



Protocolo para pruebas de seguridad de vacunas contra *Piscirickettsia salmonis*

(v.3.1/Julio 2016)

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



1. Introducción

La tendencia mundial en el área de salud de especies de cultivo acuáticas ha sido reducir el uso de agentes quimioterapéuticos e incrementar el uso de vacunas como herramientas profilácticas.

Sin embargo, se hace necesario disponer del conocimiento científico-técnico que respalde la implementación y uso de estas vacunas en la industria chilena y así alcanzar de forma efectiva una buena seguridad y eficacia hacia los peces tratados (Roth, 2011).

Es importante señalar que existen normas internacionales respecto de las metodologías y protocolos a utilizar en las pruebas de seguridad de vacunas en peces para su registro y comercialización (Commission of the European Communities, 2011; European Parliament and Council, 2001). Todas ellas se basan en la cuantificación del efecto que tiene una dosis doble de vacuna sobre la mortalidad y lesiones (adherencias y melanosis) de los peces tratados dentro de los 21 días posteriores a su aplicación, y en base a los resultados se decide si una vacuna es o no segura.

2. Objetivo general

Determinar la seguridad de las vacunas desarrolladas contra el patógeno *P. salmonis* para salmón del Atlántico.

Nota importante: Este protocolo solo aplica a vacunas inyectables y que no aplica para las vacunas cuya vía de administración sea inmersión (Registro Provisional SAG N° 2225-BP).

3. Diseño experimental

3.1. Peces

Se utilizarán alevines de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) con un peso entre 37 y 43 g al comienzo de las pruebas y 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*: Se debe conocer procedencia y debe ser representativa de la utilizada en la industria.
- *Condici3n productiva*: Los peces deben poseer 3ptima 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 piscirickettsiosis, flavobacteriosis, renibacteriosis, necrosis pancre3tica infecciosa y anemia infecciosa del salm3n. Las muestras de tejido se enviar3n al laboratorio diagn3stico para an3lisis utilizando t3cnicas de PCR, cultivo bacteriol3gico, cultivo celular o IFAT, seg3n corresponda.

3.2. Condiciones ambientales.

La prueba de seguridad se realizar3 en agua dulce. Los par3metros de la tabla 1 se deber3n medir y mantener diariamente, en concordancia con est3ndares aceptables para el correcto bienestar de los peces (RSPCA, 2010; European Food Safety Authority, 2008):

Tabla 1. Par3metros ambientales durante la prueba

Par3metro	Unidad	Valor	Observaci3n
Densidad	kg/m ³	25	Densidad final m3xima
Temperatura	°C	12	Rango de 10 – 14 (Hueihue)
Ox3geno disuelto	mg/l	8	M3nimo 5, m3ximo 12
Tasa recambio	l/kg pez/min	0,8	Como m3nimo



3.3. Grupos experimentales

Los peces ingresar3n al centro experimental y se destinar3n directamente a los estanques experimentales. Cada estanque experimental tendr3 30 peces. El n3mero de peces se basa en antecedentes cient3ficos y t3cnicos respetando las referencias internacionales (Alderman, 2009; European Parliament and Council, 2001; Commission of the European Communities, 2011) y considerando el concepto de las 3R (Reducci3n, Reemplazo, Refinamiento) y bienestar animal (Midtlyng et al. 2011). Los peces se mantendr3n en aclimataci3n en agua dulce durante 14 d3as. Cumplido el periodo de aclimataci3n, los peces ser3n puestos en ayuno por 24 horas y se designar3n los siguientes grupos experimentales:

Tratamiento/Vacunados: Se vacunar3n los 30 peces del estanque designado al dobles de la dosis recomendada y siguiendo las recomendaciones de aplicaci3n de la vacuna del fabricante.

De forma general, y especialmente en caso de no existir una recomendaci3n de aplicaci3n por el fabricante se seguir3 el siguiente procedimiento de vacunaci3n:

Los peces ser3n extra3dos desde el estanque y puestos en un estanque con una soluci3n anest3sica. La soluci3n anest3sica consistir3 en 15 ml de benzoca3na l3quida, disuelta en 100 L de agua. Una vez que los peces hayan alcanzado el plano anest3sico III (L. G. Ross & B. Ross 2008), se tomar3n individualmente y se sostendr3n con la cara ventral hacia arriba y con la cabeza dirigida lejos del cuerpo del operador. El tama3o de la aguja deber3 ser la apropiada para el tama3o de los peces. La aguja se insertar3 lentamente en un 3ngulo de aproximadamente 45° en la l3nea media ventral entre las aletas pectorales y las p3lvicas. Se inyectar3 intraperitonealmente una dosis doble a la recomendada por el fabricante. El pez ser3 transferido al estanque original.



Control/No vacunados: Se realizará una falsa vacunación a los 30 peces del estanque utilizando solución salina estéril Hank's al mismo volumen que el aplicado en los peces vacunados. Se realizará el mismo procedimiento de inoculación que el realizado a los peces vacunados. Los peces serán devueltos al respectivo estanque de mantención.

Cada grupo experimental se evaluará en duplicado. La prueba de seguridad tendrá una duración de 21 días luego de la vacunación.

Un cronograma de actividades se describe en el punto 7 de este protocolo.

3.5. Alimentación.

Los peces serán alimentados a saciedad en dos tomas al día utilizando alimento comercial sin aditivos, inmunoestimulantes o colorantes suministrados. Como se señaló previamente, la alimentación se suspenderá 24 horas antes de la vacunación (día 12) para ser restituida al día siguiente de la vacunación (día 16). La cantidad de alimento suministrado se ajustará una vez por semana de acuerdo al crecimiento esperado de los peces.

3.6. Parámetros de evaluación de seguridad

Mortalidad: Se chequeará, registrará y retirará la mortalidad en todos los grupos experimentales en la mañana y en la tarde. La mortalidad será enviada al laboratorio de diagnóstico para descartar causas infecto-contagiosas.

Lesiones: Al final de la prueba de seguridad (día 35) se realizará la eutanasia de todos los peces utilizando una sobredosis anestésica (benzocaína clorhidrato > 250 mg/l). Se realizará la necropsia y registrará el grado de adherencias y melanosis.

La clasificación y cuantificación de las adherencias se realizará de acuerdo a la escala de Speilberg que se detalla en la tabla 2:



Tabla 2. Escala de Speilberg para la clasificación y cuantificación de adherencias.

Escala	Apariencia visual de la cavidad abdominal	Severidad de la lesión
0	Sin lesiones macroscópicas visibles	Sin lesiones
1	Adherencias muy débiles, frecuentemente localizadas en el sitio de la inyección	Nada o poca opacidad del peritoneo
2	Pocas adherencias, las que pueden conectar colon, bazo o parte de ciegos.	A veces, opacidad del peritoneo
3	Adherencias moderadas, incluyendo partes más craneales de la cavidad abdominal.	Lesiones visibles menores post evisceración.
4	Lesiones mayores, con granulomas, conectando con órganos internos.	Lesiones moderadas
5	Lesiones severas afectando casi todos los órganos internos cercanos en la cavidad abdominal. Grandes áreas del peritoneo se presentan engrosadas y opacas.	Deja daños visibles en la canal, post-evisceración y remoción de lesiones.
6	Severidad mayor que categoría 5, con considerable cantidad de melatonina. Vísceras no pueden desprenderse sin causar daño a musculatura.	Daño mayor de la canal

La clasificación y cuantificación de melanosis encontradas se realizará siguiendo la escala descrita en la tabla 3.



Tabla 3. Escala del nivel de pigmentaci3n (Melanosis)

Grado	Apariencia visual de la cavidad abdominal	Severidad de la lesi3n
0	Ausente	Sin pigmentaci3n visible
1	Moderado	Presencia de regiones de melanina visible menores despu3s de la evisceraci3n f3cilmente removibles manualmente.
2	Severo	Daño visible en las carcasas despu3s de la evisceraci3n, dif3cil o imposible de remover sin causar daño al tejido muscular.

3.7. Interpretaci3n de los resultados de la prueba de seguridad

La vacuna se considerar3 segura si reune todas las condiciones señaladas en la siguiente tabla de interpretaci3n de resultados (tabla 4).

La vacuna se considerar3 sospechosa, si la mortalidad en los grupos vacunados excede el 6%, por lo cual la prueba deber3 repetirse.

La vacuna se considerar3 no segura si la mortalidad excede el 6% en la segunda prueba. La vacuna se considerar3 inmediatamente no segura s3 las los peces vacunados presentan, en promedio, adherencias o melanosis superiores a 3 o 1, respectivamente.

Adicionalmente la prueba quedar3 nula, y deber3 repetirse, si la mortalidad de los peces vacunados es mayor a la de los peces no vacunados, o si la mortalidad de los peces no vacunados es superior al 6%.



Tabla 4. Interpretaci3n de la prueba de seguridad.

Interpretaci3n		Porcentaje de mortalidad (N3mero de peces)	Adherencias (promedio)	Melanosis (promedio)
Vacuna segura	Satisfactoria	0% (0)	≤ 3	≤ 1
	Aceptable	1-6% (1 3 2)	≤ 3	≤ 1
Vacuna sospechosa		> 6% (3 3 m3s peces). La prueba debe repetirse		
Vacuna no segura		> 6% (3 3 m3s peces) por segunda vez	4, 5 o 6	2
Prueba Nula		a) Mortalidad mayor en vacunados que no vacunados. b) Mortalidad no vacunados > 6%		

4. T3rmino anticipado de las pruebas

Se pondr3 fin a las pruebas en cualquier momento en caso de que exista muerte de m3s del 50% 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

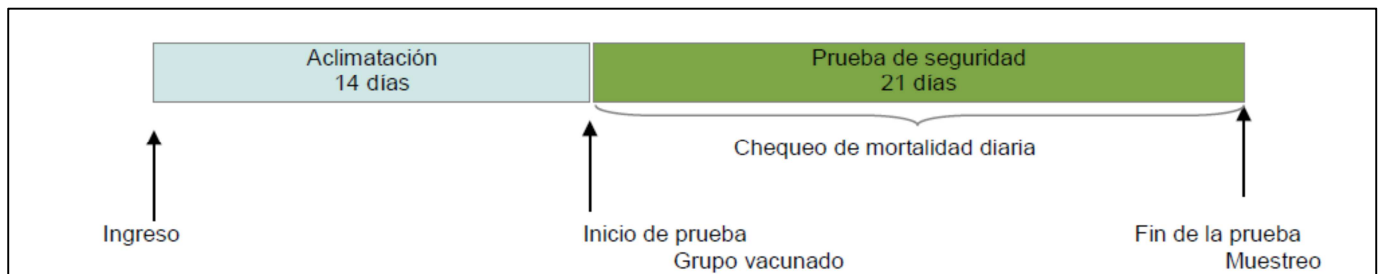
Se deber3 entregar un informe cient3fico y t3cnico con los resultados, an3lisis, discusi3n y conclusi3n obtenido de las pruebas de seguridad dentro de un plazo de 15 d3as finalizada la prueba.

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. Diagrama de actividades





8. Referencias

- Alderman, D., 2009. Control of the use of veterinary drugs and vaccines in aquaculture in the european Union. *Options Mediterraneennes*, 86, pp.13-27.
- Commission of the European Communities, C., 2011. Specific requirements for the production and control of live and inactivated vaccines intended for fish. In *The Rules Governing Medicinal Products in the European Union*. pp. 91-97.
- European Food Safety Authority, 2008. Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed Atlantic salmon. *The EFSA Journal*, 736, pp.1-31.
- European Parliament and Council, E., 2001. Directive 2001/82/EC of The European Parliament and of the Council on the Community Code relating to veterinary medicinal products. *Official Journal of the European Communities*, L311, pp.1-66.
- Midtlyng, P.J. et al., 2011. Three Rs Approaches in the Production and Quality Control of Fish Vaccines. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, 39(2), pp.117-28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21371907> [Accessed February 15, 2012].
- RSPCA, 2010. RSPCA welfare standards for farmed Atlantic salmon.
- Ross, L.G. & Ross, B., 2008. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals* Third Edit., Blackwell Science Ltd.
- Roth, J.A., 2011. Veterinary Vaccines and Their Importance to Animal Health and Public Health. *Procedia in Vaccinology*, 5, pp.127-136. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.provac.2011.10.009> [Accessed February 15, 2012].