



LABD/NT6/FEBRERO 2022

Programa Sanitario General para la Vigilancia de la Sensibilidad a Antiparasitarios en la Salmonicultura

NORMA TÉCNICA

Nº6

PROTOCOLO DE BIOENSAYO SIMPLICADO DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIPARASITARIOS PARA *Caligus rogercresseyi*

Departamento De Salud Animal
Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura
Chile

INDICE

<u>INDICE</u>	<u>2</u>
<u>I. Objetivo</u>	<u>3</u>
<u>II. Alcance</u>	<u>3</u>
<u>III. Pruebas diagnósticas</u>	<u>3</u>
1. Materiales de manejo de los parásitos y ejecución del bioensayo (lista de chequeo)	3
2. Materiales de preparación de diluciones	4
3. Procedimiento	5
<u>IV. Referencias:</u>	<u>15</u>
<u>V. Anexos: Registro de resultados de bioensayos</u>	<u>16</u>

I. Objetivo.

Establecer los procedimientos que permiten la ejecución de bioensayos simplificados de evaluación de susceptibilidad de *Caligus rogercresseyi* a antiparasitarios.

II. Alcance.

Las condiciones técnicas y procedimientos estandarizados que se establecen en el presente documento, serán aplicables a los centros de cultivo de salmónidos y al laboratorio de diagnóstico del Intituto de Fomento Pesquero (IFOP) que realizara la evaluación de la sensibilidad farmacológica de *Caligus rogercresseyi* a tres fármacos específicos: azametifos, deltametrina y cipermetrina, a través de bioensayo simplificado, exigido por el Programa Sanitario Específico de Control y Vigilancia de Caligidosis, según lo establecido en conformidad con el D.S. Nº 319, de 2001, del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, actualmente Ministerio de Economía, Fomento y Turismo.

III. Pruebas diagnósticas.

1. Materiales de manejo de los parásitos y ejecución del bioensayo (lista de chequeo)

- 10 pinzas punta curva etiquetadas según corresponda)
- 30 placas Petri marcadas según corresponda.
- 10 tamices de 190 μm o coladores comunes etiquetados según corresponda
- 4 vasos precipitados de 0.5 o 1 litro etiquetados según corresponda (recipiente de eliminación de residuos)
- 10 vasos precipitados 50 ml
- Pissetas (3 al menos)
- 1 temporizador
- 1 termómetro ambiental
- 1 cooler
- Gel packs
- Papel absorbente
- 5 litros de agua de mar filtrada

- Lupa estereoscópica.
- Bitácora de bioensayo
- Planilla de registro de resultados

2. Materiales de preparación de diluciones

- Producto antiparasitario a analizar con los principios activos azametifos, cipermetrina y deltametrina.
- Balanza analítica (precisión 0,001 gr)
- Papel aluminio cortados en pequeños trozos cuadrados para el pesaje de antiparasitarios .
- 3 espátulas punta pequeña (1 por cada antiparasitario)
- Etanol o metanol (según corresponda)
- Matraces aforados o botellas (tipo schott) para la preparación de solución stock, siendo: 1 de 50 ml, 1 de 500 ml y 1 de litro.
- 10 matraces aforados o botellas de 1 litro (tipo schott) (gradiente de concentración)
- 1 pipeta automática de 1 ml (para antiparasitarios líquidos).
- 1 pipeta automática de 10 ml
- Puntas desechables pipeta 1 ml (antiparasitarios líquidos)
- Puntas desechables pipeta 10 ml
- 1 probeta graduada 100 ml (azametifos)
- 2 probetas graduadas de 500 ml (1 por piretroides)
- 1 probeta graduada 1 litro (volumen de agua de mar)
- Papel absorbente
- Bidón para eliminación de residuos
- 6 litros de agua de mar filtrada y estéril

3. Procedimiento

- 3.1. Para la ejecución de los bioensayos simplificados es relevante determinar por una parte la condición de los parásitos, y por otra, el número de parásito. Considerar un mínimo de 300 parásitos en buena condición para la realización del bioensayo (3 compuestos antiparasitarios: azametifos, deltametrina, y cipermetrina).
- 3.2. Todo el material utilizado para la ejecución del bioensayo, debe encontrarse limpio y previamente etiquetado con el código de identificación de la concentración y réplica correspondiente.
- 3.3. Etiquetar con rotulador permanente las pinzas punta curva, tamices, vasos precipitados de 50 ml, matraces o botellas para el gradiente de concentración, acuerdo a: control (3 unidades), azametifos (2 unidades, 1 por concentración), cipermetrina (2 unidades, 1 por concentración) y deltametrina (3 unidades, 1 por concentración). El marcaje de las placas Petri será asignando un control, concentraciones y réplicas para cada antiparasitario. El marcaje de los vasos precipitados designados para la eliminación de residuos será uno como control y uno para cada antiparasitario. Este paso lo realizará cada vez que utilice material nuevo.
- 3.4. Registrar cada actividad en la bitácora de bioensayos, indicando la fecha, hora, personal, peso del compuesto, temperatura durante la ejecución del bioensayo, antiparasitario, inicio y término de preparación de gradiente de diluciones, cronología de exposición a concentraciones, información relacionada al parásito (origen). En caso que el laboratorio cuente con registros asociados a sistema de gestión de calidad, podrá utilizar aquellos para el registro y trazabilidad de los bioensayos.
- 3.5. Este protocolo considera la preparación de las diluciones requeridas para la exposición de los parásitos, considerando un control (agua de mar) y dos concentraciones para azametifos y tres en el caso de deltametrina.
- 3.6. Previo a la preparación de las diluciones, pesar aquellos productos con presentación en polvo o gel utilizando una balanza analítica (0,001 gramos de precisión). Registrar en bitácora el peso y hora de pesaje. Para el caso de aquellos antiparasitarios en presentación líquida se deberá utilizar la micro pipeta de 1 ml.

3.7. Las diluciones se realizarán de acuerdo a las siguientes indicaciones, pudiendo adaptar las fórmulas matemáticas según se requiera. Se pueden utilizar los antiparasitarios en presentación estándar o comercial. En ambos casos se deberá calcular la cantidad de producto a utilizar de acuerdo a la presentación del mismo.

a) Azametifos: La presentación del producto comercial es al 50%, lo que indica que, por cada 1 gramo de producto comercial, hay 500 mg de azametifos. De esta forma, para la preparación de la solución stock se debe incorporar 5 mg de azametifos en 15 ml de etanol absoluto, para alcanzar una concentración de 333 ppm (ó 0.333 mg/ml), de acuerdo a la razón “1 gramo contiene 500 mg, como 5 mg están contenidos en X gramos”, o siguiendo la fórmula::

$$x = \frac{1gr \times 5mg}{500mg}$$

$$x = 0,01 gr = 10mg$$

Como resultado se obtiene que se deben pesar 10 mg de azametifos 50% o producto comercial, como se detalla en la **Tabla 1**. Para el caso de la presentación estándar, se deberá pesar 5 mg, ya que el producto se encuentra prácticamente puro.

Tabla 1. Pauta de dilución para el antiparasitario comercial conteniendo Azametifos.

Producto	Solución Stock		Solución de trabajo (Sol. T)		Diluciones		
	Conc. (ppm)	Preparación	Conc. (ppm)	Preparación	Conc. (ppb)	Sol. Trabajo (ml)	Agua de mar (ml)
Azametifos 50%	333	10 mg de producto + 15 ml etanol	1.0	3 ml sol. Stock + 997 ml de agua de mar	0	0	1000
					10	10	990
					100	100	900

b) Cipermetrina estándar: El producto cipermetrina estándar (no comercial) indica pureza cercana al 99%, lo que indica que por cada 100 miligramos de producto estándar hay 99 mg de cipermetrina. Debido a esto se considera prácticamente puro, debiendo utilizar 1 mg del compuesto estándar. La solución stock correspondiente a este producto debe alcanzar una concentración de 5 ppm, lo que es equivalente a 0.005 mg/ml (1 mg de cipermetrina en 200 ml de metanol). Las diluciones se detallan a continuación en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Pauta de dilución para el antiparasitario estándar conteniendo Cipermetrina.

Producto	Solución Stock		Solución de trabajo (Sol. T)		Diluciones		
	Conc. (ppm)	Preparación	Conc. (ppm)	Preparación	Conc. (ppb)	Sol. Trabajo (ml)	Agua de mar (ml)
Cipermetrina estándar	5	1 mg producto + 200 ml de	0.05	10 ml stock + 990 ml agua de mar	0	0	1000
					1.5	30	970
					15	300	700

c) Deltametrina comercial: La solución stock correspondiente a este producto debe alcanzar una concentración de 1 ppm, lo que es equivalente a 0.001 mg/ml. El producto comercial se encuentra al 1% en formato líquido, el cual indica que por cada 1 miligramo de producto comercial hay 10 mg de deltametrina (equivalente a 10000 ppm), se debe utilizar la siguiente fórmula:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

Calculando:

$$x = \frac{1\text{ppm} \times 1000\text{ml}}{10000\text{ppm}}$$

$$x = 0,1 \text{ ml} = 100\mu\text{l}$$

Como resultado se obtiene que se deben medir 100 µl de deltametrina 1% o deltametrina comercial, como se detalla en la **Tabla 3**, junto a las diluciones posteriores:

Tabla 3. Pauta de dilución para el antiparasitario comercial conteniendo Deltametrina.

Producto	Solución Stock		Solución de trabajo (Sol. T)		Diluciones		
	Conc. (ppm)	Preparación	Conc. (ppm)	Preparación	Conc. (ppb)	Sol. Trabajo (ml)	Agua de mar (ml)
Deltametrina 1%	1	100 µl producto + 999.9 ml de agua de mar	0.1	100 ml stock + 900 ml de agua de mar	0	0	1000
					1	10	990
					3	30	970
					40	400	600

d) Deltametrina estándar: El producto deltametrina estándar se encuentra en formato sólido o polvo, con una pureza de 99.7% o muy cercana a este valor, señalando que por cada 250 mg de producto estándar hay 249.25 mg de deltametrina, debiendo calcular:

$$x = \frac{250mg \times 1mg}{249.25mg}$$

$$x = 1 mg$$

Como resultado se obtiene que se debe pesar 1 mg de deltametrina estándar para alcanzar una concentración de 10 ppm para la solución stock (equivalente a 0.01mg/ml), siendo 1 mg deltametrina estándar en 100 ml de etanol, como se detalla en la **Tabla 4**, junto a las diluciones posteriores:

Tabla 4. Pauta de dilución para el antiparasitario estándar conteniendo Deltametrina.

Producto	Solución Stock		Solución de trabajo (Sol. T)		Diluciones		
	Conc. (ppm)	Preparación	Conc. (ppm)	Preparación	Conc. (ppb)	Sol. Trabajo (ml)	ml Agua
Deltametrina 99.7%	10	1 mg producto + 100 ml de etanol	0.1	10 ml stock + 990 ml de agua de mar	0	0	1000
					1	10	990
					3	30	970
					40	400	600

El presente protocolo no considera el uso de control reactivo (etanol o metanol), decisión basada en información empírica recabada por el Instituto de Fomento Pesquero que indica no afectación de los parásitos a los volúmenes de etanol diluidos utilizados (32 bioensayos a la fecha).

- 3.8. Para la preparación de las soluciones stock, , agregue el antiparasitario pesado en el matraz aforado o botella y agregue el volumen de agua de mar indicado medido o afore, según corresponda. Para la deltametrina comercial, agregue un pequeño volumen de agua de mar, luego incorpore el volumen de deltametrina comercial, y posteriormente afore o complete con agua de mar, según corresponda. Esta recomendación evita que se generen burbujas que perjudiquen el proceso.
- 3.9. Para la solución de trabajo, incorpore la solución stock y posteriormente afore o agregue el volumen de agua de mar medido.
- 3.10. Para la preparación del gradiente de concentración simplificado considere lo siguiente: agregue el volumen de solución de trabajo en el matraz o botella identificada y agregue el volumen de agua de mar medido o afore según corresponda.
- 3.11. Agite todas las diluciones inmediatamente al término de su preparación (asegurando que no queden residuos del producto), como también, justo antes de la exposición de los parásitos. El tiempo entre la preparación y uso de las diluciones no debe exceder las 2 horas desde su preparación.

- 3.12. La exposición debe ser idealmente en forma simultánea de todos los tratamientos. En su defecto se deberá realizar la exposición en forma secuencial y mantener este patrón inclusive hasta el momento de la lectura, el cual deberá quedar registrado en la planilla de bioensayo. Los tiempos de exposición serán los siguientes: Azametifos: 60 minutos; Cipermetrina: 30 minutos y Deltametrina: 40 minutos.
- 3.13. Utilice individuos saludables en el estadio de desarrollo de adultos móviles (machos y hembras ovígeras (HO) o hembras sin sacos ovígeros (HSS)). Éstos deben tener aproximadamente el mismo tamaño. El tiempo entre la extracción y la exposición de los parásitos en el bioensayo debe encontrarse en un rango de 6 a 24 horas (que dependerá de la distancia entre el origen y el laboratorio). Registrar en observaciones el tiempo de espera previo al bioensayo
- 3.14. Se requerirán al menos 90 parásitos para los antiparasitarios: azametifos y cipermetrina (45 hembras ovígeras o hembras sin sacos y 45 machos por cada antiparasitario) y 120 parásitos para deltametrina (60 HO o HSS y 60 machos). Se debe asegurar un número de individuos mayor al mínimo requerido para cada bioensayo, que permita el descarte de individuos en mala condición.
- 3.15. Ubique las placas Petri en una superficie de color blanco, idealmente, que facilite la observación de los parásitos. Verifique la condición del parásito, la cual debe ser buena u observarse saludables (parásitos evidentemente activos). Puede usar como criterio de selección, aquellos acordes a la categoría “vivo” especificado en el punto 3.26.
- 3.16. Agregue 2 gotas pequeñas (~1ml) y separadas en las placas Petri. Incorpore 5 machos en una gota y 5 hembras en otra gota, tomándolos delicadamente y sin apretarlos. En caso que no se pueda mantener la proporción sexual, se deberá aplicar la proporción que mejor refleje la disponibilidad de machos y hembras en la muestra. Verifique que se haya agregado el número de parásitos correspondiente (10 totales por placa Petri).
- 3.17. Posteriormente, retirar el exceso de agua utilizando papel absorbente y justo antes de incorporar la dilución correspondiente. Tome precaución de no arrastrar a los parásitos con el papel.
- 3.18. Agregue 40 ml de la dilución (previamente agitada) a las placas según corresponda, e inmediatamente realice una nueva y rápida inspección de los individuos para corroborar su estado y número. En caso que observe algún individuo en mala condición, puede reemplazarlo dentro del primer minuto de exposición. Posterior a

este tiempo, ya no es posible reemplazarlo y deberá anotarlo en la planilla de registro para su exclusión del análisis.

- 3.19. Una vez transcurrido el tiempo de exposición, filtre los parásitos expuestos a través del colador identificado y correspondiente a la concentración, dejando caer el agua en un vaso precipitado designado para la eliminación de residuos. Lave los parásitos en la placa Petri y el colador con agua de mar utilizando una piseta, 3 veces cada implemento.
- 3.20. Después con extremo cuidado, incorpore en la placa Petri correspondiente aquellos parásitos retenidos en el colador. Verifique que todos los parásitos fueron devueltos a la placa Petri antes de continuar con el siguiente lavado.
- 3.21. Agregue lo más pronto posible 40 ml agua de mar filtrada, incorpore la tapa de la placa Petri, y deje reposar en la incubadora a condiciones controladas de temperatura (12°C) y luminosidad (12:12 luz/oscuridad) por un periodo de 24 horas hasta la evaluación de los parásitos (lectura). Opcionalmente y si lo requiere puede extender el reposo hasta 48 horas (junto con una lectura), pero no constituye una obligación de este protocolo.
- 3.22. Previo al siguiente lavado, debe eliminar los residuos del vaso precipitado de eliminación de residuos.
- 3.23. Repita los pasos 3.16 hasta el 3.22 para todas las concentraciones por antiparasitario.
- 3.24. Los residuos de la exposición de los parásitos y diluciones restantes deberán ser depositado en un bidón designado para tal propósito, identificado con el antiparasitario eliminado (no elimine ninguna preparación por el desagüe y alcantarillado de la ciudad).
- 3.25. Se deberá mantener una temperatura aproximada de 12°C durante el bioensayo y el periodo posterior y previo a la lectura (incubación). Durante la ejecución del bioensayo se debe registrar la temperatura ambiental y del agua.
- 3.26. A las 24 horas post exposición, realice la evaluación de la condición de los parásitos o lectura. Se puede realizar una lectura adicional a las 48 horas si es requerido (opcional). Para realizar la lectura se utilizará el criterio propuesto por SEARCH (2006) modificado por IFOP que describe las siguientes categorías:

- **Vivo:** Comportamiento normal que se describe como nado activo y en línea recta, que posee movimientos vigorosos, rápidos y energéticos. No hay dudas en su condición.
 - **Moribundo:** La actividad de nado no es normal, es errático y letárgico. En los individuos, no se observa nado, pero posee movimientos en el tracto intestinal y apéndices en el cefalotórax (principalmente) que son posibles de observar a la lupa. Puede que el individuo tenga capacidad de nado, pero al término del movimiento no es capaz de fijarse, quedando sobre el dorso del cefalotórax. Todos los piojos que poseen movimiento alguno, pero que no puede ser clasificado como normal, pertenecen a esta categoría.
 - **Muerto:** El piojo no posee movimientos, ni en las extremidades, como tampoco en el tracto digestivo o algún otro órgano, después de tocarlos ligeramente con la pinza. No hay dudas de su condición.
- 3.27. Anote los resultados de parásitos vivos, moribundos y muertos en un registro o planilla de resultados. Opcionalmente puede utilizar la planilla tipo de bioensayos propuesta en este documento. Además, se recomienda llevar una bitácora de bioensayos (libro) en el cual se registren parámetros y características adicionales y asociadas al bioensayo. En caso de no utilizar la planilla facilitada, la planilla deberá contar como mínimo con los siguientes datos: fecha, nombre del bioensayo, principio activo, observadores, origen, tiempo de lectura, réplica, concentración (ppb), horas de inicio y término de la exposición, categoría de vivo, moribundo y muerto, género (macho o hembra). Para el registro de la información, podrá usar registros o planillas pertenecientes al sistema de gestión de calidad de su laboratorio.
- 3.28. Una vez terminadas las lecturas, los parásitos pueden ser descartados o preservados si lo requiere. Lave el material utilizado de acuerdo a los protocolos de lavado internos de su laboratorio. Procure terminar el lavado de los materiales utilizando etanol. Deje secar para el próximo bioensayo.

4 Análisis de la información y reporte

- 4.1. Revise los resultados del grupo control de cada bioensayo, de modo de identificar aquellos que presenten una mortalidad mayor al 20% de los individuos (recordar que el grupo control es aquel en que los individuos fueron expuestos solo a agua de mar). Si la mortalidad supera el 20% de los individuos, deberá eliminar los datos correspondientes a ese bioensayo y repetir el análisis.
- 4.2. Utilice el paquete estadístico que tenga a su disposición o estime conveniente.
- 4.3. Previo a la realización del análisis, debe realizar una comprobación de igualdad de réplicas. Puede realizar el análisis mediante la herramienta estadística disponible en su paquete estadístico, siempre y cuando procure la comparación entre réplicas para cada concentración. Opcionalmente puede realizar este análisis utilizando los datos categóricos y mediante el estadístico de comparación chi-cuadrado, considerando un $p < 0.05$ para el rechazo de la igualdad de réplicas.
- 4.4. En caso de falta de replicación en alguna de las concentraciones, deberá evaluar posibles factores que hayan inducido esta condición (pudiendo descartar del análisis aquella réplica distinta, siempre y cuando se conozca la razón del fallo y sea justificada). Si todas las réplicas presentan diferencias estadísticas, debe incluirlas en el análisis, siempre y cuando estas diferencias ocurran solo en una concentración. En caso contrario, se deberá descartar el bioensayo.
- 4.5. Para cada antiparasitario, calcule el porcentaje de parásitos afectados (moribundos + muertos), como también, solo muertos a cada concentración utilizada. Calcule los intervalos de confianza al 95% (IC95%) para cada porcentaje. Por otra parte, se deberá graficar los porcentajes de afectados y muertos obtenidos para las concentraciones especificadas.
- 4.6. Utilice el “Criterio de susceptibilidad” integrado y modificado por IFOP que contrasta los porcentajes obtenidos a las concentraciones evaluadas, contraste con el umbral de 80% a la dosis recomendada o terapéutica, y el criterio SEARCH (2006) descrito en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Criterio de sensibilidad a antiparasitarios propuesta por SEARCH (2006).

Afectados, concentración baja	Afectados, concentración alta	Categoría resultante
Más del 50%	Más del 50%	Susceptible
Menos del 50%	Más del 50%	Moderadamente Susceptible
Menos del 50%	Menos del 50%	Resistente

4.7. Para el diagnóstico de la variante evaluada se deberá considerar las siguientes preguntas y para las cuales se les asignará una respuesta positiva (si) o negativa (no):

1. ¿El intervalo de confianza superior de los afectados (moribundos + muertos) a la dosis terapéutica, es superior al 80%?,
2. ¿El intervalo de confianza superior de los muertos a la dosis terapéutica, es superior al 80%?
3. ¿Cuál es la categoría resultante bajo el criterio SEARCH (susceptible, moderadamente susceptible, no susceptible)?

4.8. Sume 1 punto para cada respuesta positiva, y analice la información de acuerdo a lo siguientes criterios:

- **Variante susceptible:** si obtiene 1 o 2 respuestas positivas y categoría SEARCH susceptible, o en casos en que observe 2 respuestas positivas y categoría SEARCH moderadamente susceptible.
- **Variante moderadamente:** cuando observe 0 o 1 respuesta positiva y categoría SEARCH moderadamente susceptible, o en casos en que observe 0 respuesta positiva, pero categoría SEARCH susceptible.
- **Variante no susceptible:** cuando observe 0 o 1 respuesta positiva y categoría SEARCH no susceptible, o en casos en que observe solo respuestas negativas, pero categoría moderadamente susceptible.

4.9. La categoría por antiparasitario deberá reportarla en el formato de informe correspondiente.

IV. Referencias:

- Gonzalez Gomez, M.P., 2021. Informe Final: Vigilancia de la resistencia de *Caligus rogercresseyi* a antiparasitarios aplicados en la salmonicultura nacional (Etapa IV). Instituto de Fomento Pesquero. Puerto Montt, Chile.
- González Gómez, M.P., Ovalle Merino, L., 2018. Informe Final: Vigilancia de la resistencia de *Caligus rogercresseyi* a antiparasitarios aplicados en la salmonicultura nacional (Etapa I). Instituto de Fomento Pesquero, Puerto Montt, Chile.
- González Gómez, M.P., Ovalle, L., Menanteau, M., Spinetto, C., Oyarzún, R., Rivas, M., Oyarzo, C., 2019. Susceptibility of *Caligus rogercresseyi* collected from the native fish species *Eleginops maclovinus* (Cuvier) to antiparasitics applied by immersion. J Fish Dis. 42.
- Helgensen, K. & Horsberg, T. 2013. Single-dose field bioassay for sensitivity testing in sea lice, *Lepeophtheirus salmonis*: development of a rapid diagnostic tool. Journal of fish diseases, 36, 261-272.
- Marín, S. L., Ibarra, R., Medina, M. H. & Janse, P. A. 2015. Sensitivity of *Caligus rogercresseyi* (Boxshall and Bravo 2000) to pyrethroids and azamethiphos measured using bioassay tests—A large scale spatial study. Preventive Veterinary Medicine, In press.
- SEARCH 2006. SEA LICE RESISTANCE TO CHEMOTHERAPEUTANTS: A HANDBOOK IN RESISTANCE MANAGEMENT. SEARCH.
- Westcott, J. D., Stryhn, H., Burka, J. F. & Hammell, K. L. 2008. Optimization and field use of a bioassay to monitor sea lice *Lepeophtheirus salmonis* sensitivity to emamectin benzoate. Dis Aquat Organ, 79, 119-31.

