



Protocolo general para pruebas de dosis letal 50 (DL₅₀) con inóculo de *Piscirickettsia salmonis*

(Versión revisada sept. 2016)

*Preparado por el Departamento de
Salud Hidrobiológica del
Instituto de Fomento Pesquero*



1. Introducci3n y justificaci3n.

Un componente importante en todo estudio que pretenda estandarizar desaf3os experimentales con agentes pat3genos, es la dosis requerida de 3stos, que produce el 50% de muertes de una poblaci3n de animales (DL_{50}). Para esto es necesario elegir el modelo de infecci3n experimental m3s adecuado para el organismo a evaluar.

Los dise3os experimentales para desaf3os en peces salmon3deos utilizan diversas v3as de infecci3n, como por ejemplo, cohabitaci3n (Leblanc et al., 2012, Mjaaland et al., 2005, Totland et al., 1996), inyecci3n intraperitoneal (Rolland and Winton, 2003, Mikalsen et al., 2005, Kibenge et al., 2006, Devold et al., 2000, Glover et al., 2006, Totland et al., 1996, Nylund et al., 1997) o ba3os (Mikalsen et al., 2001). La elecci3n de ocupar una u otra forma de desaf3o est3 en directa relaci3n con la forma de diseminaci3n del pat3geno dentro de la poblaci3n de peces (Commission of the European Communities, 2011) y lo que se pretende responder en cada estudio (patogenia, evaluaci3n de vacunas).



2. Objetivo general

Describir los procedimientos para determinar la DL_{50} de un in3culo de *P. salmonis* para ser utilizado en pruebas de evaluaci3n de vacunas.

3. Dise1o experimental

3.1. Peces

Se utilizar3n salm3nes del Atl3ntico (*Salmo salar*) con un peso de 40+/-3 g provenientes de pisciculturas con ciclo completo en tierra. Los peces deber3n contar con los siguientes requisitos para ser utilizados previo al ingreso al centro experimental:

- *Cepa de peces a evaluar*: Los peces no deben haber sido vacunados contra ninguna enfermedad.
- *Condici3n productiva*: Los peces deben poseer3ptima condici3n productiva. No se admitir3n peces rezagados o de descarte.
- *Condici3n sanitaria*: Treinta (30) peces deber3n ser muestreados para verificar la ausencia de pat3genos causantes de flavobacteriosis, renibacteriosis, necrosis pancre3tica infecciosa y anemia infecciosa del salm3n. Las muestras de tejido se enviar3n al laboratorio diagnostico para an3lisis utilizando t3cnicas de PCR, cultivo bacteriol3gico, cultivo celular o IFAT, seg3n corresponda.

3.2. Condiciones ambientales.

Los par3metros de la tabla 1 se deber3n medir y mantener diariamente en concordancia con lo recomendado para un correcto bienestar de los peces (European Food Safety Authority, 2008, RSPCA, 2010).



Tabla 1. Parámetros ambientales durante la prueba

Parámetro	Unidad	Valor	Observaci3n
Densidad peces	kg/m ³	25	Densidad final máxima
Temperatura agua	°C	12	Rango 10 – 14 (Hueihue)
Oxígeno disuelto agua	mg/l	8	Mínimo 5, máximo 12
Tasa recambio agua	l/kg pez/min	0,8	Como mínimo

3.3. Desafío con inóculo bacteriano

Se realizará el desafío al menos en duplicado para cada diluci3n del inóculo y sus correspondientes controles negativos.

Los grupos experimentales estarán constituidos por al menos 40 peces, en estanques diferentes de 300 litros.

La cepa bacteriana a utilizar debe tener una virulencia verificada por al menos 2 pasajes *in vivo*. La cepa corresponderá a un aislado previamente evaluado respecto de su viabilidad y potencia. Dicha cepa corresponderá a la misma que posteriormente deberá ser utilizada en las correspondientes pruebas de eficacia de vacunas contra *P. salmonis*.

Para la cepa seleccionada, se deberán indicar sus características y protocolos de manejo en relaci3n a líneas celulares de crecimiento, TCID₅₀. El laboratorio entregará el inóculo preparado con su respectivo análisis y estimaci3n de la TCID₅₀, según el método de Spearman-Kärber (Hubert 1984) y se manejará de acuerdo al procedimiento previamente citado.

Considerando que se conocerá estimativamente la DL₅₀ del inóculo, se necesitarán menos condiciones experimentales y los siguientes grupos experimentales:

- Grupo directo (D0): Se inocularán 40 peces con 0,1 ml de 10^{9,22} x ml⁻¹ por vía intraperitoneal y se incorporarán al estanque de desafío.
- Grupo diluci3n 1 (D1): Se inocularán 40 peces con 0,1 ml de 10^{8,22} x ml⁻¹ por vía intraperitoneal



y se incorporarán al estanque de desafío.

- Grupo diluci3n 2 (D2): Se inocularán 40 peces con 0,1 ml de $10^{7,22} \times \text{ml}^{-1}$ por vía intraperitoneal y se incorporarán al estanque de desafío.
- Grupo diluci3n 3 (D3): Se inocularán 40 peces con 0,1 ml de $10^{6,22} \times \text{ml}^{-1}$ por vía intraperitoneal y se incorporarán al estanque de desafío.
- Grupo control (CN): Se inocularán 40 peces con 0,1 ml de PBS1x.

De forma general, los peces a utilizar serán extraídos desde el estanque de mantenci3n y trasladados a un estanque con una soluci3n anestésica. La soluci3n anestésica consistirá en 15 ml de benzocaína líquida, disuelta en 100 L de agua. Una vez que los peces hayan alcanzado el plano anestésico III (Ross and Ross, 2008), se tomarán individualmente y se sostendrán con la cara ventral hacia arriba y la cabeza dirigida lejos del cuerpo del operador. El tamaño de la aguja deberá ser la apropiada para el tamaño de los peces. El punto de inyecci3n será en la línea media ventral a una distancia entre $\frac{1}{2}$ y 1 longitud de aleta pectorales, posterior a la base de esta aleta. La aguja se insertará lentamente en un ángulo de lo más cercano a 45° en la línea media ventral entre las aletas pectorales y las pélvicas, y el inoculo se inyectará intraperitonealmente.

La duraci3n del desafío será de 45 días, hasta alcanzar el 100% de mortalidad ó hasta que la mortalidad acumulada no aumente por 3 días consecutivos mayor al 60%.

Los peces vivos restantes al termino del desafío serán eutanasiados con una sobredosis de anestesia (> 250 mg/l de benzocaína clorhidrato) y se enviarán muestras de órganos para el laboratorio diagnóstico para evaluar de presencia o ausencia de algùn pat3geno.

3.4. Alimentaci3n

Los peces serán alimentados a saciedad en dos tomas al día utilizando alimento comercial sin aditivos, inmunoestimulantes o colorantes, suministrado mediante alimentadores automáticos, de acuerdo a las necesidades nutricionales de los peces. Como se señaó previamente, la alimentaci3n se suspenderá 24 horas antes la inoculaci3n para ser restituida al día siguiente. La cantidad de alimento suministrado se ajustará una vez por semana de acuerdo al crecimiento esperado de los peces.



3.5. Parámetros a evaluar en la prueba de determinaci3n de DL₅₀

Mortalidad: Se chequeará, registrará y retirará la mortalidad en todos los grupos experimentales en la mañana y en la tarde de cada día experimental. Se identificará cada pez muerto de acuerdo al marcaje realizado. Todo pez muerto será enviado al laboratorio de diagnostico para confirmaci3n del agente causal.

3.6. Interpretaci3n de los resultados de la prueba de determinaci3n de DL₅₀

Con los resultados de mortalidad durante el desafío se determinará la diluci3n de in3culo que se corresponde a DL₅₀.

Para el cálculo de la DL50 se utilizará la fórmula de Reed y Muench, teniendo solo en cuenta los valores próximos al 50% de mortalidad, cálculo de la distancia proporcional de los porcentajes de mortalidad y el logaritmo del incremento de las dos dosis adyacentes a dicho 50% (Jurado, 1989). La determinaci3n de la DL50 se realizará en duplicado para cada especie salmonídea.

Factor de distancia proporcional:

DL50:

$$(\log \text{ diluci3n con m3s de 50\% mortalidad}) + (\text{distancia proporcional} \times \log \text{ diluci3n})$$

Distancia proporcional (DP):

$$\frac{\text{mortalidad} > 50\% - 50\%}{\% \text{ mortalidad} > 50\% - \% \text{ mortalidad} < 50\%}$$

Factor de diluci3n: 10; Logaritmo (log) diluci3n: 1



4. T3rmino anticipado de las pruebas

Se pondr3 fin a las pruebas en cualquier momento en caso de que exista la muerte de m3s del 60% de los peces en un s3lo d3a. Este t3rmino temprano se realizar3 mediante el traslado de los peces a estanques que contengan una sobredosis de anest3sico (> 250 mg/l de benzoca3na clorhidrato). Se enviar3n muestras para an3lisis de pat3genos u otra presunta causa.

5. Informe de resultados

Se deber3 entregar un informe cient3fico-t3cnico con los resultados, an3lisis, discusi3n y conclusiones obtenidas dentro de un plazo de 15 d3as finalizada la prueba.

6. Registros

Se contar3 con sistemas de registros (manuales o digitales) de todas las mediciones, actividades, eventos, procedimientos y otros realizados durante las pruebas. Estos registros e informaci3n deber3n ser mantenidos de forma segura para resguardar la total confidencialidad.

7. Referencias

- ALDERMAN, D. 2009. Control of the use of veterinary drugs and vaccines in aquaculture in the european Union. *Options Mediterraneennes*, 86, 13-27.
- COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, C. 2011. Specific requirements for the production and control of live and inactivated vaccines intended for fish. *The Rules Governing Medicinal Products in the European Union*.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY 2008. Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed Atlantic salmon. *The EFSA Journal*, 736, 1-31.
- HUBERT, JJ. 1984. Spearman-Karber Method pp 65-66. In Bioassay, 2nd Ed. Hunt Publishing Co., Dubuque, Iowa.
- JURADO R. 1989. Concepto de Toxicidad Aguda, Cr3nica y Remota. Metodolog3a de la Determinaci3n de la DL50. En Jurado R (ed). Toxicolog3a Veterinaria. 2o edici3n. Salvat editores S.A., 40-45.
- ROSS, L. G. & ROSS, B. 2008. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*, Blackwell Science Ltd.
- RSPCA 2010. RSPCA welfare standards for farmed Atlantic salmon. Royal Society for the Protection and Cruelty of Animals.