



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

(v.3.1/Julio 2016)

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



1. Introducci3n

La tendencia mundial en el 1rea de salud de especies acu1ticas de cultivo ha sido reducir el uso de agentes quimioterap1uticos e incrementar el uso de vacunas como herramientas profil1cticas. Para lograr dicho objetivo es necesario disponer del conocimiento cient1fico-t1cnico que respalde la implementaci3n y uso de estas vacunas en la industria chilena y as1 alcanzar de forma efectiva una buena seguridad y eficacia hacia los peces tratados (Roth, 2011).

Es importante se1alar que existen normas internacionales respecto de las metodolog1as y protocolos a utilizar en las pruebas de eficacia de vacunas en peces de cultivo para su registro y comercializaci3n (Commission of the European Communities, 2011; European Parliament and Council, 2001).

A su vez, existe evidencia cient1fica de protocolos de desaf1o para la evaluaci3n de vacunas contra la Piscirickettsiosis en peces, tanto desaf1os intraperitoneal como de desaf1os por cohabitaci3n. La elecci3n de ocupar una u otra forma de desaf1o est1 en directa relaci3n en la diseminaci3n del pat3geno dentro de la poblaci3n de peces (Commission of the European Communities, 2011).

Para el caso espec1fico de *P. salmonis*, los desaf1os por cohabitaci3n entregan una representaci3n m1s real del curso normal de la enfermedad (Almendras, Fuentealba, Jones, Markham, & Spangler, 1997; Mauel & Miller, 2002; Smith et al., 2004).

Sin embargo, es importante se1alar las limitaciones para ambos tipos de desaf1os. En los desaf1os por cohabitaci3n las limitaciones est1n relacionadas a una duraci3n m1s larga de las pruebas (45 o m1s d1as desde el inicio del desaf1o), no se asegura que todos y cada uno de los peces haya estado efectivamente en contacto con el pat3geno y, se genera un problema de validez metodol3gica al existir un segundo desaf1o por cohabitaci3n en la medida que los peces control, o no vacunados, empiezan a morir (Alderman, 2009).

Por otro lado, el desaf1o a trav1s de inyecci3n intraperitoneal asegura que todos los peces hayan estado en contacto con el pat3geno, se obtiene una adecuada curva de mortalidad en los peces control, y las pruebas son m1s cortas (21 a 30 d1as). La gran limitaci3n es que no representa la v1a normal de infecci3n de la *P. salmonis*.



Independiente de lo anterior, todas las pruebas de eficacia se basan en la cuantificaci3n del efecto que tiene un desaf3o con un pat3geno sobre la mortalidad en peces vacunados en comparaci3n con peces no vacunados.

2. Objetivo general

Determinar la eficacia de vacunas desarrolladas para el control del pat3geno *P.salmonis*, en salm3n del Atl3ntico (*S. salar*).

Nota importante: Este protocolo solo aplica a vacunas inyectables y que no aplica para las vacunas cuya v3a de administraci3n sea inmersi3n (Registro Provisional SAG N° 2225-BP).

3. Dise3o experimental

3.1. Peces

La prueba de eficacia utilizar3 alevines de salm3n del Atl3ntico (*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 las utilizadas en la industria.
- *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 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 eficacia se realizar3 en agua dulce, agua estuarina y de mar. 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. Par3metros ambientales durante la prueba

Par3metro	Unidad	Valor	Observaci3n
Densidad	kg/m ³	15	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. Metodolog3a de la prueba de eficacia

3.3.1. Vacunaci3n, vacunaci3n falsa y mantenci3n de peces previo al desaf3o

Los peces ingresar3n al centro experimental y se distribuir3n en 2 estanques de mantenci3n. 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 realizar3 la vacunaci3n y falsa vacunaci3n obteni3ndose los siguientes grupos experimentales:

Tratamiento/Vacunados: Se vacunar3n la totalidad de los peces de un estanque de mantenci3n con la dosis recomendada y siguiendo las recomendaciones de aplicaci3n de la vacuna del fabricante. Los peces vacunados ser3n identificados a trav3s de marcaje de acuerdo a una codificaci3n a definir. Posteriormente, los peces ser3n devueltos a su estanque de mantenci3n, denominado vacunados.

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 adicionada en 100 L de agua. Una vez que los peces hayan alcanzado el plano anest3sico III (L. G. Ross & 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 la dosis de vacuna recomendada por el fabricante. El pez ser3 transferido al estanque original.

Control/No vacunados:

Se realizar3 una falsa vacunaci3n a la totalidad de los peces del otro estanque de mantenci3n utilizando soluci3n salina est3ril Hank's al mismo volumen que el aplicado en los peces vacunados. Se realizar3 el mismo procedimiento de inoculaci3n que el realizado a los peces vacunados sin realizar el marcaje de aleta. Los peces ser3n devueltos al estanque de mantenci3n denominado no vacunado.



3.3.2. Desarrollo de inmunidad, esmoltificaci3n y tiempos de desaf3o

Los peces permanecer3n en los estanques de mantenci3n hasta que se genere inmunidad espec3fica a la vacuna en peces vacunados, que los peces esmoltifiquen y el momento del desaf3o.

A su vez, con el fin de fomentar la smoltificaci3n de los peces, se deber3 incorporar gradualmente agua de mar a los estanques de mantenci3n para que a las 650 UTA (aproximadamente 54 d3as) los peces est3n totalmente acondicionados a agua de mar. La smoltificaci3n se verificar3 a trav3s de prueba de ATPasa los d3as 29, 39 y 49 post-vacunaci3n a 3 peces por estanque de mantenci3n.

Con el fin de evaluar la duraci3n y calidad de la inmunidad entregada por la vacuna, se han definido, inicialmente, tres tiempos de desaf3o:

- 650 UTA (aproximadamente 54 d3as a 12°C) desde la vacunaci3n.
- 1000 UTA (aproximadamente 83 d3as a 12°C) desde la vacunaci3n
- 2500 UTA (aproximadamente 208 d3as a 12°C) desde la vacunaci3n.

Cada una de estas pruebas se realizar3 independiente entre ellas, es decir, distintos peces cada vez, pero todos provenientes de los mismos estanques de mantenci3n.

Al respecto, y dependiendo tanto de los resultados parciales obtenidos, como de la factibilidad operacional, se determinar3n eventuales modificaciones respecto de la definici3n de los tiempos de desaf3o.

3.3.3. Desaf3o por cohabitaci3n

Se realizar3 el desaf3o por cohabitaci3n para evaluar la eficacia de la vacuna una vez alcanzados los tiempos de espera (650, 1000 y 2500 UTA). El desaf3o por cohabitaci3n ser3 en duplicado (dos estanques de desaf3o por cohabitaci3n).

Treinta (30) peces del estanque de mantenci3n vacunados y treinta (30) peces del estanque de mantenci3n no vacunados ser3n trasladados a cada estanque de desaf3o. Al mismo tiempo, se



agregar3n 30 peces troyanos a cada estanque de desaf3o. El n3mero de peces se basa en antecedentes cient3ficos y t3cnicos, respetando la legislaci3n actual (Alderman, 2009; Commission of the European Communities, 2011; European Parliament and Council, 2001) y considerando el concepto de las 3R (Reducci3n, Reemplazo, Refinamiento) y bienestar animal (Midtlyng et al., 2011).

Los peces troyanos corresponden a peces no vacunados e inoculados con una cepa de *P. salmonis*.

La cepa a utilizar debe tener una virulencia verificada por al menos 2 pasajes in vivo. La cepa corresponder3 a un aislado de campo, y ser3 entregada por el laboratorio de referencia respectivo. Se deber3 indicar sus caracter3sticas y protocolos de manejo en relaci3n a l3neas celulares de crecimiento, TCID₅₀ y DL₅₀.

El volumen a inocular en los peces troyanos ser3 de 0,2 ml por v3a intraperitoneal, y tendr3 la concentraci3n determinada del estudio de Dosis Letal calculada precedente.

De forma general, los peces a utilizar como troyanos ser3n extra3dos desde el estanque de mantenci3n no vacunados, y trasladados a 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 & Ross, 2008), se tomar3n individualmente y se sostendr3n con la cara ventral hacia arriba y la cabeza dirigida lejos del cuerpo del operador. El tama3o de la aguja deber3 ser la apropiada para el tama3o de los peces. El punto de inyecci3n ser3 en la l3nea media ventral a una distancia entre ½ y 1 longitud de aleta pectorales, posterior a la base de esta aleta. La aguja se insertar3 lentamente en un 3ngulo de lo m3s cercano a 45° en la l3nea media ventral entre las aletas pectorales y las p3lvicas, y el inoculo se inyectar3 intraperitonealmente. Adicionalmente, se identificar3n los peces troyanos a trav3s de clipping (marcaje) en la aleta dorsal, y luego trasladados directamente al estanque de desaf3o por cohabitaci3n.

La duraci3n del desaf3o por cohabitaci3n ser3 de 45 d3as o hasta alcanzar el 60% de mortalidad en peces no vacunados.

Al t3rmino del desaf3o, los peces vivos restantes ser3n eutanasiados con una sobredosis de anestesia (> 250 mg/l de benzoca3na clorhidrato) y se enviar3n muestras para laboratorio diagn3stico para la evaluaci3n de presencia o ausencia de alg3n pat3geno.



3.5. Alimentaci3n

Los peces ser3n alimentados a saciedad en dos tomas al d3a utilizando alimento comercial sin aditivos, inmunoestimulantes o colorantes suministrado usando alimentadores autom3ticos. Como se se3al3 previamente, la alimentaci3n se suspender3 24 horas antes la vacunaci3n para ser restituida al d3a siguiente de la vacunaci3n. Situaci3n similar ocurrir3 previo al inicio del desaf3o por cohabitaci3n. La cantidad de alimento suministrado se ajustar3 una vez por semana de acuerdo al crecimiento esperado de los peces.

3.6. Par3metros a evaluar en la prueba de eficacia

Mortalidad: Se chequear3, registrar3 y retirar3 la mortalidad en todos los grupos experimentales en la ma3ana y en la tarde. Se identificar3 cada pez muerto de acuerdo al marcaje realizado como no vacunado, vacunado o troyano. Todo pez muerto ser3 enviado al laboratorio de diagn3stico para confirmaci3n del agente causal.

3.7. Interpretaci3n de los resultados de la prueba de eficacia

Con los resultados de mortalidad durante el desaf3o por cohabitaci3n se calcular3 el porcentaje relativo de sobrevivencia (RPS). Esta ampliamente aceptada la utilizaci3n del RPS60, calculado como una relaci3n entre la mortalidad acumulada de los peces vacunados en el momento que la mortalidad acumulada de los peces no vacunados alcanza el 60%. Se expresa de acuerdo a la siguiente formula:

$$RPS60 = 1 - (\% \text{ mortalidad peces vacunados} / 60 \% \text{ mortalidad peces no vacunados}) \times 100.$$

La vacuna se considerar3 eficaz si el RPS60 es igual o mayor a 65%.

Adicionalmente, se tiene contemplado hacer el c3lculo de porcentaje relativo de sobrevivencia (RPS) punto final (end point).



3.8. Otros variables a evaluar

3.8.1. Variables asociadas a producci3n

Se medir3 longitud y peso h3medo a los 7 d3as post-ingreso al centro de experimentaci3n sobre el 10% de los peces y se calcular3 el factor de condici3n inicial (K).

Los peces ser3n extra3dos desde el estanque de mantenci3n y trasladados a 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, se tomar3n individualmente y se medir3 su largo con un pie de metro y el peso con una balanza calibrada. Posteriormente, el pez ser3 trasladado a un estanque de recuperaci3n anest3sica bien oxigenado, y luego ser3n trasladados y reincorporados al estanque original.

Posteriormente, en los d3as 25, 35 y 45 (post-vacunaci3n), se medir3 nuevamente longitud y peso y se calcular3n la tasa espec3fica de crecimiento (SGR), tasa de crecimiento t3rmico (GF3) y tasa de Conversi3n de Alimento (FCR). Este proceso se efectuar3 en al menos en el 10% de los peces.

El muestreo de peso y longitud final se har3 el d3a 127 a la totalidad de los peces y se calcular3n las variables productivas anteriormente mencionadas.

4. T3rmino del experimento

Se pondr3 fin a las pruebas en cualquier momento en caso de que ocurra alguna de las siguientes condiciones:

- Muerte de m3s del 10% de los peces en 1 d3a.
- Muerte de m3s del 50% de los peces en desaf3o de cohabitaci3n en un d3a.
- Valores de K, GF3 y FCR desviados m3s de un 10% respecto del valor esperado en cada



punto de muestreo.

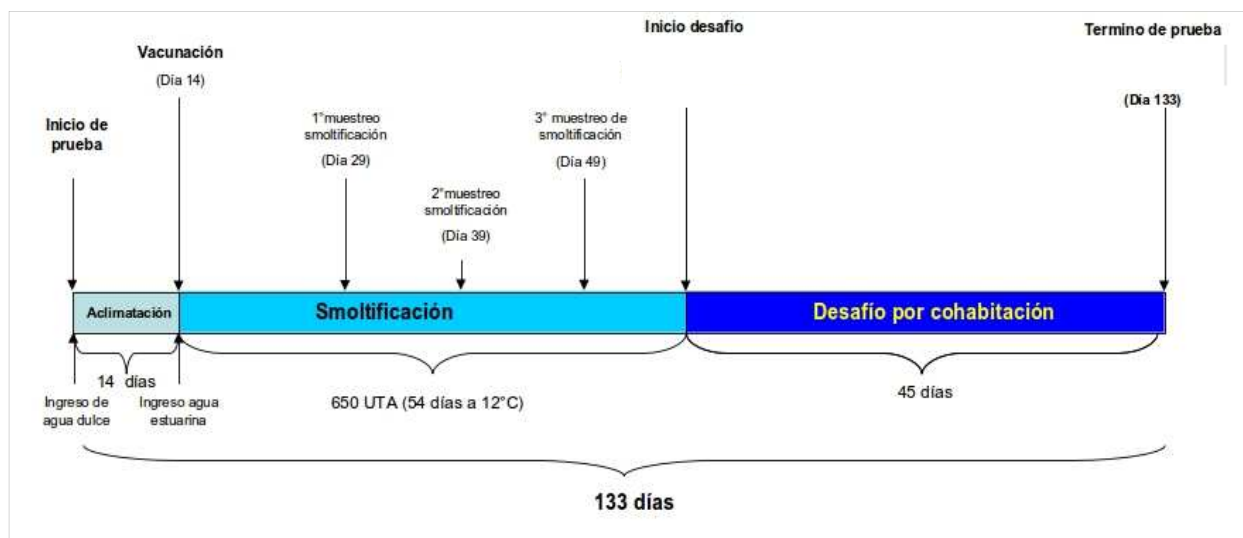
- Diferencias de m1s de 10% en variables asociadas a la producci3n como K, SGR, GF3 o FCR entre y dentro de los grupos experimentales.

Esta finalizaci3n temprana se realizar1 mediante el traslado de los peces a estanques que contengan una sobredosis de anest1sico (> 250 mg/l de benzoca3na clorhidrato). Se muestrear1n peces para an1lisis de pat3genos u otra presunta causa.

Adicionalmente, al finalizar las pruebas, los peces se sacrificar1n utilizando una sobredosis de anestesia previamente descrito.

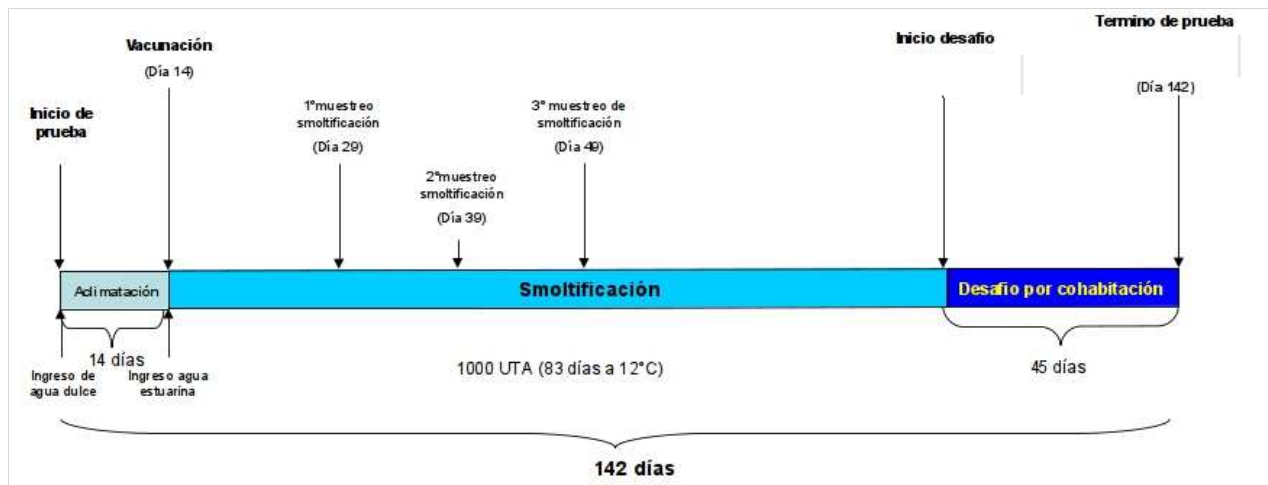
5. Cronograma de actividades

Prueba de eficacia con desaf3o por cohabitaci3n a las 650 UTAs

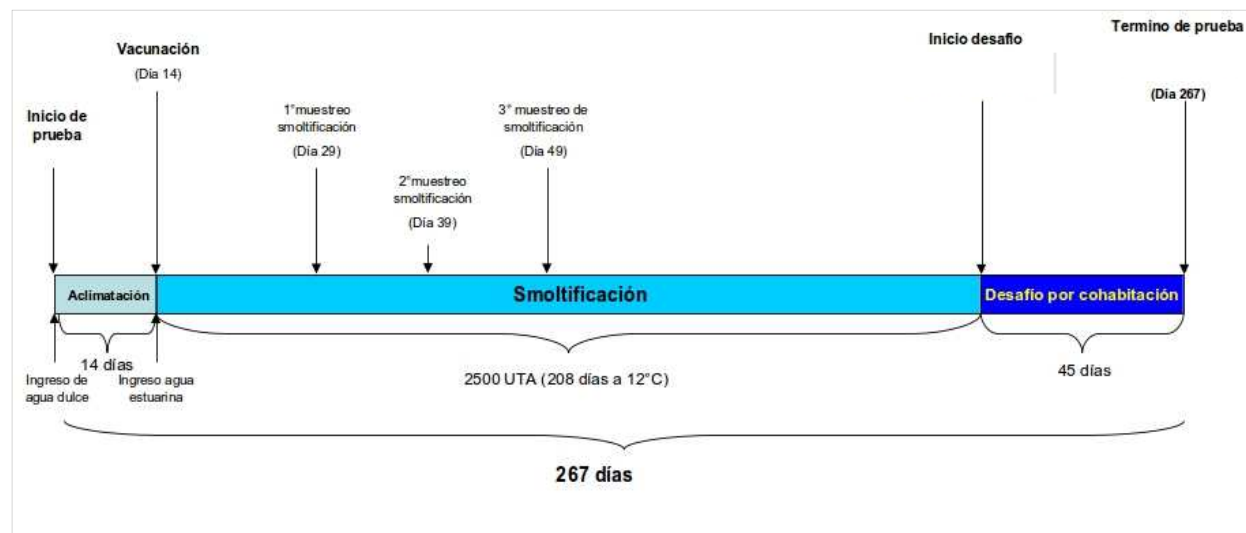




Prueba de eficacia con desafío por cohabitaci3n a las 1000 UTAs



Prueba de eficacia con desafío por cohabitaci3n a las 2500 UTAs





6. Informe de resultados

Se deberá entregar un informe científico y técnico con los resultados, análisis y conclusiones obtenidos de las pruebas de eficacia.

7. Registros

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

8. Referencias

- Alderman, D. (2009). Control of the use of veterinary drugs and vaccines in aquaculture in the European Union. *Options Méditerranéennes*, 86, 13-27.
- Almendras, F. E., Fuentealba, I. C., Jones, S. R. M., Markham, F., & Spangler, E. (1997). Experimental infection and horizontal transmission of *Piscirickettsia salmonis* in freshwater-raised Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 20(6), 409-418. doi:10.1046/j.1365-2761.1997.00315.x
- 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* (pp. 91-97).
- European Food Safety Authority. (2008). Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed Atlantic salmon. *The EFSA Journal*, 736, 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, 1-66.
- Mauel, M. J., & Miller, D. L. (2002). *Piscirickettsiosis* and *piscirickettsiosis*-like infections in fish: a review. *Veterinary microbiology*, 87(4), 279-89. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12069766>
- Midtlyng, P. J., Hendriksen, C., Balks, E., Bruckner, L., Elksen, L., Evensen, O., Fyrand, K., 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), 117-28.



doi:10.1016/j.biologicals.2011.02.001

- RSPCA. (2010). RSPCA welfare standards for farmed Atlantic salmon. Royal Society for the Protection and Cruelty of Animals.
- Ross, L. G., & Ross, B. (2008). *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals* (Third Edit., p. 221). Blackwell Science Ltd.
- Roth, J. A. (2011). Veterinary Vaccines and Their Importance to Animal Health and Public Health. *Procedia in Vaccinology*, 5, 127-136. doi:10.1016/j.provac.2011.10.009
- Smith, P. A., Rojas, M. E., Guajardo, A., Contreras, J., Morales, M. A., & Larenas, J. (2004). Experimental infection of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* by exposure of skin, gills and intestine with *Piscirickettsia salmonis*. *Dis Aquat Organ*, 61, 53-57.
- Ross, L. G., & Ross, B. (2008). *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals* (Third Edit., p. 221). Blackwell Science Ltd.