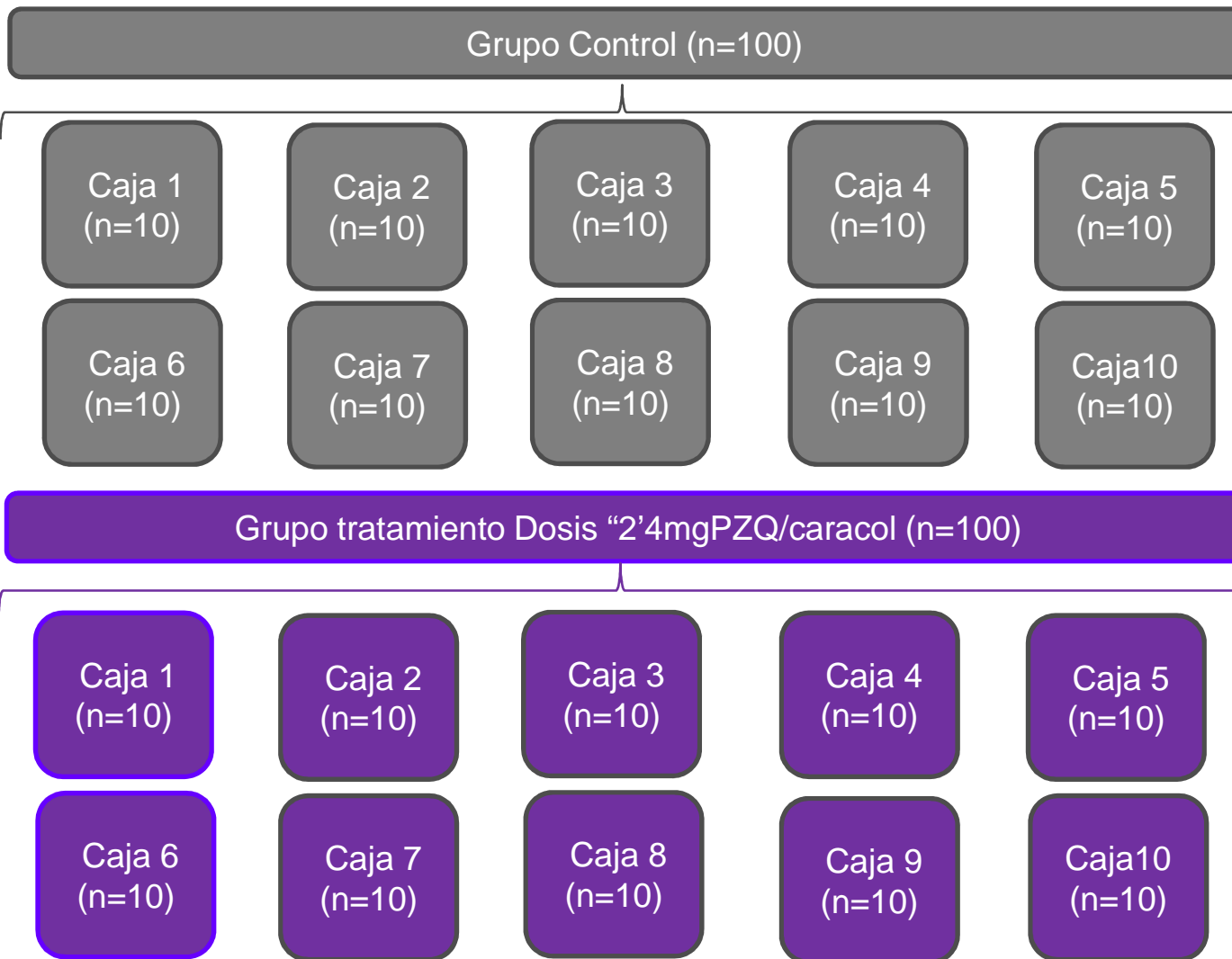
Diseño

Resultados

Conclusiones

# Diseño del ensayo controlado

**TEST DE CONFIRMACIÓN DE DOSIS: en cajas de 10 ejemplares**



Introducción

Conceptos

Diseño

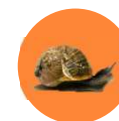
Resultados

Conclusiones

## Diseño del ensayo controlado

### TEST DE CONFIRMACIÓN DE DOSIS: en cajas de 10 ejemplares

- En cada caja se dispuso cada día 2 g de pienso (grupo control) y 2 g de pienso suplementado con praziquantel 12mgPZQ/g (correspondería a dosis 2'4 mg/caracol si todos comieran igual) durante 7 días.
- Se controló el consumo de pienso tanto en el grupo control como en el grupo tratamiento a diario.
- Los caracoles suelen comer de forma organizada alrededor del pienso.



Introducción

Conceptos

Diseño

Resultados

Conclusiones

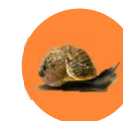
## Resultados

### TEST DE DETERMINACIÓN DE DOSIS: individual

	Marketplace A					
	Lot 1		Lot 2		Lot 3	
	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment
<b>Metacercarial burden</b>	(n=50)	1.2 mg/snail (n=49)	(n=50)	1.8 mg/snail (n=46)	(n=50)	2.4 mg/snail (n=49)
Range	0-100	0-22	0-100	0-9	0-70	0-3
Arithmetic Mean±SD	7.90±15.6	2.27±4.03	15.96±20.60	0.48±1.49	5.44±11.07	0.06±0.43
Williams Mean	3.22	1.13	8.44	0.23	2.27	0.03
Efficacy	-	64.8%	-	97.3%	-	98.7%
<b>Prevalence assessment</b>						
Prevalence	86.0%	59.2%	94.0%	17.4%	72.0%	2.04%
Prevalence CI 95%	76.4%-95.6%	-	87.4%-100%	-	60.0%-83.0%	-

Aunque las diferencias encontradas en las tres dosis respecto sus grupos control fueron significativas, la dosis de 1'2mgPZQ/caracol sólo alcanzó eficacia 64'8%, no cumpliendo con las exigencias de la VICH.

1'8 y 2'4mgPZQ/caracol SÍ cumplieron, demostrando eficacias del 97'3% y 98'7% respectivamente.



Introducción

Conceptos

Diseño

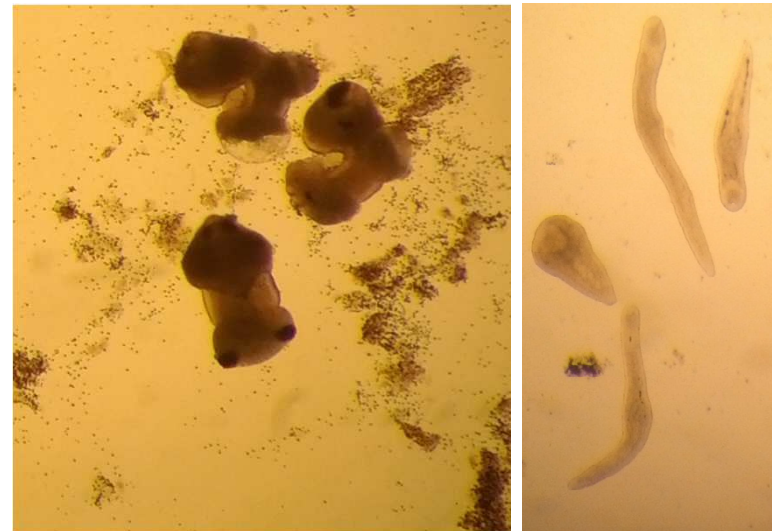
Resultados

Conclusiones

## Resultados

### TEST DE CONFIRMACIÓN DE DOSIS: en cajas de 10 ejemplares

<b>Metacercarial burden</b>	<b>CONTROL</b> (n=99)	<b>TREATMENT</b> 2.4 mg PZQ/snail (n=99)
Range	0-35	0-6
Arithmetic Mean	5.01±7.38	0.26±0.95
Williams' Mean	2.35	0.13
Efficacy	-	94.6%
<b>Prevalence</b>	68.7%	10.1%



- El ensayo de confirmación de dosis demostró eficacia 94'6% ( $p < 0.001$ , Mann-Whitney test).
- No se observó mortalidad ni toxicidad aparente en los caracoles tratados.



Introducción

Conceptos

Diseño

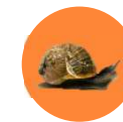
Resultados

Conclusiones

# Resultados

## TEST DE CONFIRMACIÓN DE DOSIS: consumo de pienso

CONTROL GROUP (n=99)	Box 1 n=10	Box 2 n=10	Box 3 n=10	Box 4 n=10	Box 5 n=10	Box 6 n=10	Box 7 n=10	Box 8 n=10	Box 9 n=10	Box 10 n=9	Snail food consumed per day
Day 1	0.321	0.167	0.127	0.257	0.250	0.463	0.379	0.249	0.610	0.029	2.852
Day 2	0.278	0.035	0.616	0.858	0.681	0.013	0.558	0.600	0.904	0.389	4.932
Day 3	1.896	1.157	2.008	2.004	0.964	1.885	2.059	2.038	2.003	2.031	18.045
Day 4	2.018	2.016	2.065	2.079	1.441	2.011	2.028	2.062	1.623	1.897*	19.24
Day 5	2.030	2.031	2.024	2.039	2.063	2.081	2.061	2.038	2.065	1.405	19.837
Day 6	1.955	1.845	1.492	1.744	1.689	2.086	1.844	2.046	1.782	1.041	17.524
Day 7	2.100	2.030	2.063	2.034	2.059	2.061	2.063	2.055	2.014	2.061	20.54
<b>Snail food consumed per box</b>	10.598	9.281	10.395	11.015	9.147	10.6	10.992	11.088	11.001	8.853	<b>102.970</b>
TREATMENT GROUP (n=99)	Box 1 n=10	Box 2 n=10	Box 3 n=10	Box 4 n=10	Box 5 n=10	Box 6 n=10	Box 7 n=10	Box 8 n=10	Box 9 n=10	Box 10 n=9	Snail food consumed per day
Day 1	0.728	0.447	0.910	0.662	0.662	0.111	0.737	0.292	0.191	0.536	5.276
Day 2	0.721	0.670	0.619	0.364	0.364	0.355	0.223	0.832	0.212	0.999	5.359
Day 3	1.367	1.333	1.303	1.036	1.036	1.771	1.599	1.710	1.764	1.572	14.491
Day 4	1.367	1.195	1.426	1.197	1.197	1.291	1.525	0.959	1.613	1.380*	13.150
Day 5	1.248	1.287	0.943	0.992	0.992	1.245	1.153	0.960	0.878	0.927	10.625
Day 6	1.063	0.913	1.707	0.888	0.888	0.755	1.491	1.409	1.433	1.180	11.727
Day 7	2.057	2.025	2.029	2.058	2.058	2.019	2.038	2.016	2.07	2.008	20.378
<b>Snail food consumed per box</b>	8.551	7.870	8.937	7.197	7.197	7.547	8.766	8.178	8.161	8.602	<b>81.006</b>



Introducción

Conceptos

Diseño

Resultados

Conclusiones

## Resultados

### TEST DE CONFIRMACIÓN DE DOSIS: consumo de pienso

- No se encontraron diferencias intra-grupo ni en el grupo control ni en el tratamiento ( $p=0.996$  y  $p=0.908$ , ANOVA, Post-Hoc Tukey).
- Sí se encontraron diferencias significativas entre el consumo del grupo control versus el grupo de tratamiento ( $p<0.001$ , ANOVA).

**Grupo control 10.297 g de pienso por caja**

**Grupo tratamiento 8'10 g de pienso por caja**

- El praziquantel tiene un sabor amargo, en algunos animales y en humanos se ha descrito la aversión por su sabor.
- En el caso de *Cornu aspersum* el sabor del praziquantel no afecta a la eficacia.



Introducción

Conceptos

Diseño

Resultados

Conclusiones

## Conclusiones

- ✓ El praziquantel ha demostrado eficacia en el tratamiento de metacercarias *Brachylaima* sp. parasitando *Cornu aspersum*.
- ✓ *Cornu aspersum* ha tolerado el tratamiento con PZQ no produciéndose altas tasas de mortalidad.
- ✓ Las diferencias de consumo entre el grupo control y el grupo tratamiento, no han afectado a la eficacia.
- ✓ La metodología propuesta en el laboratorio, sería fácilmente adaptable en una granja aprovechando el sistema de alimentación habitual y viable económicamente.



# Si tenéis curiosidad...

Experimental Parasitology 157 (2015) 92–102



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Experimental Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexpr](http://www.elsevier.com/locate/yexpr)



Full length article

## Praziquantel efficacy against *Brachylaima* sp. metacercariae (Trematoda: Brachylaimidae) parasitizing the edible landsnail *Cornu aspersum* and its HPLC-MS/MS residue determination



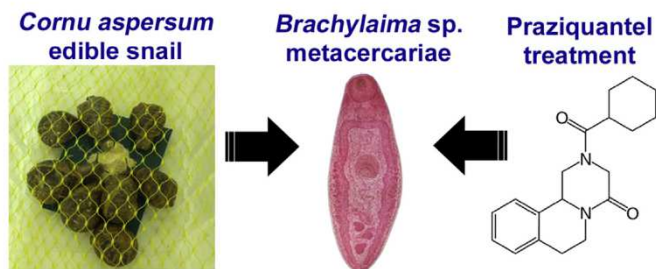
Laia Gállego, Mercedes Gracenea\*

Laboratory of Parasitology, Department of Health Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

### HIGHLIGHTS

- Praziquantel reduces 95% the *Brachylaima* metacercarial burden in *Cornu aspersum*.
- A first approach to treat terrestrial snails following EU guidelines is reported.
- Praziquantel is well tolerated by *C. aspersum* through oral dose in snail food.
- A method to quantify praziquantel in gastropod matrix is set up (EMA criteria).

### GRAPHICAL ABSTRACT





# Links de interés:

[European Medicines Agency](#)

[ICH Guidelines](#)

[VICH Guidelines](#)



**Si os interesan los ensayos clínicos en humanos:**

[Aquí](#) están todos los topics

**GCP (Good Clinical Practice) clave tanto en los ensayos clínicos humanos como veterinarios:**

- Humanos: ICH TOPIC E6 ([R1](#) y [R2](#))
- Animales: VICH [GL9](#)

**Todos estos contenidos son de libre acceso están todos las guías que se utilizan en industria farmacéutica: eficacia, calidad, farmacovigilancia y multidisciplinarias.**



¡Muchas gracias por  
vuestra atención!

