



INFORME FINAL

Convenio de Desempeño 2015:
Monitoreo de la eficacia y seguridad de productos biológicos
utilizados en la salmonicultura

SUBSECRETARÍA DE ECONOMÍA Y EMT / Noviembre 2016

INFORME FINAL

Convenio de Desempeño 2015:
Monitoreo de la eficacia y seguridad de productos
biológicos utilizados en la salmonicultura

SUBSECRETARÍA DE ECONOMÍA Y EMT / Noviembre 2016

REQUIRENTE

**SUBSECRETARÍA DE ECONOMÍA Y
EMPRESAS DE MENOR TAMAÑO**

Subsecretario de Economía y
Empresas de Menor Tamaño
Natalia Piergentili Domenech

EJECUTOR

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO, IFOP

Director Ejecutivo
Leonardo Núñez Montaner

Jefe División Investigación en Acuicultura
F. Leonardo Guzmán Méndez

JEFE PROYECTO

Sergio Contreras Lynch

AUTORES

Sergio Contreras Lynch
Juan Pablo García

COLABORADORES

Claudia Spinetto Castro
Loreto Ovalle Merino
Mylene Menanteau Mancilla



RESUMEN EJECUTIVO

La expansión de la industria salmoniculora chilena significó un aumento de los niveles productivos predisponiendo a condiciones favorables para un aumento de las enfermedades infecciosas en los organismos cultivados.

En todas las producciones animales, incluidos los peces de cultivo, ha existido la tendencia mundial a aumentar el uso de medidas preventivas como las vacunas y otros productos biológicos/inmunológicos, situación que requiere de una revisión de las estrategias productivas de parte del sector industrial y la generación de nuevas regulaciones por parte del Estado de Chile, respaldadas científicamente.

La presente iniciativa tuvo como objetivo desarrollar y ejecutar los protocolos óptimos de evaluación de seguridad y eficacia de productos biológicos utilizados en salmonicultura priorizados por la autoridad, con la finalidad de levantar información técnica para la toma de decisiones sectoriales.

A través de la ejecución del presente estudio se desarrollaron protocolos para la determinación de la dosis letal 50 (DL50) y la evaluación de seguridad y eficacia de vacunas contra el agente patógeno *Piscirickettsia salmonis*, para posteriormente aplicarlos en evaluaciones de productos comerciales autorizados para uso en acuicultura en Chile, previa priorización de éstos con el mandante.

Posteriormente se efectuaron pruebas con el inóculo bacteriano obtenido desde el laboratorio de referencia del patógeno, para verificar su potencia infectiva y curvas de mortalidad a diferentes dosis, para finalmente llevar a cabo las pruebas de seguridad y eficacia de vacunas destinadas al control de brotes de la Piscirickettsiosis mediante el modelo de cohabitación, con desafíos a diferentes unidades térmicas acumuladas (UTAs).

Finalmente se hace un análisis de los resultados obtenidos y se efectúan conclusiones generales y específicas relevantes, considerando los escasos antecedentes internacionales existentes para este tipo de estudios.

Con la ejecución de este programa, se ponen a disposición a la Autoridad los resultados del proceso de evaluación, información relevante y con fundamento científico que permitirá evaluar las ventajas y desventajas de la incorporación de la aplicación de vacunaciones en planes y programas sanitarios oficiales.

El presente documento, da cuenta de las actividades efectuadas y resultados obtenidos durante la ejecución del presente programa de investigación.



ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN EJECUTIVO.....	i
ÍNDICE GENERAL	ii
ÍNDICE DE ANEXOS	iii
1. ANTECEDENTES	1
2. OBJETIVO GENERAL	5
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
4. METODOLOGÍA	6
4.1 Levantamiento de informaci3n bibliográfica y de antecedentes técnicos	6
4.2 Análisis de la informaci3n y generaci3n de los protocolos de acuerdo a los productos a someter a evaluaci3n.....	8
4.3. Ejecuci3n de los estudios de determinaci3n de la dosis letal 50 (DL50) y evaluaci3n de seguridad y eficacia de productos biológicos bajo condiciones controladas.....	17
5. RESULTADOS	26
5.1. Levantamiento de informaci3n bibliográfica y de antecedentes técnicos	26
5.2. Análisis de la informaci3n y generaci3n de los protocolos de acuerdo a los productos a someter a evaluaci3n.	33
5.3. Ejecuci3n de los protocolos óptimos de evaluaci3n de seguridad y eficacia de los productos biológicos.....	49
6. DISCUSI3N.....	60
7. CONCLUSIONES	62
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	



ÍNDICE ANEXOS

- Anexo 1.** Normativas nacionales revisadas.
- Anexo 2.** Referencias bibliográficas y normativas internacionales revisadas.
- Anexo 3.** Protocolo de determinación de la Dosis Letal 50 (DL50) del inóculo de *P. salmonis*
- Anexo 4.** Protocolo de evaluación de seguridad de vacunas contra *P. salmonis*
- Anexo 5.** Protocolo de evaluación de eficacia de vacunas contra *P. salmonis*



1. ANTECEDENTES

La industria salmonicultora chilena es relativamente reciente, siendo el año 1991 cuando por primera vez la producción nacional supera las 10.000 toneladas. Para el año 2005, Chile ya era el país de más rápido crecimiento como productor de salmón en el mundo, después de haber superado a Escocia en el año 2000 como el segundo mayor productor de salmón del Atlántico, y estaba en camino a superar a Noruega como el líder mundial.

Este rápido desarrollo, se tradujo en un notable clúster de centros de cultivo de mar, en las áreas alrededor de las regiones de Los Lagos y Aysén, llegando al año 2007 con una producción total de salmónidos de cultivo de casi 450.000 toneladas.

En la actualidad, la industria salmonicultora chilena se ha consolidado como uno de los pilares de la economía chilena exportadora, alcanzado en el año 2015, cosechas por 839.300 toneladas, y retornos por US\$3.526 millones, considerando las tres especies de salmónidos cultivadas, siendo el impulsor del desarrollo económico y social de las regiones donde se desarrolla (Subpesca, 2016).

Junto con aumentar los niveles productivos, se vio incrementada la incidencia de enfermedades infecto-contagiosas, fenómeno que se asocia de manera general a los siguientes factores que se presentaban en la industria: Altas concentraciones de sitios de cultivo en algunas áreas, especialmente en la Región de Los Lagos y el centro de Chiloé; ausencia de programas de manejo zonales; pobre control sanitario en la cadena productiva, incluidas insuficientes regulaciones en la importación de ovas con inexistencia de periodos de cuarentena y la falta de procedimientos de desinfección; insuficientes medidas de bioseguridad, incluyendo el control de movimiento de los peces entre centros de cultivo; y un insuficiente control y falta de regulaciones gubernamentales integrales (World Bank, 2014).

Entre otras medidas prioritarias a ser adoptadas en esta nueva etapa del sector, se encuentra un mejor control de las enfermedades prevalentes en la producción de salmónidos de cultivo, a través del uso de herramientas profilácticas efectivas y atractivas en su factor de costo/beneficio, disminuyendo consecuentemente, el uso de antimicrobianos, que al año 2015, representó un 0,066% sobre el total de toneladas cosechadas de salmónidos (Sernapesca, 2016).

La prevención de enfermedades debería estar basada en medidas que incluyan tres factores interactuando entre sí, como son el agente patógeno, el hospedero y el ambiente. Algunos factores ambientales pueden ser controlados, pero otros, como la temperatura del agua, no pueden ser manejados. En consecuencia, la resistencia del pez, basado en su inmunidad natural o adquirida, es un factor crucial para la salud del pez de cultivo (Gudding & Van Muiswinkel, 2013).

Durante la corta historia de la acuicultura moderna, es aceptado que la prevención de enfermedades basada en la estimulación del sistema inmune se ha convertido en una parte integrada del manejo operacional de la acuicultura. En la historia de la vacunación de peces, se constatan éxitos como fracasos, no obstante, debido a los esfuerzos científicos y la rápida transferencia del progreso



científico a la práctica productiva, la vacunación se ha convertido en una parte importante del desarrollo de la industria acuicultora mundial (Gudding & Van Muiswinkel, 2013).

Si bien a lo largo de su desarrollo, la industria ha utilizado en mayor o menor medida, herramientas profilácticas como mecanismo de control de enfermedades, su uso masivo y reconocimiento transversal respecto de su eficacia, es un tema pendiente. Este hecho cobró mayor relevancia, luego de la aparición de un nuevo agente infeccioso, como lo representó el virus de la Anemia Infecciosa del Salmón, ISAv, en 2007.

Por su parte, en el sector productivo como en el estamento regulatorio del Estado, el principal requerimiento de información de respaldo científico-técnico es la evaluación del real impacto que tendría la incorporación de planes de vacunación obligatorios en el ciclo productivo.

Entre los muchos cambios derivados de la crisis sanitaria de la industria en 2007, se encuentran las adaptaciones y nuevas exigencias normativas, incluidos principalmente en el Reglamento Sanitario para la Acuicultura, RESA, el que en el respectivo Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de la Anemia Infecciosa del Salmón, indica explícitamente en su punto 10.9 Vacunación, del Artículo Primero:

“Se establecerá en un plazo máximo de 3 meses la vacunación obligatoria para el Salmón del Atlántico, cumpliendo el protocolo o las especificaciones técnicas establecidas por el o los laboratorios fabricantes. La aplicabilidad de tal medida estará sujeta al resultado de los estudios a que se hace referencia en el numeral siguiente”.

“Las vacunas a utilizar deberán contar con un estudio para evaluar su eficacia, según los protocolos que el Servicio establezca. Si alguna de las empresas fabricantes de vacunas no cumple con este requisito, la misma no formará parte del presente programa”.

Si bien el control del virus ISA sigue siendo una materia fundamental dentro de las prioridades de los estamentos sectoriales como el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (Sernapesca), y la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (Subpesca), la situación sanitaria de la industria tiene en la actualidad como protagonista al agente bacteriano *Piscirickettsia salmonis*, causante de la Piscirickettsiosis en especies salmonídeas de cultivo, como el principal causante de mortalidad y pérdidas económicas en la industria.

Las causas infecciosas representaron en el año 2015, el 25,6% de las mortalidades para la especie *S. salar* en centros marinos, siendo la Piscirickettsiosis, la principal enfermedad identificada como causal, con un 78,9% de las mortalidades de este tipo para la especie (Sernapesca, 2016).

Por su parte, para la especie *O. mykiss*, señala que el 23,8% de las mortalidades corresponden a causa infecciosa (secundaria), siendo Piscirickettsiosis la que presenta el 82,9% de esta mortalidad. Finalmente, para la especie *O. kisutch*, las causales infecciosas de mortalidad fueron solo del 16,9%, siendo *P. salmonis* el agente causal identificado en un 59,3% (Sernapesca, 2016).



Asimismo, y derivado de lo anterior, las medidas de control se basan en el uso de agentes antimicrobianos, cuyo uso mayoritario en el año 2015, corresponde a tratamientos contra la bacteria *P. salmonis* en un 94%, respecto del total del volumen de antimicrobianos utilizados en tratamientos contra agentes bacterianos en la industria, para centros de mar. De este porcentaje, florfenicol y oxitetraciclina fueron utilizados como tratamiento en un 87% y 12%, respectivamente (Sernapesca, 2016).

Esta situación llevó al Sernapesca a la generación de un Programa Específico de Vigilancia y Control de la Piscirickettsiosis, vigente desde enero de 2013, y que busca disminuir el impacto de la enfermedad, a través de su detección temprana y seguimiento de los casos, aplicando medidas de control oportunas y graduales (Sernapesca, 2012).

Considerando estos antecedentes, y tomando en cuenta que la tendencia mundial en producción animal ha sido reducir el uso de antibióticos y agentes quimioterapéuticos, privilegiando el uso de sistemas preventivos, como vacunas y otros productos biológicos, es prioritaria la evaluación de estas alternativas para el control de la Piscirickettsiosis, aproximación que a su vez, exige un cambio en las estrategias productivas de parte del sector industrial.

Considerando lo anteriormente expuesto, es vital disponer del conocimiento y respaldo científico que permita la implementación de dichas estrategias profilácticas por sobre las reactivas, y que entreguen una validación de las características de cada producto, con el objetivo de disponer de productos que efectivamente sean capaces de evitar la presentación de una enfermedad, y en consecuencia, disminuir o evitar mortalidades por esta causa.

En ese contexto, es indispensable disponer de instalaciones especializadas, que permitan realizar pruebas de vacunas para evaluar su seguridad y eficacia *in vivo* bajo condiciones controladas, y que dependan de entidades que aseguren una evaluación objetiva y libre de compromisos con los entes y productos evaluados.

Conscientes de esta realidad, y de la prioridad de abordar esta problemática, el Instituto de Fomento Pesquero (IFOP) desarrolló infraestructura especializada para evaluar vacunas en condiciones controladas, de acuerdo a estándares internacionales, y con la asesoría de reconocidos especialistas en la materia. Estas dependencias poseen los más altos niveles de bioseguridad, para el resguardo de la ejecución de las actividades, con el debido resguardo del estatus sanitario de su entorno.

El desarrollo de protocolos de evaluación para vacunas utilizadas en la industria salmicultora, estandarizados y validados, su ejecución, y la posterior entrega a la Autoridad de propuestas basadas en dichos resultados, representa una instancia inédita que permitirá abordar esta problemática, sobre la base de antecedentes científicos, y generados por un ente garante técnico del resguardo del patrimonio sanitario sectorial.



De esta forma, IFOP ejecuta el presente programa de estudios tendiente a elaborar y ejecutar los protocolos óptimos de evaluación de productos biológicos, con la finalidad de levantar información respecto a la seguridad y eficacia de vacunas, y validar estas características en etapas posteriores a su registro. De esta forma, se espera que la Autoridad sectorial disponga del respaldo técnico necesario para decidir la implementación de medidas de administración en sus planes de acción sanitaria.



2. OBJETIVO GENERAL

Ejecutar los protocolos óptimos de evaluación de seguridad y eficacia de los productos biológicos utilizados en la salmonicultura bajo condiciones controladas y de campo.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar un protocolo experimental óptimo que permita evaluar la seguridad y eficacia de los productos inmunológicos que se encarguen a evaluar, bajo condiciones controladas y de campo.
2. Ejecutar los protocolos óptimos de evaluación de seguridad y eficacia de los productos biológicos que se encarguen a evaluar, bajo condiciones controladas y de campo.



4. METODOLOGÍA

La metodología utilizada en la presente iniciativa se detalla de acuerdo a los objetivos específicos establecidos:

Objetivo específico 1: *Desarrollar un protocolo experimental óptimo que permita evaluar la seguridad y eficacia de los productos inmunológicos que se encarguen a evaluar, bajo condiciones controladas y de campo.*

4.1. Levantamiento de información bibliográfica y de antecedentes técnicos

Para la ejecución de esta actividad se consideró una revisión bibliográfica nacional e internacional relacionada de forma específica a estudios de evaluación de la seguridad y eficacia de productos biológicos (vacunas) de aplicación en peces, con énfasis en productos contra *P. salmonis*. La revisión bibliográfica, consideró tanto documentos, recomendaciones o normas descritas en entidades de referencia internacionales vinculadas al sector regulador-administrador oficial en países de interés como Noruega, Canadá, Reino Unido e indicaciones de la Comunidad Europea (Guías y Monografías de Farmacopea Europea).

Se revisaron las siguientes fuentes de información:

- Chile
 - o Servicio Agrícola y Ganadero (Servicio Agrícola y Ganadero, 2013-2015).
- Unión Europea y países miembros y anexos
 - o Farmacopea Europea (European Pharmacopea, 2011).
 - o European Medicinal Agency (European Medicines Agency, 1997; 2001 a, b, c; 2011; 2012 a, b; 2013).
- Noruega (Johansen et al., 2005; Ellingsen and Gudding, 2011).
- Estados Unidos de América:
 - o Code of Federal Regulations (Code of Federal Regulation of the United States of America, 2012).
- Canadá
 - o Canadian Centre for Veterinary Biologics. Canadian Food Inspection Agency (Canadian Centre for Veterinary Biologics, 2012b; c; a).
- VICH (International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products)



- o Target animal safety: examination of live veterinary vaccines in target animals for absence of reversion to virulence. 2007.
- Manuscritos científicos en revistas con revisión de pares e ISI (Fryer et al., 1990; Branson and Diaz-Munoz, 1991; Cvitanich et al., 1991; Garces et al., 1991; Lannan and Fryer, 1991; Fryer et al., 1992; Bravo, 1994; Lannan and Fryer, 1994; Fryer and Lannan, 1996; Kuzyk et al., 1996; Larenas et al., 1996; Mauel et al., 1996; Almendras et al., 1997; Smith et al., 1997; Barnes et al., 1998; Marshall et al., 1998; House et al., 1999; Mauel et al., 1999; Smith et al., 1999; Fryer and Hedrick, 2003; Wilhelm et al., 2006; Marshall et al., 2007; Brudeseth et al, 2013; Gudding and Van Muiswinkel, 2013; Rozas and Henríquez, 2014).

En general, debe indicarse que existen escasas normativas específicas para vacunas de peces y la mayoría son de tipo general con consideraciones técnicas y científicas básicas para la elaboración, registro, comercialización y evaluación de productos biológicos, pruebas *in vitro* e *in vivo*.



4.2. Análisis de la informaci3n y generaci3n de los protocolos de acuerdo a los productos a someter a evaluaci3n.

La b3squeda de informaci3n a nivel nacional e internacional, consider3 analizar protocolos, referencias o publicaciones científcas relacionadas con los procesos de determinaci3n de la dosis letal 50 (DL50) y de evaluaci3n de seguridad y eficacia de productos biol3gicos utilizados en producci3n de peces.

Sobre la base de la revisi3n bibliogrÁfica, de forma general se trabaj3 bajo la definici3n de una serie de parÁmetros que son de relevancia para validar las respectivas, entre los que se consideraron los siguientes:

Para el caso específcico de pruebas de seguridad los parÁmetros fueron:

- a. Origen, tamaío y n3mero de peces.
- b. Dosis de vacuna.
- c. Condiciones de mantenci3n de los grupos bajo estudio.
- d. Estandarizaci3n de las etapas de las pruebas de seguridad.
- e. Procedimiento de anÁlisis e interpretaci3n de los resultados de las pruebas de seguridad.

Para el caso específcico de las pruebas de eficacia los parÁmetros fueron:

- a. Origen, tamaío y n3mero de peces.
- b. Origen y dosis a utilizar de las cepas pat3genas.
- c. Condiciones de mantenci3n de los grupos.
- d. Estandarizaci3n de las etapas de las pruebas de eficacia.
- e. Procedimientos de anÁlisis e interpretaci3n de los resultados de las pruebas de eficacia.

De acuerdo a la priorizaci3n consensuada con la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (Subpesca), respecto de los productos biol3gicos a evaluar en esta etapa del programa de evaluaci3n oficial de productos biol3gicos, se desarrollaron los estudios de vacunas contra *Piscirickettsia salmonis*.

Los antecedentes informados a continuaci3n, dicen relaci3n con la implementaci3n de la prueba de eficacia para vacunas contra *Piscirickettsia salmonis*.

Definici3n de parÁmetros

Sobre la base de la revisi3n bibliogrÁfica, se identificaron los parÁmetros de mayor relevancia para validar la prueba de eficacia respectiva, entre los que se consideraron los siguientes:

- a. Origen, tamaío y n3mero de peces a desafiar.
- b. Origen y dosis a utilizar de las cepas pat3genas para los desafíos.
- c. Condiciones estÁndar de mantenci3n de los grupos bajo estudio.



- d. Estandarización de las etapas que constituyen las pruebas de eficacia.
- e. Procedimientos de cálculo de los resultados de la prueba.

Las características y detalle de cada uno de los parámetros descritos previamente, fueron establecidos en un protocolo estandarizado de evaluación, el que fue sometido a análisis en las instancias indicadas por el mandante, para su posterior consenso, finalizando con un protocolo definitivo.

Además de la participación del equipo de trabajo del Departamento de Salud Hidrobiológica de IFOP, se contó con la revisión de dicho documento, por parte de los representantes de la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura y de expertos identificados pertenecientes a universidades nacionales.

El protocolo, consideró las siguientes secciones:

- a. Antecedentes generales
- b. Objetivo general
- c. Descripción del estudio
 - Origen de los peces
 - Condiciones del estudio
 - Grupos experimentales
 - Inóculo bacteriano
 - Alimentación
 - Metodología
 - Interpretación de los resultados (Cálculo del porcentaje relativo de supervivencia, RPS).

Los antecedentes descritos previamente, son definidos en la sección de resultados.

4.2.2. Protocolo de determinación de la Dosis Letal 50 (DL50)

Se elaboró un protocolo para determinar la Dosis Letal 50 (DL50) de un aislado nacional de *P. salmonis*, adquirido desde el laboratorio de referencia de la red Sernapesca, perteneciente a la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (PUCV).

Al respecto, el laboratorio contactado como proveedor del inóculo bacteriano, hizo entrega del aislado caracterizado, animalizado y con toda la información técnica, incluido el requerimiento de haber generado alta mortalidad en el campo.

Se determinó la DL50 del aislado con la finalidad de determinar su virulencia y asegurar el cumplimiento cabal de los objetivos del estudio.



Se utilizaron 4 diluciones espec3ficas por aislado, las que fueron definidas previo al inicio del ensayo y de acuerdo con la experiencia previa y referencias bibliogr3ficas.

En cada diluci3n se desafiaron 40 peces no vacunados v3a intraperitoneal. El ensayo tuvo una duraci3n de aproximadamente 45 d3as.

Para el c3lculo de la DL50 se utiliz3 la f3rmula de Reed y Muench, teniendo solo en cuenta los valores pr3ximos al 50% de mortalidad, c3lculo de la distancia proporcional de los porcentajes de mortalidad y el logaritmo del incremento de las dos dosis adyacentes a dicho 50% (Jurado, 1989).

C3lculo del factor de distancia proporcional y DL₅₀

Distancia proporcional (DP):

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

DL₅₀:

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

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



4.2.3. Protocolo para la evaluación de seguridad de vacunas contra *P. salmonis*

Se generó una versión final del protocolo del estudio de seguridad, y que se resume a continuación en sus aspectos más relevantes. Se consideraron las eventuales modificaciones presentadas por consenso con los especialistas definidos por el mandante y la propia Subsecretaría de Pesca y Acuicultura.

El protocolo en su totalidad se presenta en el Anexo 4 del presente informe.

A manera de revisión de los aspectos generales del protocolo generado, se presentan a continuación sus secciones más importantes:

1. Introducción

Entrega antecedentes generales que enmarcan el desarrollo de esta actividad.

2. Objetivo general

Entrega los lineamientos que impulsan el desarrollo del documento.

3. Diseño experimental

3.1. Peces

La prueba de seguridad utilizará alevines de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) o trucha arcoiris (*O. mykiss*) con un peso de 40 gramos (rango de 37 a 43 gramos) al comienzo de las pruebas y provenientes de pisciculturas con ciclo completo en tierra.

Indica que los peces deberán contar con ciertos requisitos para ser utilizados previo al ingreso al centro experimental.

3.2. Condiciones ambientales.

La prueba de seguridad se realizará en agua dulce.

3.3. Metodología de la prueba de seguridad

Presenta los tratamientos a los que serán sometidos los peces dentro del centro experimental.

Cada estanque experimental tendrá 30 peces.

3.3.1. Grupos

Tratamiento/Vacunados: Se vacunarán los 30 peces del estanque designado al doblo de la dosis recomendada y siguiendo las recomendaciones de aplicación de la vacuna del fabricante.

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.

3.4. Alimentación

Los peces serán alimentados a saciedad en dos tomas al día utilizando alimento comercial sin aditivos, inmunoestimulantes o colorantes suministrados.

3.5. Parámetros a evaluar en la prueba de seguridad

Detalla los parámetros que serán medidos durante la prueba.

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 del protocolo respectivo.

3.6. Interpretación de los resultados de la prueba de seguridad

Indica cómo serán evaluados los resultados.

- La vacuna se considerará segura si reúne todas las condiciones señaladas en la siguiente tabla de interpretación de resultados (tabla 4 del protocolo).

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

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

Adicionalmente la prueba quedará nula, y deberá 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%.

4. Término del experimento



Se pondrá fin a las pruebas en cualquier momento en caso de que ocurra muerte de más del 50% de los peces en un día.

5. Informe de resultados

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

6. 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.

7. Diagrama de actividades

8. Referencias

El detalle del protocolo final estandarizado para evaluación de seguridad de vacunas contra *P. salmonis*, se entrega en el Anexo 4 del presente documento.

4.2.4. Protocolo para la evaluación de eficacia de vacunas contra *P. salmonis*

Se generó una versión definitiva del protocolo del estudio de eficacia, y que se resume a continuación en sus aspectos más relevantes. Se consideraran las eventuales modificaciones presentadas por consenso con los especialistas definidos por el mandante y la propia Subsecretaría de Pesca y Acuicultura.

El protocolo en su totalidad se presenta en el Anexo 5 del presente informe.

A manera de revisión de los aspectos generales del protocolo generado, se presentan a continuación sus secciones más importantes:

1. Introducción

Entrega antecedentes generales que enmarcan el desarrollo de esta actividad.

2. Objetivo general

Entrega los lineamientos que impulsan el desarrollo del documento.

3. Diseño experimental

3.1. Peces



La prueba de eficacia utilizará alevines de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) o trucha arcoiris (*O. mykiss*) con un peso de 40 gramos (rango de 37 a 43 gramos) al comienzo de las pruebas y provenientes de pisciculturas con ciclo completo en tierra.

Indica que los peces deberán contar con ciertos requisitos para ser utilizados previo al ingreso al centro experimental.

3.2. Condiciones ambientales.

La prueba de eficacia se realizará en agua dulce, agua estuarina y de mar.

3.3. Metodología de la prueba de eficacia

3.3.1. Vacunación, vacunación falsa y mantención de peces previo al desafío

Los peces ingresarán al centro experimental y se distribuirán en 2 estanques de mantención. Los peces se mantendrán en aclimatación en agua dulce durante 14 días. Cumplido el periodo de aclimatación, los peces serán puestos en ayuno por 24 horas y se realizará la vacunación y falsa vacunación obteniéndose los siguientes grupos experimentales:

- *Tratamiento/Vacunados*
- *Control/No vacunados*

3.3.2. Desarrollo de inmunidad, esmoltificación y tiempos de desafío

Los peces permanecerán en los estanques de mantención hasta que se genere inmunidad específica a la vacuna en peces vacunados, que los peces esmoltifiquen y hasta el momento del desafío.

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

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

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

Estos tiempos de desafío podrían modificarse dependiendo de los resultados preliminares o de las condiciones de factibilidad que presente el Centro de Maricultura Hueihue de IFOP, al momento del inicio de las actividades.

3.3.3. Desafío por cohabitación

Se realizará el desafío por cohabitación para evaluar la eficacia de la vacuna una vez alcanzados los tiempos de espera (650, 1000 y 2500 UTA). El desafío por cohabitación será en duplicado o triplicado (tres estanques de desafío por cohabitación), según factibilidad.



La dosis a inocular en los peces troyanos ser3 de 0,2 ml con aproximadamente $3 \times 10^6 \text{TCID}_{50}$ /pez por v3a intraperitoneal.

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

3.4. Alimentaci3n

Los peces ser3n alimentados a saciedad en dos tomas al d3a utilizando alimento comercial sin aditivos, inmuoestimulantes o colorantes suministrado, usando alimentadores autom3ticos.

3.5. 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 clipping o marcaje realizado como no vacunado (sin clipping), vacunado (clipping aleta adiposa) o troyano (clipping aleta dorsal). Todo pez muerto ser3 enviado al laboratorio de diagn3stico para confirmaci3n del agente causal.

3.6. 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 RPS_{60} , 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:

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

La vacuna se considerar3 eficaz si el RPS_{60} es igual o mayor a 65%.

3.7. Otros variables a evaluar

3.7.1. 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).

Posteriormente, en los d3as 25, 35 y 45 (post-vacunaci3n), se medir3 nuevamente longitud y peso y de 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 más de un 10% respecto del valor esperado en cada punto de muestreo.
- Diferencias de más de 10% en variables asociadas a la producción como K, SGR, GF3 o FCR entre y dentro de los grupos experimentales.

5. Cronograma de actividades

6. Informe de resultados

Se deberá entregar un informe científico - 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

El detalle del protocolo final estandarizado para evaluación de eficacia de vacunas contra *P. salmonis*, se entrega en el Anexo 5 del presente documento.



Objetivo específico 2: *Ejecutar los protocolos óptimos de evaluación de seguridad y eficacia de los productos biológicos que se encarguen a evaluar, bajo condiciones controladas y de campo.*

4.3. Ejecución de los estudios de determinación de la dosis letal 50 (DL50) y evaluación de seguridad y eficacia de productos biológicos bajo condiciones controladas.

Las actividades experimentales asociadas a las pruebas de dosis letal 50, evaluación de eficacia y seguridad de vacunas contra *Piscirickettsia salmonis* consideraron la ejecución de las siguientes actividades.

Obtención del inóculo bacteriano de *P. salmonis*

En consideración de que los estudios de Dosis Letal 50 (DL50) y de evaluación de eficacia de vacunas contra *Piscirickettsia salmonis*, se efectuaron utilizando un inóculo de características conocidas y certificadas, en conjunto con la entidad mandante, se definió el laboratorio de referencia oficial de la red de Sernapesca, como la entidad encargada de elaborar y entregar el inóculo bacteriano a ser utilizado en dichos estudios.

La cepa a utilizada tuvo una virulencia verificada por animalización (pasajes *in vivo*). La cepa corresponde a un aislado de referencia, y fue entregado con sus características y protocolos de manejo.

Obtención de grupos experimentales de peces

Se ingresó el grupo de peces para ser utilizados en las pruebas de seguridad y eficacia, a las dependencias del Centro de Maricultura de Hueihue, perteneciente a IFOP, ubicado en la Isla de Chiloé.

Para ello se tomó contacto con empresas productoras, con el objetivo de lograr la obtención de los ejemplares de *Salmo salar* en estado de alevín, con un peso promedio de alrededor de 40 gramos, pertenecientes a la cepa SNAQGS116 (Salar Nacional Aquagen Standard 1er grupo 2016), sin vacunación previa contra y en estado sanitario óptimo.

Previo al traslado, se efectuó un muestreo de 30 peces para efectuar análisis tendientes a verificar ausencia de agentes patógenos causantes de enfermedades en salmónidos.



Toma de muestras y análisis

Previo al inicio de los estudios a desarrollar en el Centro de Maricultura Hueihue, se procedió a efectuar un análisis presupuestario y de capacidades de diferentes laboratorios prestadores de servicio de diagnóstico, para determinar con qué entidad se trabajaría a lo largo del estudio para la confirmación diagnóstica de positividad al agente patógeno.

En particular, es determinante en la elección su experiencia con el manejo de *Piscirickettsia salmonis* vivo en sus variantes patógenas, de forma de asegurar la calidad del manejo de muestras y sus posteriores análisis para la detección del agente, así como la logística necesaria para poder hacer llegar las muestras en los tiempos límite requeridos.

Certificación de Bioseguridad

Previo al inicio de las actividades relacionadas a los estudios que implicaban el manejo de agentes patógenos vivos en dependencias de IFOP, el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura solicitó la ejecución de una auditoría externa para verificar la existencia de los niveles requeridos de bioseguridad, antes de autorizar el ingreso de inóculos de patógenos a las dependencias del centro experimental, y de su contacto con peces.

Se efectuó la auditoría y abordaje de las observaciones efectuadas por la especialista designada por Sernapesca, derivando en la autorización mediante Resolución Exenta N° 1229 del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, para dar curso a los estudios en el Centro de Maricultura Hueihue, perteneciente a IFOP.

En relación a los nuevos estudios, se solicitó autorización a Sernapesca, que de acuerdo a su criterio, podría realizar una nueva constatación de las medidas de bioseguridad, para autorizar el nuevo estudio con *P. salmonis*.

Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50)

Este ensayo fue realizado en el Centro de Investigación en Acuicultura Curauma de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (PUCV). Este cuenta con ambiente controlado y supervisión diaria de personal técnico-profesional bajo la responsabilidad de un Médico Veterinario. Se registraron diariamente los parámetros de temperatura del agua y saturación de oxígeno.

Para el estudio, se utilizaron un total 200 peces de la especie *Salmo salar*, de un peso promedio aproximado de 30 gramos, en estadio pre-smolt o juveniles, los cuales se distribuyeron en 5 estanques de 100 litros cada uno según grupo dosis aplicada y mantenidos a una temperatura controlada de 15°C.

El inóculo, cultivado en medio BM3 (Henríquez et al., 2013) fue elaborado en dependencias del laboratorio de Genética e Inmunología Molecular de la PUCV.



Para la infecci3n de los peces se utiliz3 dicho in3culo de *Piscirickettsia salmonis* LF-89 con un t3tulo promedio, con el cual se procedi3 a realizar tres diluciones seriadas m3s un grupo sin diluir.

1. Grupo directo (D0) = $10^{9,22} \times \text{ml}^{-1}$
2. Diluci3n 1 (D1) = $10^{8,22} \times \text{ml}^{-1}$
3. Diluci3n 2 (D2) = $10^{7,22} \times \text{ml}^{-1}$
4. Diluci3n 3 (D3) = $10^{6,22} \times \text{ml}^{-1}$

Las diluciones fueron realizadas con medio esencial m3nimo (MEM). Dichos in3culos fueron administrados por v3a intraperitoneal en un volumen de 0.1 ml/pez. Se utilizaron 5 estanques del centro con los siguientes tratamientos:

1. Se inocularon 40 peces con 0,1 ml de PBS1x como grupo control.
2. se inocularon 40 peces con 0,1 ml del in3culo D0
3. se inocularon 40 peces con 0,1 ml del in3culo D1
4. se inocularon 40 peces con 0,1 ml del in3culo D2
5. se inocularon 40 peces con 0,1 ml del in3culo D3

Las mortalidades fueron retiradas de los estanques 2 veces al d3a, registrando los datos y el ensayo se dio por finalizado una vez transcurridos 15 d3as sin mortalidades en los grupos.

A cada pez muerto se le realiz3 una necropsia para identificar la causa de muerte y se registraron las atribuibles a la enfermedad. Con esto se obtuvieron los datos para calcular la DL50 seg3n el m3todo de Reed y Muench, modificado por Jim3nez (2006) considerando los estanques donde se registr3 m3s de un 50% de mortalidad y menos del 50% de mortalidad.

Se deposit3 el pescado sobre un papel absorbente desechable, limpio, seco y antideslizante. Posteriormente realizar con el bistur3 un corte en la zona lateral, paralela a la l3nea media ventral, desde craneal a caudal; luego realizar un segundo corte desde las branquias hacia la l3nea media ventral.

Una vez expuestos los 3rganos por remoci3n de la pared lateral se procedi3 de la siguiente manera seg3n fue el caso:

- Se extrajeron trozos de 5 mm³ de los 3rganos blanco (ri3n3n e h3gado) y depositarlos en un tubo tipo Eppendorf con preservante de RNA para qPCR.
- Se extrajo el resto de ri3n3n e h3gado completos, para luego depositarlos en un tubo tipo Falcon de 15 ml para congelar.

El PCR en tiempo real se realiz3 seg3n Gomez et al. (2013)



Evaluación de seguridad de vacunas contra *P. salmonis*

Peces:

La prueba de seguridad utilizó alevines de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) con un rango de peso de entre 32 y 42 gramos al inicio de la prueba, provenientes de la Piscicultura Quimeyco de la empresa Trusal.

La prueba de seguridad se realizó en su totalidad con agua dulce proveniente de pozo profundo con tratamiento de filtrado y descarboxilación.

Grupos:

- Tratamiento/Vacunados: Se vacunaron los 30 peces del estanque designado al doble de la dosis recomendada y siguiendo las recomendaciones de aplicación de la vacuna del fabricante.

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

Alimentación:

Los peces fueron alimentados a saciedad en dos tomas al día utilizando alimento comercial sin aditivos, inmunoestimulantes o colorantes suministrados.

Se registró y retiró la mortalidad en todos los grupos experimentales en la mañana y en la tarde. Parte de la mortalidad fue enviada al laboratorio de diagnóstico para descartar causas infecto-contagiosas.

Al final de la prueba de seguridad (día 35) se realizó la eutanasia de todos los peces utilizando una sobredosis anestésica (benzocaína clorhidrato > 250 mg/l).

La clasificación y cuantificación de las adherencias se realizó de acuerdo a la escala de Speilberg.

Interpretación de los resultados de la prueba de seguridad:

- La vacuna se consideró segura si cumplió todas las condiciones señaladas en la tabla de interpretación de resultados.

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



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

Adicionalmente se procedió a verificar si existieron diferencias significativas entre productos evaluados en relación al parámetro de seguridad evaluada.

El procedimiento utilizado para determinar si existieron diferencias significativas entre los grupos fue el Análisis de Varianza (ANOVA). Se realizó una comparación de cuatro niveles, es decir, las cuatro vacunas en evaluación para verificar si existieron diferencias significativas entre ellas. El factor cuantitativo evaluado en la prueba de seguridad fueron las adherencias producidas por la vacuna, determinadas por medio de la clasificación de adherencias según la escala de Speilberg. Se determinó un promedio del grado de adherencias para cada grupo y comparadas las diferencias inter grupos. Además, se realizó un análisis de comparación entre vacunas, con el propósito de encontrar diferencias significativas entre ellas y determinar en cuales se producen las mayores diferencias.

Evaluación de eficacia de vacunas contra *P. salmonis*

*Obtención del inóculo bacteriano de *P. salmonis**

Se adquirieron 300ml de inóculo de un aislado de campo de *P. salmonis* crecida en el medio BM3 (elaboración propia) al laboratorio de referencia de Piscirickettsiosis de Sernapesca, perteneciente a la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (PUCV).

El inóculo tuvo una densidad óptica de 0,78 y una dosis letal 50 calculada de $1,67 \times 10^{5,6}$, estimada a partir de los porcentajes de mortalidad acumulada y utilizando el método de Reed y Muench.

Previo a la inoculación en peces, el inóculo se centrifugó en tubos tipo Falcon por 15 minutos a 6000 rpm, para luego resuspender en la cantidad necesaria de PBS 1x estéril.

Peces

Se utilizaron peces de la especie *S. salar* de un peso promedio de entre 35 y 40gr., provenientes de la piscicultura Quimeyko, perteneciente a la empresa Trusal. Los ejemplares corresponden a la cepa genética de *S. salar* SNAQGS116 (Salar Nacional Aquagen Standard 1er grupo 2016).

Los peces fueron chequeados para certificación de estado sanitario, para los principales patógenos, en el laboratorio de servicios Antares S.A., resultando negativos a todos los análisis.



Marcaje

Previo a la distribución en los estanques, un grupo de peces fue separado y marcado de acuerdo a los diferentes grupos a emplear en la evaluación de eficacia, considerando los grupos por vacuna a evaluar, los grupos control y el grupo troyanos.

El sistema empleado corresponde a un marcaje basado en un elastómero denominado VIE (Visible Implant Elastomer) de la empresa Northwest Marine Technology-NMT, EUA.

El marcador se inyectó bajo los tejidos transparentes o translúcidos del pez, permaneciendo visible. El marcador está compuesto de dos materiales biocompatibles que se mezclan inmediatamente antes de su uso. La mezcla líquida se inyectó sobre la órbita ocular, la que luego endureció, transformándose en un sólido moldeable.

Productos biológicos a evaluar

Se verificó con base en el listado de productos biológicos inmunológicos con registro provisional para uso en salmónidos a junio de 2016, del Servicio Agrícola y Ganadero, SAG, los proveedores de vacunas cuyo producto considerara como patógeno objetivo P. salmonis. Al respecto, se confirmó la disponibilidad de productos en sólo cuatro laboratorios farmacéuticos.

Estos productos fueron adquiridos y rotulados como 1, 2, 3 y 4 para efectos de las pruebas, buscando resguardar un estudio ciego respecto del nombre comercial del producto.

La totalidad de las vacunas a evaluar corresponden a productos polivalentes de uso inyectable.

Vacunación

Cumplido el periodo de aclimatación, y logrado el peso mínimo indicado previamente, los peces fueron puestos en ayuno por 24 horas para luego ser vacunados con los productos previamente definidos, y con solución de Hank's como falsa vacunación, obteniéndose los siguientes grupos experimentales:

Grupo Vacunados: Se vacunaron intraperitonealmente 360 peces del estanque de mantención previamente definido, con la dosis y aplicación recomendada por el fabricante respectivo.

Posteriormente, los peces fueron dispuestos en estanques de 1m³, de acuerdo a la configuración de los grupos del estudio, y para iniciar el proceso de esmoltificación, previo al desafío a las 650 UTA.

El proceso se efectuó con los peces que fueron extraídos desde el estanque de reserva y puestos en un estanque con una solución anestésica. La solución anestésica consistió en 0,25 g de benzocaína, disuelta en 10 l de agua. Una vez que los peces alcanzaron el plano anestésico III (L. G. Ross &



Ross, 2008), se tomaron individualmente y se sostuvieron con la cara ventral hacia arriba y con la cabeza dirigida lejos del cuerpo del operador.

El tamaño de la aguja se ajustó para el tamaño de los peces a través de toques plásticos. La aguja se insertó lentamente en un ángulo de aproximadamente 45° en la línea media ventral entre las aletas pectorales y las pélvicas.

Grupo Control/No vacunados: Se realizó una falsa vacunación a 360 peces del estanque de reserva previamente definido, utilizando solución salina estéril Hank's (Hank's Balanced Salt Solution, Mediatech, Inc.), con el mismo volumen que el aplicado en el grupo de peces vacunados.

Se realizó el mismo procedimiento de inoculación que el realizado a los peces vacunados, realizándose un marcaje por color.

Los peces fueron dispuestos, juntos a los peces previamente vacunados, en estanques de 1m³, de acuerdo a la distribución de grupos finales por estanque preestablecida, para luego proceder con el proceso de esmoltificación, previo al desafío.

El proceso de vacunación y falsa vacunación se llevó a cabo por parte la empresa especializada Homing S.A., que concurrió al Centro Experimental Hueihue, con un Jefe de cuadrilla y tres operarios, junto con sus equipamientos respectivos (Figura 1).



Figura 1. Proceso de vacunación por parte de la empresa Homing S.A. en Centro Experimental Hueihue, IFOP.



Grupo futuros troyanos: Adicionalmente se conformó un tercer grupo, dispuesto en un estanque de 1m³, y en la misma sala de los grupos anteriores, el que fue sometido al mismo proceso de esmoltificación, y que posteriormente corresponderían a los peces a ser utilizados como troyanos dentro de cada grupo experimental, al momento que la totalidad de los grupos alcance las 650 UTA.

Desarrollo de inmunidad y esmoltificación

Los peces permanecieron en esta disposición en los estanques, hasta generar inmunidad específica a la vacuna, para posteriormente iniciar el proceso de esmoltificación y finalmente proceder con el primer desafío con *P. salmonis* a las 650UTA.

Para el proceso de esmoltificación de los peces, se elaboró un programa que incorporó gradualmente agua de mar a los estanques para que a las 650 UTA (aproximadamente 54 días) los peces estuvieran totalmente acondicionados a agua de mar.

La esmoltificación se ha verificado a través de prueba de ATPasa post-vacunación, tomando como muestra 10 peces, y según protocolo del laboratorio de análisis respectivo (Europharma).

Desafío por cohabitación

A la fecha del presente informe, considerando que los grupos de peces bajo estudio de eficacia, no han alcanzado las 650 Unidades Térmicas Acumuladas (UTA), no ha podido ser realizado el primer desafío con el aislado bacteriano de *P. salmonis* por cohabitación.

Los resultados finales de esta prueba, así como los desafíos a las 1000 y 2500, podrán ser presentados en la siguiente etapa del presente programa para 2016-2017, que ya se encuentra en curso.

Una vez realizado el desafío, se procederá a clasificar la mortalidad como específica por *P. salmonis*, la generación de curvas de mortalidad y finalmente la interpretación de los resultados de la prueba de eficacia.

En relación al retraso del inicio de la prueba de eficacia, debe considerarse como principal factor los problemas asociados a la disponibilidad de agua dulce, elemento fundamental en la primera etapa de la prueba, de acuerdo a como se ha ideado el presente protocolo.

Por un lado, los acuíferos subterráneos en general de la Isla de Chiloé, tuvieron un rendimiento muy bajo durante el verano y otoño de 2016, lo que imposibilitó el ingreso de los peces en estado de alevín al centro experimental Hueihue.

Por otro lado, sumado a la falta de flujos de agua mínimos, y probablemente como consecuencia del mismo fenómeno, se generó un cambio en la calidad del agua dulce del pozo, observándose depósitos de hierro en los fondos de los estanques, generando la mortalidad total del primer grupo de



peces que ya haba sido ingresado a mediados del 2016, destinado a la ejecuci3n de las diferentes pruebas de vacunas.

Esta situaci3n implic3 la adquisici3n e instalaci3n de un filtro industrial, equipo Greensand m3s filtro de carb3n activado para la remoci3n de fierro y cloro, que permitiese la eliminaci3n de estos elementos, obteni3ndose una calidad de agua m3nima requerida para el cultivo de peces salm3nidos.

Solo una vez logrados un m3nimo de caudal y las condiciones requeridas de calidad, fue posible hacer ingreso de un nuevo grupo de peces y dar inicio a los estudios que requerian en su primera etapa, la utilizaci3n de agua dulce.



5. RESULTADOS

Objetivo específico 1: *Desarrollar un protocolo experimental óptimo que permita evaluar la seguridad y eficacia de los productos inmunológicos que se encarguen a evaluar, bajo condiciones controladas y de campo.*

5.1. Levantamiento de información bibliográfica y de antecedentes técnicos.

Se realizó la revisión bibliográfica nacional e internacional de estudios de evaluación de la seguridad y eficacia de productos biológicos (vacunas), de aplicación en peces de producción.

La revisión bibliográfica consideró documentos, recomendaciones o normas descritas en entidades de referencia internacionales vinculadas al sector regulador oficial en Chile, Unión Europea, Noruega, Canadá, Estados Unidos de Norteamérica, VICH y manuscritos en revistas científicas con evaluación de pares e indexadas en ISI.

Referencias nacionales

Servicio Agrícola y Ganadero, Ministerio de Agricultura

El análisis se enfocó en los documentos establecidos por el SAG, que por ley tiene las facultades sobre el registro de productos biológicos de uso en animales de producción a través del Decreto Supremo N° 25 de 2005, del Ministerio de Agricultura. Este Decreto aprueba el Reglamento de Productos Farmacéuticos de Uso Exclusivamente Veterinario.

El Reglamento reúne una serie de antecedentes que describen las características, procesos y requisitos que deben cumplir los productos biológicos para su aprobación de uso en acuicultura. Se describe de forma explícita que las metodologías a utilizar por parte de los laboratorios para efectuar las evaluaciones de productos biológicos deberán ser en base a normativas oficiales nacionales e internacionales. En el caso que no existan estas normativas, el SAG evaluará de forma particular la información proporcionada por el interesado (Artículo 8°). Particularmente, para el caso de las vacunas de uso en especies salmonídeas, no existen normativas nacionales. Sin embargo existen referencias internacionales que serán revisados más adelante.

Los artículos 37° y 38° del Reglamento establecen la existencia de un control de serie para todos los productos biológicos (importados o nacionales) que tiene como objeto fundamental detectar, evidenciar, verificar y comprobar todas o algunas de las especificaciones, cualidades y condiciones de presentación e identificación del producto.

Para el registro de nuevos productos biológicos en Chile se deben entregar documentos de respaldo científico técnico que, entre otros, incluyen el control de la eficacia y seguridad del producto que se está registrando.



Es así que existen los siguientes documentos del SAG que permiten efectuar el registro de tipo provisional de los productos biológicos (Anexo N 1):

- P-PP-RM-003: Procedimiento para el registro provisional de productos inmunológicos de uso en salmónidos:

El propósito del procedimiento es proporcionar información a las empresas farmacéuticas para solicitar y obtener el registro provisional de productos inmunológicos de uso en salmónidos. El registro provisional tiene como objetivo disponer de manera oportuna medicamentos veterinarios en el mercado cuando se presenta una enfermedad nueva, cuando una enfermedad existente ha cambiado sus características toda vez que no existan productos registrados adecuados para su tratamiento o prevención.

- I-PP-RM-004: Instructivo para el registro provisional de productos inmunológicos de uso en salmónidos:

Este instructivo contiene las definiciones y exigencias técnicas para solicitar el registro de productos biológicos. Además, contiene la definición de secciones mínimas que dicho documento debe contener, por ejemplo resumen del expediente, calidad, información sobre seguridad, eficacia y bibliografía.

Adicionalmente se presenta el listado de productos biológicos inmunológicos con registro provisional para uso en salmónidos, en su versión más reciente de septiembre de 2016. (Anexo 1).

Referencias internacionales

Se efectuó una revisión de normativas y referencias asociadas a exigencias y guías para estudios de evaluación de seguridad y eficacia de productos biológicos animales, con énfasis en los específicos para peces de producción.

Se recolectaron y analizaron normativas y legislaciones de la Unión Europea, VICH, Noruega, Estados Unidos de América y Canadá.

Unión Europea

- *European Pharmacopea. Specific requirements for the production and control of live and inactivated vaccines intended for fish (European Pharmacopea, 2011).*



La Farmacopea Europea es la entidad encargada poner a disposición la colección de estándares para la producción y evaluación de medicamentos en Europa. Contiene las monografías relacionadas con la producción y evaluación de la seguridad y eficacia de vacunas veterinarias, y algunas de ellas se refieren particularmente a vacunas para peces salmónidos como la 7Blm9a.

Es importante recalcar que actualmente la monografía 0062 indica que no es obligatorio realizar pruebas de seguridad por batch a vacunas de uso veterinario. Esta situación ha generado normativas de la EMA (European Medicines Agency, 2012a, European Medicines Agency, 2012b) que indican que a partir del 1 de Enero de 2013 no será necesario realizar evaluaciones de batch a productos inmunológicos veterinarios en la Unión Europea como se detallará más adelante.

- *European Medicinal Agency*

De manera introductoria e histórica, los productos biológicos en la Unión Europea están regulados por la Directiva 2001/82/CE, en la que se establece un código comunitario en materia de producción, comercialización, distribución y utilización de los medicamentos de uso veterinarios, en los que se incluyen los productos biológicos. En el año 2004 la Directiva se modificó para originando la Directiva 2004/28/CE que redefinió el concepto de medicamento veterinario como: "...toda sustancia o combinación de sustancias: a) que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales; o b) que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar las funciones fisiológicas del animal ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico". A su vez, los requerimientos para demostrar la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos veterinarios en la Unión Europea están incluidos en la Directiva 81/852/EEC y sus modificaciones. En el año 2004 se crea la Agencia Europea de Evaluación de Medicamentos (EMA) que se encarga de la evaluación, control y vigilancia farmacológica de los medicamentos de uso humano y veterinario. En este sentido, el Comité de Medicamentos de uso Veterinarios (CVMP) que se encarga de preparar los dictámenes, notas o recomendaciones para determinar la eficacia, seguridad, evaluación del riesgo ambiental y la calidad de los medicamentos de uso veterinario de la EMA.

Históricamente, es la Directiva 81/852/EEC, la que establece los requisitos de elaboración y registro de medicamentos veterinarios. Este documento está destinado a proporcionar orientación sobre el tipo de datos que deben incluirse en las solicitudes de autorización de comercialización de vacunas virales y bacterianas para peces. De forma general, se aplican los mismos principios de la producción y control de las vacunas en mamíferos detallados en los Requisitos Generales para la Producción y control de vacunas bacterianas y virales de mamíferos de uso veterinario (GRLMV) o en las Normas Generales para la Producción y Control de Vacunas bacterianas y virales de Mamíferos Inactivadas de uso Veterinario (GRIMV). Los requerimientos específicos más importantes, para evaluación de seguridad y eficacia de los productos biológicos en peces son los siguientes:

- Se deben realizar pruebas de cada lote o batch producido
- Las muestras para las pruebas se tomarán desde los lotes producidos de acuerdo con el proceso de fabricación descrito en la solicitud de autorización de comercialización.



- La prueba se basará en la especie animal (de pez) objetivo.
- Si una vacuna está indicada para su uso en varias especies, la prueba se debe efectuar en cada especie.
- Debe observarse y registrarse cualquier morbilidad / mortalidad en los peces bajo estudio.
- Después de al menos 14 días (para pruebas de seguridad), los peces restantes deben ser sacrificados y examinados para detectar señales de reacciones sistémicas y / o locales.
- Se verificará cualquier posible reacción en el sitio inyección, y se efectuarán los estudios adecuados para revelar la ocurrencia o magnitud de tales reacciones.
- Debe ser documentado el periodo de carencia previo al sacrificio.

Para el caso particular de productos inmunológicos la EMEA ha generado guías generales y guías específicas.

Las guías generales relacionadas con la evaluación de vacunas son:

- Environmental risk assessment for immunological veterinary medicinal products. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (European Medicines Agency, 1997).
- Field Trials with Veterinary Vaccines (European Medicines Agency, 2001c).
- Duration of protection achieved by veterinary vaccines (European Medicines Agency, 2001a).
- Requirements for combined veterinary vaccines (European Medicines Agency, 2001b).
- Guideline on data requirements for removing the target animal batch safety test for immunological veterinary medicinal products in the EU (European Medicines Agency, 2012a).
- Guideline on requirements for the production and control of immunological veterinary medicinal products (European Medicines Agency, 2012b).

Las guías generales dan las recomendaciones metodológicas generales de cómo realizar estudios para verificar la toxicidad, ecotoxicidad, protección, eficacia y seguridad de productos inmunológicos de uso veterinario en la Unión Europea. Todos los países miembros de la Unión Europea se rigen por estas normas y las empresas farmacéuticas que quieran colocar en el mercado productos inmunológicos deben asegurar que estos cumplen con estas normas.

Lo más importante de señalar es la modificación que rige a partir de enero del 2013 respecto de la no obligatoriedad de realizar pruebas de eficacia a batch de vacunas de uso veterinario, toda vez que se demuestre una sola vez ésta, y que la metodología de fabricación no cambia entre batch.

La guía específica relacionada con la evaluación de vacunas es:



- Guideline on the design of studies to evaluate the safety and efficacy of fish vaccines (European Medicines Agency, 2011).

Esta guía específica rige a partir del 1 de Mayo de 2012 y contiene las recomendaciones para la ejecución de pruebas de evaluación de eficacia y seguridad de vacunas de peces. El documento detalla las consideraciones para realizar pruebas de eficacia y seguridad bajo condiciones controladas y pruebas de campo, tales como:

- Calidad y cantidad de peces
- Condiciones del agua y otras ambientales
- Tipo, dosis y forma de administración de la vacuna a evaluar.
- Controles positivos y negativos.
- Condiciones acerca de desafíos con patógenos en pruebas de eficacia
- Condiciones de número y calidad del lugar en la evaluación por pruebas de campo que incluyen entre otros, cantidad de sitios, calidad de sitios (por ejemplo jaulas, manejos alimenticios e higiene), distribución geográfica de sitios.
- Consideraciones estadísticas.

Esta es una guía muy completa y única en términos de entregar los antecedentes específicos para peces de producción dentro de la revisión bibliográfica analizada.

Las guías y directrices de la Unión Europea se pueden revisar y analizar en detalle en el Anexo 2.

Noruega

Noruega no es un país miembro de la Unión Europea, pero es un país miembro del Área Económica Europea. Así, el desarrollo de vacunas y la validación en Noruega está regulado por las normas nacionales que siguen la legislación europea (Directrices, Monografías y EMEA). Un productor de la vacuna en Noruega debe tener un permiso de fabricación válido la Agencia Europea de Medicamentos. La autorización para producir un producto farmacéutico se basa en una amplia documentación que demuestra que su producción estuvo en conformidad con la Norma Europea de Buenas Prácticas de Producción o Good Manufacturing Practice. Los permisos se dan por un período limitado y todos los productos están sujetos a inspección. Las empresas farmacéuticas que quieran comercializar las vacunas en el mercado noruego también deben contar con un permiso de comercialización que demuestre una calidad, seguridad y efecto terapéutico adecuado.

El desarrollo y aprobación de una vacuna nueva para peces en Noruega se considera las siguientes etapas:

Fase 1 - Viabilidad (estudios de laboratorio): en esta fase se realiza pruebas de virulencia, diseño de modelos de desafíos con patógenos, estudios de protección cruzada y de titulación de dosis

Fase 2 - Desarrollo de pruebas de laboratorio y de campo: esta fase considera la evaluación de los productos a través de evaluaciones de campo, determinación de inicio y duración de la inmunidad, evaluación de seguridad y eficacia (o potencia), estabilidad, pruebas de determinación de dosis.



Fase 3 - Documentación de las pruebas de laboratorio y de campo: para las pruebas de eficacia y seguridad.

Fase 4 - Post-licencia (estudios posteriores a la comercialización): considera la ejecución de estudios de campo, evaluación de estabilidad, seguridad y eficacia de lotes o batch.

En consecuencia Noruega por lo general toma en consideración y obedece a lo establecido normativamente por la UE (Johansen et al., 2005) y ha sido impulsor de la aplicación del concepto de las 3Rs (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) en el desarrollo y evaluación de vacunas para peces que actualmente está en modificación (Ellingsen and Gudding, 2011).

La bibliografía asociada a las regulaciones y directrices en Noruega se encuentra en el Anexo 2.

Estados Unidos de Norteamérica

- Code of Federal Regulations

La regulación de Estados Unidos de Norteamérica está enmarcada en leyes federales que señalan los requerimientos en la producción de productos biológicos veterinarios en el Código de Regulaciones Federales (Code of Federal Regulation of the United States of America, 2012).

Adicionalmente, los productos biológicos veterinarios en Estados Unidos, están regulados por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), según el “Virus-Serum-Toxin Act” (VST Act) de 1913, modificado por el Food Security Act de 1985, el que garantiza que todos los productos biológicos veterinarios comercializados en Estados Unidos de Norteamérica, sean efectivos y seguros a los animales y medioambiente. The VST Act permite la entrega de licencias condicionales y especiales a productos sobre la base de la pureza, seguridad y expectativa razonable de eficacia con el propósito de solucionar una condición de emergencia, comercialización limitada o situación local, u otras circunstancias especiales. La autoridad para administrar el VST Act de la USDA es el Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) que además prepara memorandos, notas públicas, documentos guía y métodos de ensayo suplementarios para la evaluación de los productos biológicos de uso comercial. Estas directrices son generales y no específicas para el diseño, implementación y ejecución de vacunas para todas las especies animales y se basan en la International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH) que se detallará más adelante en el presente informe.

En el Anexo 2 se encuentran las regulaciones en detalle de Estados Unidos de América.

Sin embargo, Estados Unidos de América no cuenta con directrices o normativas técnicas que indiquen los requerimientos específicos en el diseño, implementación y ejecución de pruebas de evaluación de eficacia y seguridad para vacunas de uso en peces de producción.

Canadá



- *Canadian Centre for Veterinary Biologics del Canadian Food Inspection Agency (CCVB/CFIA)*

En Canadá los productos biológicos veterinarios están regulados por la (CCVB/CFIA) a través del Health of Animals Act and Regulations de Canadá. Estas regulaciones incluyen un grupo amplio de productos biológicos tales como vacunas, productos en base a anticuerpos y kit diagnósticos y deben demostrar que son puros, potentes, seguros y efectivos para obtener licencia comercial. La normativa canadiense es muy parecida a la estadounidense y basada en el VICH. De forma específica el CCVB/CFIA tiene una guía que detalla los requisitos de calidad que deben tener los productos biológicos para uso en animales (Canadian Centre for Veterinary Biologics, 2012b) dirigida a fabricantes canadienses y extranjeros y una guía que entrega las recomendaciones para la entrega de resultados en pruebas eficacia y seguridad de productos biológicos de uso animal bajo condiciones controladas y de campo (Canadian Centre for Veterinary Biologics, 2012a).

El CCVB utiliza un proceso de múltiples pasos para evaluar la seguridad de los productos biológicos veterinarios, que incluye la revisión y aprobación de documentos y datos de las pruebas presentados por los fabricantes, líneas celulares, control de serie de productos, y aprobaciones posteriores de productos de serie bajo vigilancia de residuos o eventos adversos.

Es importante señalar nuevamente que ninguna guía y regulación canadiense específica para la evaluación de eficacia y seguridad de vacuna de uso en peces y las que existen sólo detallan requerimientos generales y similares a los que recomienda el VICH.

Los documentos en extenso de seguridad exigidos a productos biológicos en Canadá, se detallan en el Anexo 2 del presente informe.

International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products VICH

De forma introductoria, el VICH es un organismo multinacional que busca armonizar procedimientos analíticos y pruebas in vitro e in vivo para el registro de productos veterinarios en general, incluyendo productos biológicos. Está integrado por Japón, Estados Unidos y la Unión Europea. Posee una serie de guías y recomendaciones sobre el diseño, elaboración y ejecución de pruebas con productos biológicos siendo todas estas generales (VICH, 2007, VICH, 2009). Actualmente, no existe una guía desarrollada por el VICH para la evaluación de productos biológicos en peces de producción.

Los documentos analizados del VICH se encuentran en el Anexo 2 del presente informe.

Manuscritos en revistas científicas con evaluación de pares e indexadas a ISI



Se realizó una búsqueda extensa relacionada con evaluación de eficacia y seguridad de vacunas encontrándose escasos estudios específicos. Se han realizado varios estudios utilizando desafíos controlados para caracterizar la enfermedad pero la mayoría ha utilizado peces pequeños y en agua dulce, desviándose de la situación biológica real donde ocurre la enfermedad peces (House et al., 1999, Smith et al., 1999, Wilhelm et al., 2006). Las publicaciones científicas relevantes a pruebas de seguridad y eficacia de vacunas se encuentran en el Anexo 2.

5.2. Análisis de la información y generación de los protocolos de acuerdo a los productos a someter a evaluación.

5.2.1. Condiciones generales del estudio

Inicialmente se definieron las condiciones generales para llevar a cabo las pruebas de seguridad y eficacia de vacunas contra *P. salmonis*, considerando los parámetros definidos por el mandante para dichos estudios.

a. Origen, tamaño y número de peces a desafiar.

Origen de los peces

Al momento de su traslado, y previa tramitación de acuerdo a normativa, los ejemplares fueron chequeados representativamente, para evaluar su condición sanitaria a través de análisis en laboratorios acreditados por Sernapesca.

Se recopilaron los antecedentes de la cepa de peces a evaluar, de forma de que sea representativa de la industria. La cepa debía ser la misma para todos los grupos a evaluar.

Los peces a considerar en las pruebas tuvieron una óptima condición productiva y sanitaria, y no se aceptaron individuos provenientes de grupos rezagados o de descarte.

Tamaño de los peces

Se utilizaron 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.

Números de peces para el estudio de eficacia

De acuerdo al protocolo establecido, se utilizaron como mínimo 1.760 peces, con las características de origen y tamaño previamente identificados.

Otros antecedentes asociados a los peces

Se consideraron los análisis para los principales patógenos de peces, a través de las técnicas definidas como de elección de acuerdo a OIE y a Sernapesca, y por patógeno pesquisado. Se



consideró además, el historial sanitario para efectos de ser un grupo de elección para las evaluaciones.

Previo a la aceptación de los peces para la evaluación de eficacia, 30 peces fueron chequeados para verificar condición sanitaria y productiva.

Se tomaron muestras a cada uno de los peces para identificar la presencia o ausencia de patógenos utilizando técnicas de PCR y/o cultivo bacteriológico. Para el caso específico de IPNV se utilizaron cultivo celular e IFAT.

Los grupos de peces candidatos resultaron negativos a la presencia de agentes patógenos causantes de Piscirickettsiosis, Flavobacteriosis, Renibacteriosis, Necrosis Pancreática Infecciosa y Anemia Infecciosa del Salmón.

b. Origen y dosis a utilizar de las cepas patógenas para los desafíos.

Inóculo viral caracterizado de *P. salmonis*

El inóculo caracterizado de *P. salmonis*, fue entregado por el laboratorio de referencia de Sernapesca para ese patógeno.

La cepa utilizada posee una virulencia verificada por dos animalizaciones (pasajes *in vivo*). La cepa corresponde a un aislado de campo, y fue entregada por el laboratorio, unidad que entregó sus características y protocolos de manejo en relación a DL₅₀.

Dosis de inóculo a utilizar en el ensayo

La dosis a inocular en los peces troyanos fue de 0,2 ml por vía intraperitoneal.

Los peces fueron extraídos desde el estanque de mantención y trasladados a un estanque con una solución anestésica. La solución anestésica consiste en 0,25 g de benzocaína, disuelta primero en alcohol absoluto y luego adicionada a 10 L de agua.

Una vez que los peces alcanzaron el plano anestésico III, se tomaron individualmente y se sostuvieron con la cara ventral hacia arriba y la cabeza dirigida lejos del cuerpo del operador. El tamaño de la aguja fue la apropiada para el tamaño de los peces.

El punto de inyección es en la línea media ventral a una distancia entre ½ y 1 longitud de aleta pectorales, posterior a la base de esta aleta. La aguja se insertó lentamente en un ángulo de lo más cercano a 45° en la línea media ventral entre las aletas pectorales y las pélvicas, y se inyectó 0,2 ml del inóculo intraperitonealmente. Después de retirar la aguja, el pez fue transferido a un estanque de recuperación bien oxigenado, y luego trasladados nuevamente al estanque original.

c. Condiciones estándar de mantención de los grupos bajo estudio.



Los estudios de eficacia comenzaron con los peces en agua dulce, pasando luego por un periodo de smoltificaci3n.

Entre los parámetros a considerar se encuentran los rangos de temperatura de cultivo, la densidad de peces, el porcentaje de oxígeno disuelto y la tasas de recambio de agua durante las pruebas.

Las condiciones en las que fueron mantenidos los grupos en estudio serán las siguientes (Tabla 1):

Tabla 1. Parámetros de cultivo para efectuar las pruebas de eficacia de vacunas para *P. salmonis*.

Parámetro	Unidad	Valor	Observaci3n
Densidad	kg/m ³	15	Densidad final
Temperatura	°C	10	± 2
Oxígeno disuelto	mg/l	8	Mínimo 5, máximo 12
Tasa recambio	l/kg pez/min	0,8	Como mínimo

Los parámetros del agua fueron monitoreados de manera continua.

d. Estandarizaci3n de las etapas que constituyen las pruebas de eficacia

La prueba de eficacia tiene una serie de etapas que se estandarizaron respecto de cada uno de los productos biológicos a evaluar (Tabla 2).

Tabla 2. Actividades e hitos de la prueba de eficacia de vacunas contra *P. salmonis*.

Día	Actividad
0	Ingreso de peces en agua dulce
	Establecimiento de grupos experimentales
7	1° medici3n de longitud y peso
14	Ayuno a todos los peces
14	1° muestreo de inmunocompetencia previo a vacunaci3n
	Vacunaci3n y placebos
29	1° muestreo de smoltificaci3n
39	2° Muestreo de smoltificaci3n
49	3° muestreo de smoltificaci3n
	2° medici3n de longitud y peso
59	3° medici3n de longitud y peso
69	4° medici3n de peso y longitud
82	2° muestreo para pruebas de inmunocompetencia
	Inicio de desafío de cohabitaci3n con peces troyanos inoculados con pat3genos y peces



	inoculados con placebo
127	Termino de ensayo
	3° muestreo para inmunocompetencia
	Muestreo final para detección de patógenos a todos los peces

e. Procedimientos de cálculo de los resultados de la prueba eficacia.

Una vez finalizado el estudio, se debía calcular el porcentaje relativo de sobrevivencia (RPS), considerando la mortalidad acumulada de los peces del grupo de peces vacunados al momento en que el grupo de peces control alcanza el 60% de mortalidad, según la siguiente expresión:

$$RPS = 1 - (\% \text{ mortalidad específica peces vacunados} / 60 (\text{mortalidad \% de no vacunados}) \times 100 \%$$

Para los grupos inoculados, se considera mortalidad específica aquella que haya sido confirmada para *P. salmonis*, mediante técnicas de diagnóstico específicas, como PCR y cultivo celular.

La evaluación de la respectiva prueba, se considera positivo o satisfactorio, cuando el resultado del RPS_{60} sea igual o mayor al 65%.

f. Procedimientos de cálculo de los resultados de la prueba seguridad.

Mortalidad: Se chequea, registra y retira la mortalidad en todos los grupos experimentales en la mañana y en la tarde. La mortalidad se envía al laboratorio de diagnóstico para descartar causas infecto-contagiosas.

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

La clasificación y cuantificación de las adherencias se realiza de acuerdo a la escala de Speilberg que se detalla en la tabla 3:

**Tabla 3.** 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 melanina. Vísceras no pueden desprenderse sin causar daño a musculatura.	Daño mayor de la canal

La clasificación y cuantificación de melanosis encontradas se realiza siguiendo la escala descrita en la tabla 4.



Tabla 4. Escala del nivel de pigmentación (Melanosis)

Grado	Apariencia visual de la cavidad abdominal	Severidad de la lesión
0	Ausente	Sin pigmentación visible
1	Moderado	Presencia de regiones de melanina visible menores después de la evisceración fácilmente removibles manualmente.
2	Severo	Daño visible en las carcasas después de la evisceración, difícil o imposible de remover sin causar daño al tejido muscular.

Interpretación de los resultados de la prueba de seguridad

La vacuna se considera segura si reúne todas las condiciones señaladas en la siguiente tabla de interpretación de resultados (tabla 5).

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

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

Adicionalmente la prueba quedará nula, y debe 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 5. Interpretación de la prueba de seguridad.

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



5.2.2. Protocolo de evaluación de eficacia de productos biológicos contra *P. salmonis*.

Luego de efectuadas las modificaciones presentadas por consenso con los especialistas definidos por el mandante y la propia Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, se generó una versión definitiva del protocolo de estudio de eficacia, y que se resume a continuación en sus aspectos más relevantes.

El protocolo en su totalidad se presenta en el Anexo 5 del presente informe.

A manera de revisión de los aspectos generales del protocolo generado, se presentan a continuación sus secciones más importantes:

1. Introducción

Entrega antecedentes generales que enmarcan el desarrollo de esta actividad.

2. Objetivo general

Entrega los lineamientos que impulsan el desarrollo del documento.

3. Diseño experimental

3.1. Peces

La prueba de eficacia utilizará alevines de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) con un peso de 40 gramos (rango de 37 a 43 gramos) al comienzo de las pruebas y provenientes de pisciculturas con ciclo completo en tierra.

Indica que los peces deberán contar con ciertos requisitos para ser utilizados previo al ingreso al centro experimental.

3.2. Condiciones ambientales.

La prueba de eficacia se realizará en agua dulce, agua estuarina y de mar.

3.3. Metodología de la prueba de eficacia

3.3.1. Vacunación, vacunación falsa y mantención de peces previo al desafío

Los peces ingresarán al centro experimental y se distribuirán en 2 estanques de mantención con 450 peces cada uno. Los peces se mantendrán en aclimatación en agua dulce durante 14 días. Cumplido el periodo de aclimatación, los peces serán puestos en ayuno por 24 horas y se realizará la vacunación y falsa vacunación obteniéndose los siguientes grupos experimentales:

- *Tratamiento/Vacunados*
- *Control/No vacunados*

3.3.2. Desarrollo de inmunidad, esmoltificación y tiempos de desafío



Los peces permanecerán en los estanques de mantención hasta que se genere inmunidad específica a la vacuna en peces vacunados, que los peces esmoltifiquen y hasta el momento del desafío.

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

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

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

Estos tiempos de desafío podrían modificarse dependiendo de los resultados preliminares o de las condiciones de factibilidad que presente el Centro de Maricultura Hueihue de IFOP, al momento del inicio de las actividades.

3.3.3. Desafío por cohabitación

Se realizará el desafío por cohabitación para evaluar la eficacia de la vacuna una vez alcanzados los tiempos de espera (650, 1000 y 2500 UTA). El desafío por cohabitación será en duplicado o triplicado (tres estanques de desafío por cohabitación), según factibilidad.

La dosis a inocular en los peces troyanos será de 0,2 ml con aproximadamente $3 \times 10^6 \text{TCID}_{50}$ /pez por vía intraperitoneal.

La duración del desafío por cohabitación será de 45 días o hasta alcanzar el 60% de mortalidad en peces no vacunados.

3.4. Alimentación

Los peces serán alimentados a saciedad en dos tomas al día utilizando alimento comercial sin aditivos, inmunoestimulantes o colorantes suministrado, usando alimentadores automáticos.

3.5. Parámetros a evaluar en la prueba de eficacia

Mortalidad: Se chequeará, registrará y retirará la mortalidad en todos los grupos experimentales en la mañana y en la tarde. Se identificará cada pez muerto de acuerdo al marcaje realizado como no vacunado, vacunado o troyano. Todo pez muerto será enviado al laboratorio de diagnóstico para confirmación del agente causal.

3.6. Interpretación de los resultados de la prueba de eficacia

Con los resultados de mortalidad durante el desafío por cohabitación se calculará el porcentaje relativo de sobrevivencia (RPS). Esta ampliamente aceptada la utilización del RPS_{60} , calculado como una relación 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:



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

La vacuna se considerará eficaz si el RPS_{60} es igual o mayor a 65%.

3.7. Otros variables a evaluar

3.7.1. Variables asociadas a producción

Se medirá longitud y peso húmedo a los 7 días post-ingreso al centro de experimentación sobre el 10% de los peces y se calculará el factor de condición inicial (K).

Posteriormente, en los días 25, 35 y 45 (post-vacunación), se medirá nuevamente longitud y peso y de calcularán la tasa específica de crecimiento (SGR), tasa de crecimiento térmico (GF3) y tasa de Conversión de Alimento (FCR). Este proceso se efectuará en al menos en el 10% de los peces.

El muestreo de peso y longitud final se hará el día 127 a la totalidad de los peces y se calcularán las variables productivas anteriormente mencionadas.

4. Término del experimento

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

- Muerte de más del 10% de los peces en 1 día.
- Muerte de más del 50% de los peces en desafío de cohabitación en un día.
- Valores de K, GF3 y FCR desviados más de un 10% respecto del valor esperado en cada punto de muestreo.
- Diferencias de más de 10% en variables asociadas a la producción como K, SGR, GF3 o FCR entre y dentro de los grupos experimentales.

5. Cronograma de actividades

6. Informe de resultados

Se deberá entregar un informe científico - 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

El detalle del protocolo final estandarizado para evaluación de eficacia de vacunas contra *P. salmonis*, se entrega en el Anexo 5 del presente documento.



5.2.3. Protocolo de evaluación de seguridad de productos biológicos contra *P. salmonis*.

Se generó una versión final del protocolo del estudio de seguridad, y que se resume a continuación en sus aspectos más relevantes. Se consideraron las eventuales modificaciones presentadas por consenso con los especialistas definidos por el mandante y la propia Subsecretaría de Pesca y Acuicultura.

El protocolo en su totalidad se presenta en el Anexo 4 del presente informe.

A manera de revisión de los aspectos generales del protocolo generado, se presentan a continuación sus secciones más importantes:

1. Introducción

Entrega antecedentes generales que enmarcan el desarrollo de esta actividad.

2. Objetivo general

Entrega los lineamientos que impulsan el desarrollo del documento.

3. Diseño experimental

3.1. Peces

La prueba de seguridad utilizará alevines de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) o trucha arcoiris (*O. mykiss*) con un peso de 40 gramos (rango de 37 a 43 gramos) al comienzo de las pruebas y provenientes de pisciculturas con ciclo completo en tierra.

Indica que los peces deberán contar con ciertos requisitos para ser utilizados previo al ingreso al centro experimental.

3.2. Condiciones ambientales.

La prueba de seguridad se realizará en agua dulce.

3.3. Metodología de la prueba de seguridad

Presenta los tratamientos a los que serán sometidos los peces dentro del centro experimental.

Cada estanque experimental tendrá 30 peces.

3.3.1. Grupos

Tratamiento/Vacunados: Se vacunarán los 30 peces del estanque designado al doble de la dosis recomendada y siguiendo las recomendaciones de aplicación de la vacuna del fabricante.

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.

3.4. Alimentación

Los peces serán alimentados a saciedad en dos tomas al día utilizando alimento comercial sin aditivos, inmunoestimulantes o colorantes suministrados.

3.5. Parámetros a evaluar en la prueba de seguridad

Detalla los parámetros que serán medidos durante la prueba.

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 Spielberg que se detalla el protocolo.

3.6. Interpretación de los resultados de la prueba de seguridad

Indica cómo serán evaluados los resultados.

- La vacuna se considerará segura si reúne todas las condiciones señaladas en la siguiente tabla de interpretación de resultados.

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

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



Adicionalmente la prueba quedará nula, y deberá 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%.

4. Término del experimento

Se pondrá fin a las pruebas en cualquier momento en caso de que ocurra muerte de más del 50% de los peces en un día.

5. Informe de resultados

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

6. 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.

7. Diagrama de actividades

8. Referencias

El detalle del protocolo final estandarizado para evaluación de seguridad de vacunas contra *P. salmonis*, se entrega en el Anexo 4 del presente documento.

5.2.4. Protocolo de determinación de la dosis letal 50 (DL50) de inóculo de *P. salmonis*.

Se elaboró un protocolo experimental para la determinación de la Dosis Letal 50 (DL₅₀) del desafío con un aislado caracterizado de *P. salmonis*.

El objetivo general del protocolo elaborado es describir los procedimientos para determinar la DL₅₀ de un inóculo de *P. salmonis* para ser utilizado en pruebas de evaluación de vacunas.

Las principales secciones del protocolo se describen a continuación.

Diseño experimental

Peces: Se utilizarán salmones del Atlántico (*Salmo salar*) o trucha arcoiris (*O. mykiss*) con un peso de 40+/-3 g provenientes de pisciculturas con ciclo completo en tierra. Los peces deberán contar con los siguientes requisitos para ser utilizados previo al ingreso al centro experimental:

- *Cepa de peces a evaluar:* los peces deben ser del mismo origen a los utilizados en las correspondientes pruebas de evaluación de eficacia de vacunas contra *P. salmonis*. Los



peces no deben haber sido vacunados contra ninguna enfermedad.

- *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 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.

Condiciones ambientales.

Los par3metros de la tabla 6 se deber3n medir y mantener diariamente en concordancia con lo recomendado para un correcto bienestar de los peces European Food Safety Authority, 2014).

Tabla 6. Par3metros ambientales durante la prueba de DL50

Par3metro	Unidad	Valor	Observaci3n
Densidad peces	kg/m ³	25	Densidad final m3xima
Temperatura agua	°C	Ambiente	Captaci3n en Bah3a Hueihue
Ox3geno disuelto agua	mg/l	8	M3nimo 5, m3ximo 12
Tasa recambio agua	l/kg pez/min	0,8	Como m3nimo

Metodolog3a

Mantenci3n previa hasta alcanzar 650 UTAs

Los peces ingresar3n al centro experimental a un estanque de mantenci3n con agua dulce (N3mero total de peces = 200 aprox.). Este n3mero corresponde a la cantidad de peces necesarios para la prueba de DL₅₀ (peces troyanos y cohabitantes y asumiendo un 10% de mortalidad de peces hasta el inicio de los desaf3os de cohabitaci3n).

Desaf3o por cohabitaci3n

Se realizar3 el desaf3o en duplicado para cada diluci3n del in3culo y sus correspondientes controles negativos.

Los grupos experimentales estar3n constituidos por 40 peces, en estanques diferentes de 300 litros. Los peces troyanos corresponder3n a peces inoculados con una diluci3n conocida de la cepa de *P.*



salmonis.

La cepa a utilizar debe tener una virulencia verificada por al menos 2 pasajes *in vivo*. La cepa corresponderá a un aislado de campo, a seleccionar de entre las alternativas disponibles, y previamente evaluada 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 in3culo preparado con su respectivo análisis y estimaci3n de la TCID₅₀, seg3n el método de Spearman-Kärber (Hubert 1984) y se manejará de acuerdo al procedimiento previamente citado.

Considerando que se conocerá estimativamente la DL₅₀ del in3culo, se necesitarán menos condiciones experimentales y sólo los siguientes grupos experimentales:

1. Grupo directo (D0) = $10^{9,22} \times \text{ml}^{-1}$
2. Diluci3n 1 (D1) = $10^{8,22} \times \text{ml}^{-1}$
3. Diluci3n 2 (D2) = $10^{7,22} \times \text{ml}^{-1}$
4. Diluci3n 3 (D3) = $10^{6,22} \times \text{ml}^{-1}$

La duraci3n del desafío por cohabitaci3n será de 45 días, hasta alcanzar el 100% de mortalidad o 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 3rganos para el laboratorio diagn3stico para evaluar de presencia o ausencia de alg3n pat3geno.

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 señal3 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.

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 clipping o marcaje realizado como cohabitaci3n (sin clipping), troyano (clipping aleta dorsal). Todo pez muerto será enviado al laboratorio de diagn3stico para confirmaci3n del agente causal.



Interpretación de los resultados de la prueba de determinación de DL_{50}

Con los resultados de mortalidad durante el desafío por cohabitación se determinará la dilución de inóculo que se corresponde a DL_{50} .

Para el cálculo de la DL_{50} 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 determinación de la DL_{50} se realizará en duplicado para cada especie salmonídea.

Factor de distancia proporcional:

DL_{50} :

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

Distancia proporcional (DP):

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

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

Término anticipado de las pruebas

Se pondrá fin a las pruebas en cualquier momento en caso de que exista la muerte de más del 60% de los peces en un sólo día. Este término temprano se realizará mediante el traslado de los peces a estanques que contengan una sobredosis de anestésico (> 250 mg/l de benzocaína clorhidrato). Se enviarán muestras para análisis de patógenos u otra presunta causa.

Informe de resultados

Se deberá entregar un informe científico-técnico con los resultados, análisis, discusión y conclusiones obtenidas dentro de un plazo de 15 días finalizada la prueba.

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.

El detalle del protocolo elaborado puede ser revisado en Anexo 3 del presente informe.



Objetivo espec3fico 2: *Ejecutar los protocolos 3ptimos de evaluaci3n de seguridad y eficacia de los productos biol3gicos que se encarguen a evaluar, bajo condiciones controladas y de campo.*

5.3. Ejecuci3n de los protocolos 3ptimos de evaluaci3n de seguridad y eficacia de los productos biol3gicos.

La ejecuci3n de los estudios en condiciones controladas para la determinaci3n de la dosis letal 50 del in3culo bacteriano a utilizar, as3 como las pruebas de eficacia y seguridad de las vacunas contra *P. salmonis* a evaluar, se inici3 con las siguientes actividades.

Obtenci3n del in3culo bacteriano de *P. salmonis*

Se adquirieron 300ml de in3culo de un aislado de campo de *P. salmonis* crecida en el medio BM3 (elaboraci3n propia) al laboratorio de referencia de Piscirickettsiosis de Sernapesca, perteneciente a la Pontificia Universidad Cat3lica de Valpara3so (PUCV).

El aislado bacteriano fue caracterizado como perteneciente a la cepa LF-89 y fue aislado desde salm3n del Atl3ntico (*Salmo salar*).

El in3culo tuvo una densidad 3ptica de 0,78 y una dosis letal 50 calculada de $1,67 \times 10^{5,6}$, estimada a partir de los porcentajes de mortalidad acumulada y utilizando el m3todo de Reed y Muench, (modificado por Jim3nez, 2006), el cual considera los estanques donde se registr3 m3s de un 50% de mortalidad y menos del 50% de mortalidad.

Previo a la inoculaci3n en peces, el in3culo se centrifug3 en tubos tipo Falcon por 15 minutos a 6000 rpm, para luego resuspender en la cantidad necesaria de PBS 1x est3ril.

Peces

Se ingresaron aproximadamente 6000 peces de la especie *S. salar* de un peso promedio de entre 35 y 40gr., provenientes de la piscicultura Quimeyko, perteneciente a la empresa Trusal.

Los ejemplares corresponden a la cepa gen3tica de *S. salar* SNAQGS116 (Salar Nacional Aquagen Standard 1er grupo 2016).

Los peces fueron chequeados para certificaci3n de estado sanitario, para los principales pat3genos, en el laboratorio de servicios Antares S.A., resultando negativos a todos los an3lisis.



Marcaje

Previo a la distribuci3n en los estanques, un grupo de peces fue separado y marcado de acuerdo a los grupos a utilizar en el estudio de DL50 y el resto, fue marcado diferencialmente, de acuerdo a los diferentes grupos a emplear en la evaluaci3n de eficacia y seguridad, considerando los grupos por vacuna a evaluar, los grupos control y el grupo troyanos.

El sistema empleado para seguridad y eficacia corresponde a un marcaje basado en un elast3mero denominado VIE (Visible Implant Elastomer) de la empresa Northwest Marine Technology-NMT, EUA.

El marcador se inyect3 bajo los tejidos transparentes o traslúcidos del pez, permaneciendo visible. El marcador est3 compuesto de dos materiales biocompatibles que se mezclan inmediatamente antes de su uso. La mezcla líquida se inyect3 sobre la3rbita ocular, la que luego endureci3, transformándose en un s3lido moldeable.

Productos biol3gicos a evaluar

Se verific3 con base en el listado de productos biol3gicos inmunol3gicos con registro provisional para uso en salm3nidos a septiembre de 2016, del Servicio Agrícola y Ganadero, SAG, los proveedores de vacunas cuyo producto considerara como pat3geno objetivo *P. salmonis*. Al respecto, se confirm3 la disponibilidad de productos en s3lo cuatro laboratorios farmac3uticos.

Estos productos ya fueron adquiridos y fueron rotulados como 1, 2, 3 y 4 para efectos de las pruebas, buscando resguardar un estudio ciego respecto del nombre comercial del producto.

La totalidad de las vacunas a evaluar corresponden a productos polivalentes de uso inyectable.

Determinaci3n de la Dosis Letal 50 (DL50) del in3culo bacteriano a utilizar

Se logr3 desarrollar la enfermedad en todos los grupos desafiados, los cuales evidenciaron lesiones y signos clínicos característicos asociados a la enfermedad (necropsia), los cuales posteriormente fueron confirmados mediante diagn3sticos especílicos (qPCR).

Se realizaron exámenes anatomopatol3gicos de las mortalidades, observando signología y lesiones tanto externas como internas concordantes con las descritas para Piscirickettsiosis (Rozas & Henríquez, 2013).

Los resultados de PCR en tiempo real todos los análisis fueron positivos, con valores de Ct que bordearon los 18 – 20.

Cálculo de la dosis letal 50 (DL50):



Los porcentajes de mortalidad asociada a cada diluci3n fueron las siguientes (Tabla 7):

Tabla 7.
Mortalidad acumulada (%) asociada a cada diluci3n del in3culo bacteriano.

Dosis	Mortalidad acumulada (%)
$1,67 \times 10^8$	90
$1,67 \times 10^7$	85
$1,67 \times 10^6$	77,5
$1,67 \times 10^5$	30
Control negativo	0

A partir de estos porcentajes de mortalidad acumulada y utilizando el m3todo de Reed y Muench, modificado por Jim3nez (2006), el cual considera los estanques donde se registr3 m3s de un 50% de mortalidad y menos del 50% de mortalidad, la dosis letal 50 calculada para el aislado bacteriano a utilizar en las pruebas fue de $1,67 \times 10^{5,6}$.

Evaluaci3n de seguridad de productos biol3gicos para *P. salmonis* en condiciones controladas

En la Tabla 8, se observan los resultados de la interpretaci3n de la prueba de seguridad de las vacunas contra *P. salmonis* utilizadas en el estudio. El porcentaje de mortalidad (n3mero de peces) atribuible al producto utilizado fue de un 0% (0), tanto para las cuatro vacunas como para el grupo control (Hank's).

En cuanto al promedio de casos con adherencias, los resultados fueron variados, siendo la vacuna 1 la que present3 el promedio m3s alto con 1,67, seguido de la vacuna 3 con 1,17, la vacuna 4 con un 0,24 y por3ltimo, con el menor promedio de adherencias, la vacuna 2 con s3lo un 0,05.

En el caso de los hallazgos de melanosis, para todos los productos utilizados fue de un promedio de 0, tanto para las cuatro vacunas como para el grupo control (Hank's). Por lo tanto, seg3n el criterio de interpretaci3n de la prueba de seguridad, los resultados arrojaron que las cuatro vacunas fueron seguras y satisfactorias en cuanto a los par3metros incorporados en el an3lisis.

**Tabla 8.**Interpretación de los resultados de evaluación de seguridad de vacunas contra *P. salmonis*

Vacuna	Porcentaje de mortalidad	Adherencias (promedio)	Melanosis (promedio)	Interpretación
Vacuna 1	0%	1,67	0	Satisfactoria
Vacuna 2	0%	0,05	0	Satisfactoria
Vacuna 3	0%	1,17	0	Satisfactoria
Vacuna 4	0%	0,24	0	Satisfactoria
Hank's (control)	0%	0	0	Satisfactoria

Análisis estadístico:

Se realizó el Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor (adherencias) para las cuatro vacunas evaluadas en el estudio y los resultados fueron los siguientes (Tabla 9):

Tabla 9.

Resumen descriptivo del análisis de varianza (ANOVA) de un factor.

Vacuna	Suma	Promedio	Varianza
Vacuna 1	75	1,666666667	0,363636364
Vacuna 2	2	0,046511628	0,045404208
Vacuna 3	70	1,166666667	0,81920904
Vacuna 4	9	0,236842105	0,347795164

En la Tabla 10, se observó que mediante el análisis de varianza de un factor, éste indicó que sí existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las cuatro vacunas evaluadas, en cuanto a las adherencias producidas en los peces post-vacunación. Se rechaza la hipótesis nula que todas las vacunas producen el mismo efecto en cuanto a las adherencias y se acepta la hipótesis alternativa de que al menos una vacuna difiere de las otras, produciendo menores o mayores grados de adherencias.

**Tabla 10.**

Resultados de Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor con cuatro niveles.

Variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Valor p
Inter-grupos	78,05	3	26,01	59,85	5,69e-27
Intra-grupos	79,11	182	0,43	-	-
Total	157,16	185	-	-	-

En la Tabla 11, se presentaron los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de un factor entre las vacunas evaluadas, con el propósito de comprobar las diferencias entre una vacuna con respecto a las otras tres. El análisis que resultó con diferencias significativas fue el comparar la Vacuna 2 con respecto a la Vacuna 1, 3 y 4. Las que presentaron diferencias significativas entre ellas fueron las Vacuna 2 con respecto a la Vacuna 4 (F: 11,879; $p < 0,05$). Para los análisis restantes no se presentaron diferencias significativas entre ellas ($p > 0,05$).

Tabla 11.

Resultados de Análisis de Varianza (ANOVA) entre vacunas.

Vacunas	Variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Valor p
Vacuna 1	Inter-grupos	0,137	1	0,137	0,560	0,459
	Intra-grupos	10,049	41	0,245	-	-
	Total	10,186	42	-	-	-
Vacuna 3	Inter-grupos	0,150	1	0,150	0,208	0,650
	Intra-grupos	29,524	41	0,720	-	-
	Total	29,674	42	-	-	-
Vacuna 4	Inter-grupos	3,193	1	3,193	11,879	0,001*
	Intra-grupos	9,676	36	0,269	-	-
	Total	12,868	37	-	-	-

Evaluaci3n de eficacia de productos biol3gicos para *P. salmonis* en condiciones controladas

a. In3culo bacteriano de P. salmonis

Se utilizaron 100ml de in3culo de un aislado de campo de *P. salmonis* crecida en el medio BM3 (elaboraci3n propia) al laboratorio de referencia de Piscirickettsiosis de Sernapesca, perteneciente a la Pontificia Universidad Cat3lica de Valparaíso (PUCV).



b. Peces

Se utilizaron 4680 peces de la especie *S. salar* de un peso promedio de entre 35 y 40gr., provenientes de la piscicultura Quimeyko, perteneciente a la empresa Trusal.

Los ejemplares corresponden a la cepa genética de *S. salar* SNAQGS116 (Salar Nacional Aquagen Standard 1er grupo 2016).

Los peces fueron chequeados para certificación de estado sanitario, para los principales patógenos, en el laboratorio de servicios Antares S.A., resultando negativos a todos los análisis, verificándose la ausencia de patógenos causantes de piscirickettsiosis, flavobacteriosis, renibacteriosis, necrosis pancreática infecciosa y anemia infecciosa del salmón. Las muestras de tejido se enviaron al laboratorio diagnóstico para análisis utilizando técnicas de PCR, cultivo bacteriológico, cultivo celular o IFAT, según correspondía.

Considerando que los resultados para la detección de agentes patógenos específicos fueron negativos, el grupo de peces fue ingresado y se mantuvo sin alimentación por dos días, iniciando un periodo de aclimatación superior a los 14 días inicialmente indicados.

El peso promedio de los peces al ingreso fue de 25 grs. Posteriormente, se efectuaron muestreos de peso y talla, para lograr obtener la mayor homogeneidad del grupo que finalmente sería utilizado para el estudio.

c. Marcaje

Previo a la distribución en los estanques, los peces fueron marcados diferencialmente, de acuerdo a los diferentes grupos a emplear en la evaluación de eficacia, considerando los grupos por vacuna a evaluar (4 más un quinto grupo para evaluar por i.p.), los grupos control y el grupo troyanos.

El sistema empleado corresponde a un marcaje basado en un elastómero denominado VIE (Visible Implant Elastomer) de la empresa Northwest Marine Technology-NMT, EUA.

Los grupos del estudio de eficacia finalmente quedaron establecidos de la siguiente forma (Tabla 12).



Tabla 12.

Conformaci3n de los grupos de peces para el estudio de eficacia de vacunas contra *P. salmonis*.

N° vacuna	N° estanque	Identificaci3n	Color	N° peces
1	17	Vacunados	Rojo	360
		Hank's	Amarillo	360
		Troyanos	S/marca	300
2	18	Vacunados	Naranja	360
		Hank's	Azul	360
		Troyanos	S/marca	300
3	19	Vacunados	Rosado	360
		Hank's	Azul	360
		Troyanos	S/marca	300
4	20	Vacunados	Rosado	360
		Hank's	Verde	360
		Troyanos	S/marca	300
5	21	Vacunados	Verde	300
		Hank's	Rojo	300

d. Muestreo de peso

Se realiz3 el primer muestreo de peso, cuyo promedio fue de 41grs. con una dispersi3n promedio de 10,2%. Los resultados se indican en la siguiente tabla (Tabla 13).

Tabla 13.

Resultados del muestreo de peso, y clasificaci3n de 4 grupos bajo estudio.

	N° estanque			
	18	19	20	21
Peso Mx. (gr)	46,00	45,50	49,50	48,50
Peso Mín. (gr)	38,50	30,50	31,50	35,00
Peso Promedio (gr)	42,63	39,17	39,43	43,07
Desv. St.	3,08	3,72	4,14	5,88
% Dispersi3n	7,22	9,50	10,49	13,66
Indice de condici3n (K)	1,19	1,30	1,29	1,24
Promedio Longitud (cm)	15,31	14,44	14,50	15,14



e. Alimentaci3n

La alimentaci3n de los grupos de peces destinados al estudio de eficacia, se inici3 dos d3as luego de su ingreso al centro. Inicialmente hubo una mala apetencia no obstante, igualmente se calcul3 una raci3n con una Tasa Espec3fica de Crecimiento (SGR-Specific Growth Ratio) de un 1,5, 3ndice que se mantuvo hasta el final del ensayo.

Una vez realizado el primer muestreo de peso, un mes posterior al ingreso, dicho SRG de 1,5, se mantuvo, considerando que el factor de condici3n indic3 un buen crecimiento.

La alimentaci3n se ajust3 a la talla y n3mero de peces. A pesar de manejar un valor para el crecimiento como rango de referencia, la alimentaci3n fue dada pr3cticamente a saciedad y repartida en dos raciones diarias.

La dieta entregada durante esta etapa del ensayo fue la siguiente (Tabla 14):



Tabla 14.
Datos del alimento entregado durante el ensayo a la fecha.

Alimento Biomar- Alitec. Planta Castro	
Dieta	Golden Óptima
Calibre	1.5 mm
Lote	4204084
Aditivos	sin aditivos
Fecha Elaboración	08-09-2016
Fecha Vencimiento	90 días desde fecha elaboración
Peso neto	Bolsa de 25 kgs
Rango de peso	15 a 30 grs

Observaciones: Desde 20 de septiembre

Alimento Biomar- Alitec. Planta Castro	
Dieta	Golden Rc Orbit
Calibre	1.5 mm
Lote	4204319
Aditivos	sin aditivos
Fecha Elaboración	23-09-2016
Fecha Vencimiento	90 días desde fecha elaboración
Peso neto	Bolsa de 20 kgs
Rango de peso	15 a 30 grs

Observaciones: Desde 08 de octubre

Alimento Biomar- Alitec. Planta Castro	
Dieta	Golden Rc Orbit intro
Calibre	2 mm
Lote	4204296
Aditivos	sin aditivos
Fecha Elaboración	21-09-2016
Fecha Vencimiento	90 días desde fecha elaboración
Peso neto	Bolsa de 20 kgs
Rango de peso	30 a 50 grs

Observaciones: Desde el 15 de noviembre hasta fecha actual.



Este último calibre y alimentación se mantuvo durante la etapa de aplicación de fotoperiodo, anterior a la esmoltificación.

f. Condiciones ambientales

El estudio de eficacia de productos biológicos para *P. salmonis*, se realizó inicialmente con los peces en agua dulce, para posteriormente, ir incrementando la salinidad, de forma de lograr una correcta esmoltificación.

Las modificaciones a la salinidad del agua de los grupos experimentales se presenta en la tabla 15, donde es posible verificar un aumento gradual de la concentración de agua de mar por sobre agua dulce.

Los parámetros de temperatura y oxígeno disuelto fueron registrados de forma diaria por estanque. Al respecto y de forma general, se indica que la temperatura promedio durante lo que va del ensayo fue de 12,4°C. Asimismo, el promedio de oxígeno disuelto medido para ese mismo periodo fue de 10,7 mg/L.

g. Productos biológicos evaluados

La definición de los productos biológicos destinados a la prevención de Piscirickettsiosis a ser evaluados respecto de su eficacia, se realizó revisando la lista de productos biológicos inmunológicos con registro provisional de uso en salmónidos, elaborado por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).

Los productos fueron adquiridos y resguardados a 4°C hasta su utilización de forma “ciega” por parte del equipo de vacunación y del personal de IFOP, retirándose previamente las etiquetas y siendo embalados con cinta adhesiva de color y etiquetados con números del 1 al 5.

Los productos evaluados fueron 4 presentaciones comerciales, y se duplicó una de éstos para evaluar adicionalmente la eficacia a través de inoculación intraperitoneal (i.p.) y luego efectuar comparaciones para ese mismo producto con el sistema de infección por cohabitación utilizado en el presente protocolo.

h. Vacunación

Cumplido el periodo de aclimatación, y logrado el peso mínimo indicado previamente, los peces fueron puestos en ayuno por 24 horas para luego ser vacunados con los productos previamente definidos, y con solución de Hank's como falsa vacunación, obteniéndose los siguientes grupos experimentales:



Grupo Vacunados: 360 peces del estanque de mantenci3n previamente definido, con la dosis y aplicaci3n recomendada por el fabricante respectivo. Los peces vacunados fueron identificados a trav3s del marcaje indicado previamente.

Grupo Control/No vacunados: 360 peces del estanque de reserva previamente definido, utilizando soluci3n salina est3ril Hank's (Hank's Balanced Salt Solution, Mediatech, Inc.), con el mismo volumen que el aplicado en el grupo de peces vacunados.

Grupo futuros troyanos: 300 peces dispuestos en 1 estanque de 1m³, y en la misma sala de los grupos anteriores, el que fue sometido al mismo proceso de esmoltificaci3n, y que posteriormente corresponde a los peces a ser utilizados como troyanos dentro de cada grupo experimental, al momento que la totalidad de los grupos alcance las 650 UTA.

El proceso fue ejecutado por la empresa especializada Homing S.A.

i. Proceso de esmoltificaci3n

Para realizar la prueba de eficacia con desaf3o por cohabitaci3n a las 650 UTA se estableci3 un cronograma de esmoltificaci3n de acuerdo a las condiciones del centro y de los peces, bajo el siguiente r3gimen de luz y salinidad, como se indica en la siguiente tabla (Tabla 15).

Tabla 15.
Cronograma del manejo de fotoperiodo aplicado al grupo experimental de peces para generar la esmoltificaci3n.

Manejo /Semanas	1	2	3	4	1	2	3	4
Fotoperiodo 1 semana invierno (8 hrs luz / 16 oscuridad)								
Fotoperiodo 2 semana invierno (8 hrs luz / 16 oscuridad)								
Fotoperiodo 3 semana invierno (8 hrs luz / 16 oscuridad)								
Fotoperiodo 4 semana invierno (10 hrs luz / 14 hrs oscuridad) /Salinidad 7%								
Fotoperiodo 5 semana invierno (12 hrs luz / 12 hrs oscuridad) /Salinidad 15%								
Muestreo ATPasa								
Fotoperiodo 1 semana verano final (24 hrs luz) / Salinidad 15 -20 %								
Fotoperiodo 2 semana verano final (24 hrs luz) / Salinidad 20 -30%								
Fotoperiodo 3 semana verano final (24 hrs luz) / Salinidad 20 -30%								
* Depende de resultado de an3lisis de ATPasa								

Los resultados obtenidos del primer an3lisis de Na⁺/ K⁺ ATPasa (11 de noviembre de 2016) se muestran en la figura 2, y evidencian a la fecha un desarrollo incipiente de la capacidad osmorregulatoria del grupo muestreado de 10 peces.

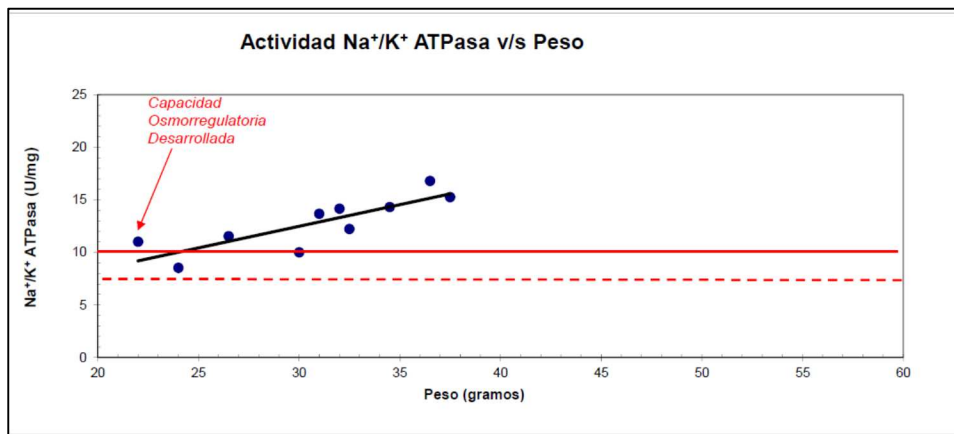


Figura 2. Resultados de la medición de Na⁺/ K⁺ ATPasa de 10 peces. Peso versus actividad de Na⁺/ K⁺ ATPasa (U/mg).

j. Desafío por cohabitación

El desafío por cohabitación con el aislado caracterizado de *P. salmonis*, establecido por protocolo para ser realizado al momento de que el grupo vacunado de peces alcance las 650 unidades térmicas acumuladas (UTA), no se ha podido ejecutar a la fecha del presente informe.

Como se indicó previamente, el ingreso tardío del grupo de peces actualmente bajo estudio, se debió a los problemas de disponibilidad de agua dulce en cantidad y calidad, necesaria para la primera etapa de los estudios, y que obedece a las condiciones de disminución general de los acuíferos subterráneos de la Isla de Chiloé, donde se ubica el Centro Experimental Hueihue, lugar donde se desarrollan las actividades.

Tal como se indicó en la sección de metodología, los resultados del análisis de curva de mortalidad y el consecuente término de la evaluación de eficacia de los 4 productos biológicos sometidos a prueba, podrán ser presentados en la siguiente etapa del programa y que se encuentra en ejecución para el periodo 2016-2017.



6. DISCUSIÓN

La vacunación es uno de los métodos más importantes y eficaces de intervención utilizados en la prevención de enfermedades infecciosas en la acuicultura. Las vacunas confieren una protección específica duradera y reducen significativamente la necesidad de tratamientos antibióticos.

Existen varias vías para la administración de agentes inmunológicos, siendo la inyección intraperitoneal (IP) y la inmersión las más comúnmente utilizadas. El primer método tiene la ventaja de provocar una respuesta inmune fuerte y prolongada, aunque con un retraso de aproximadamente 600 UTA (unidad térmica acumulada) entre la vacunación y el inicio de la competencia inmune. Esta es la principal razón por la que en los salmónidos la vacunación IP contra patógenos relacionados con el agua de mar, como *P. salmonis*, se restringe a la fase de agua dulce, para obtener peces protegidos en engorda. Por otro lado, también presenta inconvenientes, asociados al proceso de vacunación mismo, como es el estrés impuesto a los peces debido al manejo asociado y la limitación para aplicar la vacuna en individuos pequeños (Tobar *et al.*, 2011).

Al respecto, en el presente estudio se decidió efectuar la vacunación por vía IP a peces en estado de alevín en agua dulce, con aproximadamente, unos 40 grs. de peso promedio, para luego ser esmoltificados y llevados a agua de mar. Una vez alcanzadas las 650 unidades térmicas acumuladas (UTA), se precederá a efectuar un desafío por cohabitación con una presión de infección del 33% de peces troyanos, previamente inoculados con la cepa caracterizada de *P. salmonis*.

Este modelo experimental busca imitar las condiciones reales a las que se ven expuestas las poblaciones de peces en la industria salmonicultra nacional.

Para la determinación de la dosis letal 50 del inóculo bacteriano a utilizar en los desafíos, se logró desarrollar la enfermedad, confirmada por biología molecular (PCRq), lográndose a partir de los porcentajes de mortalidad acumulada, un valor calculado de $1,67 \times 10^{5,6}$.

La determinación de la dosis letal 50, a pesar de ser una determinación simple de la toxicidad de una sustancia, ha sido ampliamente utilizada en estudios de peces. Autores como Treuquemil (2005) y Jiménez (2006) para la determinación de dosis letal 50 de *Vibrio ordalii* en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón Atlántico, utilizaron el método de Reed y Muench modificado. En el presente estudio la DL50 se calculó según el método de Reed y Muench (Jurado 1989), modificado por Jiménez (2006), en ejemplares de salmón Atlántico de 30 gramos, inoculados vía intraperitoneal y a una temperatura promedio de 15°C.

La cepa LF-89 utilizada en la determinación de la DL50, ha sido estudiada ampliamente, mostrando virulencias diferenciales con otras cepas caracterizadas como la SLGO-94 y la SLGO-95, respecto de su mortalidad en pruebas con desafíos intraperitoneales (Smith *et al.*, 1999).



Si bien todas las especies de salmónidos cultivados en Chile han demostrado susceptibilidad a Piscirickettsiosis, estudios han demostrado que el salmón coho es más susceptible que trucha arcoiris. Una dosis letal 50 de $10^{2.8}$ fue descrita originalmente para salmón coho (Garcés *et al.*, 1991).

En relación al estudio de evaluación de seguridad efectuado a cuatro productos biológicos destinados al control de la Piscirickettsiosis, se midieron adherencias (según la escala de Speilberg) y la presencia de melanosis.

En los estudios realizados por Midtlyng *et al.* 1996 y Berg *et al.*, 2006, se confirmó que vacunas con adyuvantes oleosos aumentan el riesgo de presentar lesiones en el sitio de inyección y adherencias entre los órganos internos de los peces vacunados. Además, estas lesiones persisten a través del ciclo productivo, incluso hasta la cosecha.

En un estudio realizado en Noruega en salmones del Atlántico, se determinaron que los factores más importantes en la seguridad de las vacunas fueron los grupos de peces vacunados tempranamente (etapa productiva), los peces de menor peso y las altas temperaturas en el agua, siendo los que presentaron mayores lesiones y adherencias en el sitio de inyección (Berg *et al.*, 2006).

En el presente estudio se encontraron individuos con adherencias en las cuatro vacunas, desde las dos semanas post-vacunación. En estudios realizados en Noruega con vacunas para Alphavirus (SAV) en salmón del Atlántico (*Salmo salar*), se encontraron adherencias entre 6 a 12 semanas post-vacunación, en alrededor de un 40% de los individuos vacunados (Karlsen *et al.*, 2012). En el estudio realizado por Midtlyng *et al.*, 1996, se encontraron adherencias incluso a los 6 meses posterior a la vacunación.

Los cuatro productos biológicos evaluados fueron calificados como seguros y satisfactorios, debido a que no presentaron un promedio mayor a 3 en la escala de Speilberg en cuanto a las adherencias y no presentaron signos de melanosis en el sitio de inyección.

Las diferentes respuestas de los productos evaluados, pueden ser explicadas a través de los distintos componentes de las vacunas, los cuales pueden beneficiar a una sobre otra. Por otra parte, se deben considerar otros factores que pueden influir estas diferencias, como las condiciones experimentales, el tipo de agua (dulce o mar), y principalmente el tiempo post-vacunación (UTA), entre otros.

Se espera que los resultados obtenidos constituyan un respaldo científico que permitirá a la Autoridad evaluar de mejor forma la inclusión de vacunaciones en los programas oficiales de vigilancia de enfermedades, o efectuar las modificaciones normativas requeridas para un mejor resguardo del patrimonio sanitario nacional.



7. CONCLUSIONES

- La revisión efectuada de normativas y referencias, tanto nacionales como internacionales, asociadas a productos biológicos de uso en peces de cultivo, permitió obtener valiosos antecedentes que representaron la base para la elaboración de protocolos de las pruebas de evaluación de eficacia y seguridad de vacunas.
- La normativa nacional vinculada al Servicio Agrícola y Ganadero, y que regula la temática de productos biológicos para uso animal, incluyendo la acuicultura, enmarca los requerimientos básicos solicitados a los registrantes de nuevos productos, a través de la elaboración de un instructivo y un procedimiento para generar los estudios de respaldo requeridos. No entrega una referencia específica para pruebas de seguridad y eficacia de productos biológicos para uso en peces.
- Dado que las solicitudes de registro de productos biológicos son respaldadas por estudios efectuados por los propios interesados y en sus propias instalaciones, existe un vacío de estandarización en las metodologías utilizadas, las condiciones en que se desarrollan dichos estudios y en la forma de entrega de resultados.
- La revisión de los procesos de registro de productos biológicos para animales en Estados Unidos de América y Canadá, permitió indicar que se utiliza un procedimiento similar al que se pretende establecer a nivel nacional, con un Estado que se apoya en unidades y profesionales propios para verificar lo indicado por los fabricantes y para efectuar los controles de serie una vez ya aprobado y registrado el producto.
- En el caso de las regulaciones europeas, se verificó que las entidades pertinentes entregan antecedentes detallados de las metodologías de diseño, elaboración, ejecución y entrega de resultados de pruebas de eficacia y seguridad de vacunas para peces.
- Se lograron identificar y definir los principales parámetros requeridos para la generación de protocolos estandarizados para la determinación de la DL50 y las pruebas de eficacia y seguridad de vacunas destinadas al control de *P. salmonis*.
- Se generaron los protocolos finales para la determinación de la dosis letal 50 (DL50) y para la evaluación de seguridad y eficacia de vacunas contra el *P. salmonis*, sobre la base de un protocolo estándar base elaborado por IFOP, generándose un documento de consenso con representantes de la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, Intesal de SalmonChile y académicos especializados.
- El inicio de los estudios *in vivo* utilizando una cepa viva de *P. salmonis* se realizó luego de efectuada una Auditoría de parte de dicho Servicio, a través de una especialista designada, y de la implementación de una serie de medidas complementarias de bioseguridad en el Centro de Maricultura de Hueihue, donde se desarrollarían las actividades.
- Para la determinación de la Dosis Letal 50 (DL50) del inóculo bacteriano a utilizar se logró desarrollar la enfermedad en todos los grupos desafiados, los que evidenciaron lesiones y



signos clínicos característicos asociados a la enfermedad (necropsia), los que fueron confirmados mediante diagnósticos específicos (qPCR).

- Se logró determinar la dosis letal 50 (DL50), a partir de los porcentajes de mortalidad acumulada, con un valor calculado para el aislado bacteriano de $1,67 \times 10^{5,6}$.
- Se efectuó la prueba de seguridad para los cuatro productos biológicos destinados al control de Piscirickettsiosis priorizados.
- Al respecto no se evidenció mortalidad atribuible a los productos utilizados, tanto para las cuatro vacunas como para el grupo control (Hank's).
- Los cuatro productos biológicos evaluados fueron calificados como seguros y satisfactorios, debido a que no presentaron un promedio mayor a 3 en la escala de Speilberg en cuanto a las adherencias y no presentaron signos de melanosis en el sitio de inyección.
- Con el propósito de comprobar las diferencias entre vacunas respecto a la prueba de seguridad, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), resultando con diferencias significativas la vacuna 2 con respecto a las vacunas 1, 3 y 4, siendo el primer producto (vacuna 2) el de mejor desempeño respecto de generar los menores efectos secundarios en los peces vacunados.
- La evaluación de eficacia se encuentra en desarrollo a la fecha del presente informe, considerando que los grupos experimentales de peces no han alcanzado las Unidades Térmicas Acumuladas establecidas en el protocolo respectivo (650UTA).
- Esta situación se debe a la importante disminución de las fuentes de agua dulce del Centro Experimental Hueihue donde se desarrollan los estudios, durante gran parte del año 2016 y posteriormente, a la mala calidad del afluente contaminado con Fierro, imposibilitando la mantención de peces (ambas situaciones resueltas a la fecha).
- Los resultados obtenidos a la fecha representan una novedosa aproximación a la evaluación de productos destinados a control de *P. salmonis* a nivel internacional.
- Los resultados y antecedentes entregados a través del presente programa de investigación, debiesen ser un elemento importante al momento de evaluar la inclusión de modelos de vacunación obligatorios en los programas sanitarios oficiales de la industria, o para respaldar modificaciones a los mismos, de forma de resguardar de la mejor forma el patrimonio sanitario nacional.



8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berg A., O. Magne Rodseth, A. Tangeras, T. Hansen. 2006. Time of vaccination influences development of adhesions, growth and spinal deformities in Atlantic salmo (*Salmo salar*). *Dis Aquat Org* 69: 239-248.
- European Food Safety Authority. 2015. Annual Report 2014. In: <https://www.efsa.europa.eu/en/corporate/pub/ar14>.
- Garcés L.H., Larenas J.J., Smith P.A., Sandino S., Lannan C.N. & Fryer J.L. 1991. Infectivity of a rickettsia isolated from Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Diseases of Aquatic Organisms* 11, 93–97.
- Gomez, F.A., Tobar, J.A., Henríquez, V., Sola, M., Altamirano, C., and Marshall, S.H. 2013. *Piscirickettsia salmonis*.
- Gudding R and Van Muiswinkel WB. 2013. A history of fish vaccination: science-based disease prevention in aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* Dec;35(6):1683-8. doi: 10.1016/j.fsi.2013.09.031. Epub 2013 Oct 5.
- Hubert, J. 1984. Spearman-Kärber method. *Bioassay*, p. 65-66; 2nd ed., Hunt Publishing, Dubuque, Iowa, 1984..
- Henríquez, M., González, E., Marshall, S.H., Henríquez, V., Gómez, F.A., Martínez, I., et al. 2013. A novel liquid medium for the efficient growth of the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* and optimization of culture conditions. *PLoS one* 8(9), e71830.
- Jiménez L. 2006. Determinación de la dosis letal 50 (DL50) de una cepa nacional de *Vibrio ordalii* en Trucha Arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Memoria de titulación, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- Jurado R. 1989. Concepto de Toxicidad Aguda, Crónica y Remota. Metodología de la Determinación de la DL50. En Jurado R (ed). *Toxicología Veterinaria*. 2º edición. Salvat editores S.A. Pp 40-45. Jurado 1989.
- Karlsen M., T. Tingbø, I. Solbakk, Ø. Evensen, A. Furevik, A. Aas-Eng. 2012. Efficacy and safety of an inactivated vaccine against salmonid alphavirus (family *Togaviridae*). *Vaccine* 30:5688-5694.
- Ross, L.G. and Ross, B. 2008 . *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals* Edited by Lindsay G. Ross and Barbara Ross. ISBN: 978-1-4051-4938-9.



- Mittlyng PJ. 1996. A field study on intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish Shell Immunol* 6: 553-565.
- Servicio Agrícola y Ganadero. 2016. Listado de productos biológicos inmunológicos con registro provisional para uso en salmónidos. Septiembre de 2016. En: <http://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/registro-provisional-de-productos-inmunologicos-de-uso-en-salmonidos>.
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. 2012. Programa Específico de Vigilancia y Control de Piscirickettsiosis. Resolución Exenta N°3.174. Diciembre 2012.
- Servicio Nacional de Pesca. 2016. Informe sobre uso de Antimicrobianos en la Salmonicultura Nacional. 2015. Subdirección de Acuicultura, Unidad de Salud Animal.
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. 2016. Informe Sanitario de Salmonicultura en Centros Marinos, 2015. Subdirección de Acuicultura, Unidad de Salud Animal.
- Smith P.A., Pizarro P., Ojeda P., Contreras J., Oyanedel S. & Larenas J. 1999. Routes of entry of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms* 37, 165–172.
- Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. 2016. Reporte Anual 2015.
- Tobar J., S. Jerez, M. Caruffo, C. Bravo, F. Contreras, S. Bucarey, M. Harel. 2011. Oral vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar*) against salmonid rickettsial septicaemia. *Vaccine* 29: 2336-2340.
- Treuquemil C.S. 2005. Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50) de una cepa nacional de *Vibrio ordalii* en salmón del Atlántico (*Salmo salar*). Memoria de titulación, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- World Bank. 2014. "Reducing disease risk in aquaculture". Agriculture and Environmental Services Discussion Paper 09. World Bank report number 88257-GLB.

A N E X O S



INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

Sección Ediciones y Producción
Almte. Manuel Blanco Encalada 839,
Fono 56-32-2151500
Valparaíso, Chile
www.ifop.cl



www.ifop.cl