



Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

**MANUAL PARA LA REALIZACIÓN DE BIOENSAYOS DE SENSIBILIDAD DE
ADULTOS *Caligus rogercresseyi* A AZAMETIFOS, PIRETROIDES, PERÓXIDO DE
HIDRÓGENO**

Marzo 2017

**Elaborado por Sandra Marín, Colaboradora: Melinka Mancilla
Instituto de Acuicultura, Universidad Austral de Chile, Sede Puerto Montt**

Contenido

1. CONTEXTO	4
2. DISEÑO DEL BIOENSAYO	7
3. COLECCIÓN, TRANSPORTE DE PARÁSITOS E INGRESO AL LABORATORIO	8
3.1. Materiales	8
3.2. Colección.....	8
3.3. Traslado.....	9
3.4. Ingreso al laboratorio	10
4. EQUIPOS Y MATERIALES PARA LA REALIZACIÓN DEL BIOENSAYO	10
5. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES	12
5.1. Azametifos	12
5.1.1. Solución stock de 1000 ppm	13
5.1.2. Solución de trabajo 10 ppm.....	13
5.1.3. Soluciones del Bioensayo.....	13
5.2. Deltametrina.....	14
5.2.1. Solución stock de 100.000 ppb	14
5.2.2. Solución de trabajo 1.000 ppb.....	14
5.2.3. Soluciones del Bioensayo.....	15
5.3. Cipermetrina.....	15
5.3.1. Solución stock 500.000 ppb	15
5.3.2. Solución de trabajo 5.000 ppb.....	16
5.3.3. Soluciones del Bioensayo.....	16
5.4. Peróxido de Hidrógeno.....	16
5.4.1. Solución de trabajo 60.000 ppm.....	17
5.4.2. Soluciones del Bioensayo.....	17
6. BIOENSAYO	17
6.1. Selección de los parásitos para el bioensayo	18
6.2. Asignación de los parásitos a las concentraciones y réplicas	18
6.3. Exposición al antiparasitario	18
6.4. Lavado de los parásitos	19

6.5.	Incubación.....	19
7.	EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA.....	20
8.	ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	21
9.	REPORTE.....	22
10.	ANEXOS.....	23
10.1.	Anexo 1. Puntos a validar en el protocolo.....	23
10.2.	Anexo 2. Planillas para registro de información.....	25
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	28

1. CONTEXTO

Este documento contiene la primera versión del manual para la realización de bioensayos de sensibilidad de adultos *Caligus rogercresseyi* a azametifos, piretroides y peróxido de hidrógeno.

Este manual se desarrolló en respuesta a la necesidad de unificar los protocolos para la realización de los bioensayos de sensibilidad de *C. rogercresseyi* a los antiparasitarios y desinfectantes que se aplican a través de baños de los peces. Esta unificación es necesaria tanto para objetivos de monitoreo de sensibilidad como para propósitos de investigación, de manera que la información que se genere en cualquiera de los dos ámbitos pueda ser utilizada con fines de análisis de mayor escala, por ejemplo mapeos de sensibilidad, detección de poblaciones sensibles y menos sensibles fenotípicamente y genotípicamente.

El único documento formal que existe hoy para la realización de estos bioensayos es el desarrollado por investigadores del hemisferio norte para el manejo de resistencia de *Lepeophtheirus salmonis*: Sea lice resistance to chemotherapeutants: A handbook in resistance management, actualizado por última vez el año 2006. Este manual describe la metodología clásica para la realización de bioensayos de ecotoxicología en los cuales se utiliza 5 concentraciones y un control, y donde la máxima concentración utilizada en el bioensayo debe ser aquella que causa la máxima respuesta deseada (mortalidad, inmovilización) (Chapman et al., 1996). En este manual también se indica el conjunto de concentraciones a utilizar para cada antiparasitario.

A través del tiempo estos protocolos han sido adaptados por parte de los diferentes grupos de trabajo, por ejemplo en lo que se refiere a los solventes que se usan para preparar las soluciones del bioensayo, las concentraciones utilizadas, la decisión de exponer machos y hembras juntos en un bioensayo, o separados, el estado de desarrollo que se expone en el bioensayo, y el software estadístico utilizado (Whyte et al., 2013). Respecto de las concentraciones utilizadas, cabe señalar que se han ido modificando debido a los cambios en la respuesta del parásito, ya que en variadas ocasiones la máxima concentración utilizada en el bioensayo no causa el 100% de la respuesta deseada.

En la literatura científica se ha reportado una serie de dificultades para ejecutar la ejecución de los bioensayos tradicionales, parte de las cuales han promovido las adaptaciones independientes, y en otras ocasiones ha llevado al diseño de bioensayos con menor número de concentraciones. A continuación se exponen las dificultades reportadas.

- Se requiere un número grande de parásitos debido al número de concentraciones y réplicas, y en muchas ocasiones no se consigue el número requerido en los centros de cultivo (Helgesen y Horsberg, 2013; Whyte et al., 2013; Marín et al., 2015)
- El requerimiento de parásitos es mayor aún si se quisiera realizar un mapeo de sensibilidad a escalas espaciales mayores que la de centro a los diferentes antiparasitarios de manera simultánea.
- Demandan días de trabajo y personal bien calificado para su realización (Helgesen y Horsberg, 2013; Marín et al., 2015)
- Es un análisis caro (Whyte et al., 2013)

- Son altamente sensibles a las condiciones de los parásitos, la cual puede verse afectada por el traslado de éstos al laboratorio y el manejo durante el bioensayo, afectando la posibilidad de realizar el bioensayo o de obtener resultados estadísticamente significativos (Whyte et al., 2013; Marín et al. 2015).

Dado esto se han realizado bioensayos que usan solo una concentración ya sea ésta definida en base a la concentración que mejor distingue grupos sensibles y resistentes (Helgesen y Horsberg, 2013; Whyte et al., 2013), o aquella concentración recomendada por el proveedor (Marín et al., 2015).

Si bien es cierto estas aproximaciones resuelven en parte de las dificultades mencionadas anteriormente, también tienen la dificultad de que se requiere un trabajo previo para detectar las concentraciones que distinguen las poblaciones sensibles de las menos sensibles. Por otra parte, no permiten detectar el momento en el cual la sensibilidad empieza a disminuir. De acuerdo a Whyte et al. (2015) los bioensayos tradicionales son útiles y necesarios para monitorear la sensibilidad durante el inicio del uso de un antiparasitario, esto es cuando la eficacia es máxima, debido a que estos bioensayos son más sensibles para detectar pequeños cambios en la respuesta del parásito. Cuando la eficacia ya ha disminuido se postula el uso de bioensayos de una concentración.

En Chile la eficacia del azametifos y peróxido de hidrógeno para reducir las abundancias de *C. rogercresseyi*, es en general mayor del 90%, en cambio en el caso de los piretroides ésta se ha reportada disminuida, aunque existen algunas excepciones para ambos casos. Dado la alta eficacia de algunos antiparasitarios se considera necesario mantener la estimación de los parámetros de sensibilidad como EC_{50} y/o LC_{50} (concentración que afecta/inmoviliza al 50% de los individuos expuestos y concentración que mata al 50% de los individuos expuestos). Sin embargo, la literatura también reporta diferentes respuestas para machos y hembras (Wescott et al., 2008; Whyte et al., 2013; Igboeli et al. 2013; Helgesen et al., 2014; Whyte et al., 2014; Valenzuela-Muñoz et al., 2014; Chávez-Mardones et al., 2015; Marín et al., 2015; Marín et al., 2016).

Estos antecedentes plantean el desafío de adecuar el bioensayo tradicional de manera que permita estimar sensibilidad (EC_{50} y/o LC_{50}) a varios antiparasitarios de manera simultánea con un grupo de parásitos del mismo origen y separando machos y hembras. La simultaneidad y diferenciación de machos y hembras impone el desafío del manejo de numerosas unidades de bioensayo por lo cual se propone reducir de seis (bioensayos tradicionales) a cuatro el rango de concentraciones a las que se expondrán los parásitos. No obstante el cambio propuesto, el diseño sigue siendo complejo y requiere ser puesto a prueba en sus aspectos metodológicos y de análisis. Especialmente en lo que se refiere al análisis, es importante evaluar la factibilidad de estimar los parámetros de sensibilidad en base a cuatro concentraciones. Un listado de aspectos que requieren mayor análisis y validación se exponen en el Anexo 1 de este documento.

La adecuación propuesta tiene el formato de un manual en el cual se describe en detalle los procedimientos, materiales y equipos requeridos para la realización de bioensayos y obtención y análisis de los resultados.

El manual se basa en los protocolos iniciales descritos por Sevadtal y Horsberg (2003) y en *Sea lice resistance to chemotherapeutants: a handbook in resistance management* (2006),

artículos científicos publicados y la experiencia en laboratorio de los autores pero propone ciertas modificaciones.

El protocolo para cualquiera de los cuatro antiparasitarios sigue las mismas etapas y solo se diferencian en aspectos específicos. Es por esto que se ha desarrollado un protocolo único. Las diferencias entre antiparasitarios se identificarán en la etapa correspondiente.

Las etapas que conforman el bioensayo son las siguientes:

- Diseño
- Equipos y materiales
- Colección, transporte de parásitos e ingreso al laboratorio
- Preparación de las soluciones
- Bioensayo
- Evaluación de la respuesta
- Análisis de los datos
- Reporte

Este documento también contiene una sección de Anexos donde se encuentra el respaldo bibliográfico de varios de los planteamientos metodológicos y una sección de Bibliografía.

2. DISEÑO DEL BIOENSAYO

El objetivo del bioensayo es estimar los parámetros concentración efectiva 50% (EC_{50})¹ y concentración letal 50% (LC_{50})² como medida de la sensibilidad de parásitos adultos machos y hembras de la especie *Caligus rogercresseyi* a un determinado antiparasitario bajo condiciones de laboratorio.

El protocolo considera el cálculo de estos parámetros en base a un gradiente de 4 concentraciones incluyendo entre éstas el control agua de mar y la concentración recomendada para los tratamientos en centros de cultivo.

Considerando los antecedentes bibliográficos disponibles a la fecha se ha considerado importante realizar bioensayos separadamente para machos y hembras, manteniendo el número de réplicas por concentración de tres y 10 individuos por réplica.

Dado estos antecedentes el diseño contempla la exposición de 10 machos y 10 hembras separadamente por triplicado a 4 concentraciones de cada antiparasitario por el tiempo recomendado por el fabricante. Esto significa que para un antiparasitario particular se requerirían como mínimo 120 hembras y 120 machos.

Los parámetros EC_{50} y LC_{50} se estiman con las observaciones de la respuesta de los parásitos 24 h y 48 h postexposición (pe en adelante) en el caso del azametifos y piretroides. Para los bioensayos con peróxido de hidrógeno los parámetros se estiman en base a las observaciones realizadas inmediatamente pe. En todos los casos se debiera estimar los parámetros separadamente para machos y hembras y para ambos tiempos de lectura.

Toda la información relativa al bioensayo durante el día de ejecución de éste y durante la observación de la respuesta debe ser registrada en una bitácora de la siguiente forma: En manifold autocopiativo de 2 hojas, se debe registrar, con lápiz pasta azul, la fecha de la actividad la que se debe ser escrita con número del día/abreviado el mes/en número el año, por ejemplo 10.Mar.2016. En esta bitácora se debe describir en detalle toda la actividad realizada en esa fecha, con los nombres de las personas que participan en el bioensayo, o en alguna etapa de éste. Si es necesario hacer referencia a una planilla u otro protocolo debe indicarse en la bitácora. Al finalizar el procedimiento el registro debe cerrarse a través de una línea cruzada en la hoja y con nombre, apellido y firma del responsable de la ejecución del bioensayo.

¹ Por sus siglas en Inglés Effective concentration (EC)

² Por sus siglas en Inglés Lethal concentration (LC)

3. COLECCIÓN, TRANSPORTE DE PARÁSITOS E INGRESO AL LABORATORIO

3.1. Materiales

Para la colección de parásitos desde centros de cultivo o de estanques en laboratorio se requieren los mismos materiales (Tabla 1). Los materiales que se requieren para trasladarlos desde un centro de cultivo al laboratorio también se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Materiales requeridos para la colección y transporte de parásitos.

Material colección parásitos	Materiales de transporte
Anestésico	Aireación para contenedores (bomba de aireación, mangueras, piedras difusoras, pilas)
Batea	Bidón para trasladar agua extra desde el lugar de origen de los parásitos
Capa impermeable	Cooler/Hielera
Colador	Ice pack
Contenedor plástico tapa rosca adaptado para mantener sistema de aireación	Termómetro para agua
Guantes látex	
Pinzas	
Planilla recolección datos de terreno (Planilla 1) y lápiz pasta	
Tamiz para filtrar agua	

3.2. Colección

Origen de los parásitos: El origen de los parásitos adultos machos y hembras para realizar el bioensayo puede ser desde un centro de cultivo o desde una producción en laboratorio, sin embargo, cualquiera sea la fuente los parásitos debe registrarse la información del origen en una planilla *ad hoc* (Anexo 2. Planilla 1) y deberán ser extraídos desde los peces usando el mismo procedimiento.

Cálculo del número de parásitos requeridos: El número de parásitos hembra y macho se calcula en función del diseño experimental. De acuerdo a lo indicado previamente se requerirían 120 machos y 120 hembras. Sin embargo, debido a que los parásitos pueden verse afectados por el proceso de colección y traslado es conveniente coleccionar un número mayor, se sugiere el 20% más de lo requerido.

Colección desde los peces: Para coleccionar los parásitos desde los peces, éstos deben ser anestesiados individualmente en un contenedor y siguiendo las instrucciones del fabricante del producto anestésico para el volumen de agua ocupado en el contenedor de muestreo. Una vez que el pez está sin movimiento se debe realizar el siguiente procedimiento:

- Con la mano, se toma de un pez y con una pinza se extraen los parásitos de la superficie corporal del pez, apretando levemente la zona del cefalotórax o de la furca y evitando la destrucción/daño del parásito.
- Estos se deben introducir en el contenedor plástico de parásitos, con agua de mar del mismo centro de cultivo o estanque, en lo posible tamizada para extraer el máximo de residuos no deseables en el agua para el transporte (por ejemplo, 105 µm) y debe verificarse actividad natatoria inmediata. De lo contrario se deben descartar los parásitos.
- El número de parásitos por litro sugerido es 125, y además se sugiere que desde la colección se mantenga separadamente machos y hembras.
- Una vez terminada la extracción de los parásitos desde el pez, y cuando éste se haya recuperado debe devolverse a la jaula/estanque de origen.
- Temperatura, salinidad y oxígeno del agua donde se encuentran los parásitos debe ser registrada en la Planilla 1 y debe mantenerse con aireación hasta que sean utilizados los parásitos para el bioensayo
- El agua que contiene la batea de muestreo debe ser filtrada con un colador o tamiz previo a su eliminación.

La colección de los parásitos debe ser realizada por personas capacitadas para esto y con experiencia debido a que un mal manejo de los parásitos en esta etapa puede afectar el estado de éstos y en consecuencia los resultados del bioensayo.

3.3. Traslado

El traslado de los parásitos al laboratorio de bioensayo desde un centro de cultivo se realiza en los contenedores plásticos en los que fueron colectados y cada uno de ellos debe estar debidamente rotulado con fecha de colección, centro de cultivo, lugar, especie de pez desde el cual se recolectaron. Los contenedores deben ser transportados en hieleras acondicionadas para que puedan mantener la aireación constante, para que no se derrame el agua, y para compensar cambios de la temperatura.

Los siguientes cuidados deben mantenerse durante el traslado:

- Llevar agua desde el sitio de colección tamizada para reemplazar agua derramada o ajustar temperatura.
- Se debe revisar constantemente el funcionamiento de la bomba de aireación y la temperatura. La temperatura no debiera bajar ni subir por sobre 3°C respecto de la temperatura del agua desde donde fueron colectados los parásitos. En literatura³ se describe que la temperatura crítica es de 4,2°C por lo que se recomienda que la temperatura de traslado no llegue a este valor.
- Si la temperatura aumenta más allá de lo indicado se sugiere agregar un ice pack envuelto en papel o cartón evitando que este apegado al envase de traslado.
- Si bajase la temperatura por efecto del ice pack, extraerlos inmediatamente y si es necesario recambiar parte del agua.
- El contenedor con parásitos se mantiene con aireación constante.

³ Gonzales y Carvajal 2003. Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. Aquaculture 220:101-117

3.4. Ingreso al laboratorio

Una vez en el laboratorio donde se realizará el bioensayo los parásitos deben ser ingresados formalmente, lo cual significa que la persona responsable del laboratorio debe registrar los antecedentes del grupo de parásitos. La Planilla 2 (Anexo 2) contiene la información que debe ser registrada.

Parte de la información que se registra en la Planilla 2 corresponde a la condición del parásito. Las categorías y su descripción se presentan a continuación:

- Parásitos activos: Nado activo que se observa con movimiento vertical y horizontal en la columna de agua de manera sostenida. Al estimularlo con pinza responden rápidamente con natación continua en el contenedor. Al estímulo de luz se dirigen a la fuente de luz. Pueden adherirse fuertemente a las paredes de los contenedores.
- Parásitos afectados: Se refiere a parásitos (i) cuya natación es irregular y lenta, (ii) que no es capaz de adherirse a las paredes del contenedor, (iii) tiene una respuesta débil cuando es levantado con pinza desde la furca o zona entre abdomen y cefalotórax del parásito, o (iv) se observa en el fondo del contenedor sin movimiento o muy poco.

La determinación de la condición de los parásitos al momento del ingreso de éstos al laboratorio constituye el primer punto de decisión sobre si el bioensayo puede ser realizado o no. Si más del 20% de los parásitos se encuentra inactivo en el fondo del contenedor de traslado, o afectado según descripción previa, es necesario extraer una muestra y observar la respuesta del parásito a la estimulación, especialmente si la temperatura del agua al momento del ingreso está sobre 3 grados respecto de la temperatura del sitio de origen. Es muy probable que estos parásitos estén moribundos y ya no se recuperen. Dado que se ha colectado un 20% adicional de parásitos, un 20% de pérdida puede ser compensado, pero una pérdida mayor ya no será compensada por el exceso y conviene cancelar el bioensayo.

Si el 80% o más de los parásitos se encuentran activos deben ser trasladados a la cámara con control de temperatura y fotoperiodo habiendo previamente recambiado parcialmente el agua en la que venían por agua de mar fresca de características de salinidad y temperatura similar a la del sitio de origen. La cámara deberá estar programada a estas condiciones. Los parásitos deben permanecer en la cámara por 24 h antes de que se realice el bioensayo.

4. EQUIPOS Y MATERIALES PARA LA REALIZACIÓN DEL BIOENSAYO

La preparación de los equipos y materiales debe realizarse con 24 h de antelación de manera que el día del bioensayo no falte ningún material y pueda realizarse sin interrupciones.

A continuación en la Tabla 2 y 3 se presenta el listado de materiales agrupado según objetivo para el cual se requieren. En lo que respecta al material para preparar las soluciones se recomienda usar solo material de vidrio, excepto por las micropipetas cuyas puntas no son de vidrio, pero por el volumen que se maneja puede ser más recomendable su uso. La exposición de los parásitos también se debe realizar en contenedores de vidrio.

Por cada concentración a la que se expondrán los parásitos se requiere un mínimo de 300 ml. Sin embargo se ha considerado la preparación de 1 L de cada una de las soluciones para

manejar mejor el factor de dilución, la precisión del material y para tener la posibilidad de repetir un bioensayo o alguna concentración.

Debido a la adherencia de los distintos químicos a los materiales en los que se usan se recomienda marcar el material identificando el químico con el cual se usa para no usar un mismo material con distintos químicos.

Tabla 2. Listado de materiales para la preparación de las soluciones azametifos, deltametrina, cipermetrina y peróxido de hidrógeno. Agregar 3 matraces adicionales para el agua de mar que se usará en los controles.

Materiales	Azametifos	Deltametrina	Cipermetrina	Peróxido de hidrógeno
Agitador magnético, magnetos y barra de extracción	1 agitador/ 5 barras magnéticas	1 agitador/ 5 barras magnéticas	1 agitador/ 4 barras magnéticas	1 agitador/ 5 barras magnéticas
Agua de mar filtrada a 1 μm	10 L	15 L	15 L	10 L
Balanza analítica	1	--	--	--
Etiquetas y lápiz marcador permanentes	30 etiquetas/ 1 marcador	30 etiquetas/ 1 marcador	30 etiquetas/ 1 marcador	30 etiquetas/ 1 marcador
Guantes látex	1 Caja	1 Caja	1 Caja	1 Caja
Matraces volumétricos de vidrio de 1 L (tapa de vidrio)	5	5	4	5
Matraces de vidrio Erlenmeyer de 1 L	5	5	4	
Microespátula	1	--	--	--
Micropipeta 100-1000 μ	1	--	--	--
Papel aluminio y alusa plas	1	1	1	1
Pipetas graduada 10 ml	2	4	3	3
Probeta 50 ml	--	--	--	1
Probeta 100 ml	--	--	--	3
Vasos precipitados de vidrio 500 ml y 100 ml	1 c/u	1	1	--
Contenedor para almacenar residuos	1	1	1	1

Tabla 3. Listado de materiales para la realización de los bioensayos según etapa del bioensayo.

Manejo de parásitos	Bioensayo	Lectura bioensayo
Contenedores adaptados para incluir sistema de aireación	Placas Petri (50 ml)	Lupa
Pinzas	Pinzas	Planilla de registro de información
Tamices para concentrar parásitos	Laboratorio con control de temperatura	Laboratorio con control de temperatura
Agua de mar filtrada a 1 μm y a la misma temperatura a la que han sido mantenidos los parásitos	Cámara con control de temperatura y fotoperiodo	Papel absorbente
Piceta	Tamices para lavar parásitos	Agua de mar filtrada a 1 μm
	Papel absorbente	Piceta
	Etiquetas	
	Contenedor para recoger agua del lavado de parásitos después de la exposición	
	Bidón de almacenamiento de residuos debidamente rotulado	
	Cronómetro	
	Piceta	

5. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES

Esta actividad da inicio al bioensayo propiamente tal y en consecuencia se inicia con el registro en la bitácora de la fecha, hora de inicio y objetivo de la actividad.

A continuación, se presenta un procedimiento para preparar las soluciones de cada uno de los antiparasitarios y ha tenido en consideración usar material que permita disminuir el error asociado al instrumento y al factor de dilución respecto de los volúmenes de la solución que se necesitan para un bioensayo y la concentración del principio activo, en el caso en que se use un producto comercial. Sin embargo, es un procedimiento que cada laboratorio puede ajustar.

El agua de mar a utilizar en los controles debe ser mantenida en los mismos matraces que las soluciones a las que se expondrán los parásitos y mantenidas de la misma forma durante el procedimiento.

5.1. Azametifos

En el caso de azametifos, el producto comercial está preparado al 50% w/w y la concentración recomendada del producto comercial es de 200 ppb, por lo cual la concentración de principio activo es 100 ppb.

El procedimiento consiste en preparar una solución stock de 1.000 ppm, una solución de trabajo de 10 ppm y las soluciones del bioensayo: 1, 10, 100 ppb

5.1.1. Solución stock de 1000 ppm

Pesar 1 g del producto comercial azametifos 50% peso/peso en una balanza de precisión previamente tarada (4 decimales) en un vaso precipitado de 100 ml cubierto de alúmina foil. Agregar agua destilada al vaso precipitado para disolver el polvo y agítelo suavemente.

Agregar 200 ml de agua destilada a un matraz volumétrico de 1 L y agregue el contenido del matraz de 100 ml. Agregue nuevamente agua destilada al vaso precipitado de 100 ml agite suavemente y traslade el contenido al matraz aforado. Repita este procedimiento hasta que no quede contenido sólido en el vaso precipitado de 100 ml.

Sin haber aún completado el volumen del matraz volumétrico agitar manualmente 20 veces.

Agregar el volumen de agua destilada requerida para completar el volumen del matraz volumétrico (1 L) y agitar manualmente por 20 veces más.

Todas las pipetas, probetas y buretas que se utilicen para preparar soluciones deben ser cebadas al menos 2 veces.

5.1.2. Solución de trabajo 10 ppm

Añadir 200 ml de agua de mar filtrada 1 μ m y desinfectada con UV a un matraz volumétrico de 1 L

Medir 10 ml de la solución stock usando una pipeta graduada de 10 ml y llevar al matraz volumétrico de 1 L y agitar manualmente la solución 20 veces.

Añadir 500 ml de agua de mar, continuar agitando manualmente 20 veces y posteriormente completar el volumen faltante para llegar a 1 L y agitar manualmente la solución por 20 veces.

5.1.3. Soluciones del Bioensayo.

Las 3 concentraciones se prepararán de acuerdo a la Tabla 4 y usando material volumétrico (matraces aforados de 1 L) para aforar a 1 L una vez añadido el volumen de la solución de trabajo. Se recomienda añadir el agua de mar al matraz aforado al menos en dos partes agitando manualmente por 20 veces cada vez que se añade el agua. Si la solución es jabonosa, agregar volumen de agua hasta muy cerca del aforo del matraz y agitar, y luego aforar a 1 L para volver a agitar ya que las burbujas impiden aforar apropiadamente.

Tabla 4. Soluciones de azametifos que se prepararán asociadas a los volúmenes de solución de trabajo que se requieren y el instrumento sugerido para obtener el volumen desde la solución de trabajo.

Concentración (ppb)	Volumen solución (ml)	Volumen desde solución trabajo (ml)	Instrumento sugerido
0	1.000	0	
1	1.000	0.1	Micropipeta
10	1.000	1	Micropipeta
100	1.000	10	Pipeta graduada de 10 ml

Una vez preparadas las soluciones los matraces deben ser cubiertos con papel aluminio mientras se preparan las cápsulas Petri con los parásitos y antes ser transferidas a las cápsulas Petri se deberán agitar manualmente nuevamente.

También podría trasvasijarse la solución a un matraz Erlenmeyer de 1 L, cubrir completamente el matraz con papel aluminio y rotular con una etiqueta indicando nombre del producto/químico y la concentración, agregar un magnético y dejar en agitación por 5 minutos.

5.2. Deltametrina

En el caso de deltametrina, el producto comercial está preparado al 1% (1 ml de solución contiene 10 mg de principio activo). La concentración recomendada varía según el fabricante. El producto AMX indica que se debe usar una concentración de 2 a 3 ppb y un tiempo de exposición de 30 a 40 min y Deltametrina de FAV indica que se debe usar una concentración de 3 ppb y un tiempo de exposición de 40 min. A continuación, se presenta el procedimiento que incluye la concentración de 3 ppb. El procedimiento consiste en preparar una solución stock de 100.000 ppb, una solución de trabajo de 1.000 ppb y a partir de ésta las soluciones del bioensayo: 0.3, 3 y 6 ppb

5.2.1. Solución stock de 100.000 ppb

Medir 10 ml del producto comercial con una pipeta graduada y agregarlo a un matraz volumétrico de 1 L al que se la agregado previamente 950 ml de agua de mar filtrada 1 μ m y desinfectada con UV.

Aforar con agua de mar filtrada 1 μ m el matraz volumétrico y agitar manualmente 20 veces.

5.2.2. Solución de trabajo 1.000 ppb

Añadir 950 ml de agua de mar filtrada 1 μ m y desinfectada con UV a un matraz volumétrico de 1 L.

Medir 10 ml de la solución stock usando una pipeta del 10 ml y llevarla al matraz volumétrico de 1 L.

Aforar con agua de mar filtrada 1 μ m el matraz volumétrico y agitar manualmente 20 veces.

5.2.3. Soluciones del Bioensayo.

Las 3 concentraciones se prepararán de acuerdo a la Tabla 5 y usando material volumétrico (matraces aforados de 1 L) para aforar a 1 L una vez añadido el volumen de la solución de trabajo.

Tabla 5. Soluciones de deltametrina que se prepararán asociadas a los volúmenes de solución de trabajo que se requieren y el instrumento sugerido para obtener el volumen desde la solución de trabajo.

Concentración (ppb)	Volumen solución (ml)	Volumen desde solución trabajo (ml)	Instrumento sugerido
0	1.000	0	
0,3	1.000	0,3	Micropipeta
3	1.000	3	Pipeta graduada de 10 ml
6	1.000	6	Pipeta graduada de 10 ml

Una vez preparadas las soluciones los matraces deben ser cubiertos con papel aluminio mientras se preparan las cápsulas Petri con los parásitos y antes de ser transferidas a las cápsulas Petri se deberán agitar manualmente nuevamente.

También podría trasvasijarse la solución a un matraz Erlenmeyer de 1 L, cubrir completamente el matraz con papel aluminio y rotular con una etiqueta indicando nombre del producto/químico y la concentración, agregar un magnético y dejar en agitación por 5 minutos.

5.3. Cipermetrina

En el caso de cipermetrina, el producto comercial está preparado al 5% (1 ml de la solución contiene 50 mg de principio activo) y la concentración recomendada del producto comercial es de 15 ppb. El procedimiento consiste en preparar una solución stock de 500.000 ppb a partir del producto comercial. Desde esta preparar la solución de trabajo de 5.000 ppb. A partir de la solución de trabajo se prepararán las soluciones del bioensayo: 5, 15 y 30 ppb.

5.3.1. Solución stock 500.000 ppb

Medir 10 ml del producto comercial con una pipeta graduada y agregarlo a un matraz volumétrico de 1 L al que se ha añadido previamente 950 ml de agua de mar filtrada 1 μ m y desinfectada con UV.

Aforar con agua de mar filtrada 1 μ m el matraz volumétrico y agitar manualmente 20 veces.

5.3.2. Solución de trabajo 5.000 ppb

Medir 10 ml de la solución stock usando una pipeta graduada de 10 ml y llevarla a un matraz volumétrico de 1 L al cual se le había añadido previamente 950 ml de agua de mar filtrada a 1 μ m

Aforar con agua de mar filtrada 1 μ m el matraz volumétrico, y agitar manualmente la solución 20 veces.

5.3.3. Soluciones del Bioensayo.

Las 3 concentraciones se prepararán de acuerdo a la Tabla 6 y usando material volumétrico (matraces aforados de 1 L) para aforar a 1 L una vez añadido el volumen de la solución de trabajo.

Tabla 6. Soluciones de cipermetrina que se prepararán asociadas a los volúmenes de solución de trabajo que se requieren y el instrumento sugerido para obtener el volumen desde la solución de trabajo.

Concentración (ppb)	Volumen solución (ml)	Volumen desde solución trabajo (ml)	Instrumento sugerido
0	1.000	0	
5	1.000	1	Micropipeta
15	1.000	3	Pipeta graduada de 10 ml
30	1.000	6	Pipeta graduada de 10 ml

Una vez preparadas las soluciones los matraces deben ser cubiertos con papel aluminio mientras se preparan las cápsulas Petri con los parásitos y antes ser transferidas a las cápsulas Petri se deberán agitar manualmente nuevamente.

También podría trasvasijarse la solución a un matraz Erlenmeyer de 1 L, cubrir completamente el matraz con papel aluminio y rotular con una etiqueta indicando nombre del producto/químico y la concentración, agregar un magnético y dejar en agitación por 5 minutos.

5.4. Peróxido de Hidrógeno

En el caso de peróxido de hidrógeno la concentración recomendada del producto comercial es de 1.500 ppm para el parásito *L. salmonis* del Hemisferio Norte (Treasurer, Wadsworth y Grant, 2000). En Chile no hay una concentración recomendada por el proveedor pero resultados de estudios *in vitro* señalan que la concentración que inmoviliza el 100% de los individuos después de 20 min de exposición fluctúa entre 805 y 879 ppm (Marín et al., 2016). Por esta razón se recomienda que para los efectos de evaluar sensibilidad de *C. rogercresseyi* a peróxido de hidrógeno se utilice como concentración recomendada 840 ppm.

La mayoría de peróxido de hidrógeno comercial tiene una concentración de 50,5% w/w (50,5 g de peróxido de hidrógeno en 100 g de la solución). Dada la densidad la

concentración de peróxido expresada en ppm es 604.067 aproximado a 600.000 ppm. El procedimiento consiste en preparar una solución de trabajo de 60.000 ppm a partir del producto comercial (600.000 ppm) y desde ella obtener las soluciones del bioensayo: 180, 480 y 840 ppm.

5.4.1. Solución de trabajo 60.000 ppm

Medir 100 ml del producto comercial de peróxido de hidrogeno con una probeta graduada y añadirlo a un matraz volumétrico de 1.000 ml que tiene previamente 500 ml de agua de mar filtrada 1 μ m y desinfectada con UV. Luego aforar con agua de mar filtrada 1 μ m el matraz volumétrico y agitar manualmente 20 veces.

5.4.2. Soluciones del Bioensayo.

Las 3 concentraciones se prepararán de acuerdo a la Tabla 7 y usando material volumétrico (matraces aforados de 1 L) para aforar a 1 L una vez añadido el volumen de la solución de trabajo.

Tabla 7. Soluciones que se prepararán asociadas a los volúmenes de solución de trabajo que se requieren y el instrumento sugerido para obtener el volumen desde la solución de trabajo.

Concentración (ppm)	Volumen solución (ml)	Volumen desde solución trabajo (ml)	Instrumento sugerido
0	1.000	0	
180	1.000	3	Pipeta graduada de 10 ml
480	1.000	8	Pipeta graduada de 10 ml
840	1.000	14	Pipeta graduada de 10 ml

Una vez preparadas las soluciones los matraces deben ser cubiertos con papel aluminio mientras se preparan las cápsulas Petri con los parásitos y antes de ser transferidas a las cápsula Petri se deberán agitar manualmente nuevamente.

También podría trasvasijarse la solución a un matraz Erlenmeyer de 1 L, cubrir completamente el matraz con papel aluminio y rotular con una etiqueta indicando nombre del producto/químico y la concentración, agregar un magnético y dejar en agitación por 5 minutos.

6. BIOENSAYO

La ejecución del bioensayo debe ser cuidadosamente planificada considerando la cantidad de réplicas y concentraciones, y la disponibilidad de personal calificado para hacerlo. El procedimiento de lavado de parásitos y su consecuente puesta en agua de mar toma tiempo, que si no se considera en el momento de la exposición puede alterar el tiempo real que los

parásitos están expuestos al químico. Para esto se sugiere realizar simultáneamente tantas concentraciones como personas calificadas disponibles pueden realizar el procedimiento de lavado de los parásitos. De no existir más de una persona calificada disponible se sugiere realizar la exposición de parásitos a cada concentración espaciada por al menos 15 min.

6.1. Selección de los parásitos para el bioensayo

Una vez transcurridas las 24 h desde la colección de los parásitos se debe realizar una nueva inspección de la condición de éstos para realizar una segunda evaluación sobre si es conveniente realizar el bioensayo. Estimar de manera aproximada el porcentaje de parásitos activos y analizar si son suficientes para cumplir con los requerimientos del bioensayo.

Si el número es significativamente bajo debiera descartarse el bioensayo y proceder a la eliminación de éstos. Con el objeto de obtener el máximo provecho del trabajo ya realizado si el número de parásitos activos no es tan diferente del requerido podría evaluarse la posibilidad de sacrificar individuos de cada réplica, por ejemplo en lugar de 10 por réplica podría considerarse 8 individuos.

6.2. Asignación de los parásitos a las concentraciones y réplicas

Las cápsulas Petri deben estar debidamente rotuladas con un código que permita identificar el antiparasitario, el género del parásito, la concentración de la solución y la réplica.

Los parásitos deben ser asignados a cada concentración y a cada réplica de la manera más aleatoria posible considerando la posibilidad de que no todas las concentraciones y réplicas se realizarán simultáneamente. Por esta razón se sugiere que previo a la exposición se realice una asignación aleatoria del turno que le corresponde a cada concentración y réplica. Luego de esta asignación proceder aleatoriamente a colocar los parásitos en cada una de las concentraciones y réplicas seleccionadas uno a uno. Esto significa evitar completar una réplica con los 10 individuos de una vez para continuar con la siguiente, en su lugar ir agregando de a un individuo por réplica y concentración.

Durante este proceso se sugiere agregar unas gotas de agua de mar en cada cápsula de manera que mientras se está realizando el ingreso de los parásitos a las cápsulas estos no estén en seco. Para finalizar esta parte se debe contar el número de parásitos en cada cápsula Petri.

6.3. Exposición al antiparasitario

Antes de agregar el antiparasitario se debe extraer el exceso de agua de las cápsulas Petri con un pequeño trozo de papel absorbente cuidando de no remover los parásitos.

Agregar la solución del antiparasitario correspondiente en un volumen que mantenga a los parásitos sumergidos.

Registrar el tiempo de inicio del bioensayo y programar el cronómetro según el tiempo de exposición según el antiparasitario (Tabla 8).

Tabla 8. Tiempos de exposición recomendados para los distintos antiparasitarios

Principio activo /antiparasitario	Tiempo de exposición sugerido por proveedor
Azametifos (50%)	60 min

Deltametrina (1%)(AMX)	30 min – 40 min
Deltametrina (1%) (FAV)	40 min
Cipermetrina (5%) (Betamax)	30 min
Peróxido de Hidrógeno (50%)	20 min

6.4. Lavado de los parásitos

Una vez terminado el tiempo de exposición los parásitos deben ser extraídos desde la solución para lo cual se vacían la cápsula Petri en un tamiz y se deja escurrir el contenido en un contenedor.

Agua de mar fresca se deja escurrir suavemente por tres veces sobre el tamiz. Si han quedado parásitos en la cápsula Petri ésta se lava suavemente 3 veces con el agua de mar.

Trasladar los parásitos a la cápsula Petri con ayuda de una Piceta con la que se escurre agua de mar en dirección a la cápsula Petri hasta que todos los parásitos estén en la cápsula Petri.

Agregar agua de mar fresca hasta completar el volumen apropiado según volumen de cápsula y contar los parásitos para asegurarse que siguen estando los 10 originales.

Tapar todas las cápsulas Petri e ingresarlas a la cámara con control de temperatura y fotoperiodo registrando la hora en la que se debe realizar la evaluación de la respuesta.

Vaciar el contenido de los contenedores de lavado de los parásitos a los contenedores de almacenamiento de residuos y descartados de acuerdo a los procedimientos establecidos para estos compuestos químicos.

El material utilizado hasta esta etapa debe ser tratado según el protocolo de lavado de materiales expuestos al antiparasitario en cuestión.

6.5. Incubación

Los parásitos expuestos a peróxido de hidrógeno no requieren incubación ya que el efecto de éste sobre su condición se evalúa inmediatamente pe.

Los parásitos expuestos a los principios activos azametifos, deltametrina y cipermetrina estarán en la cámara por 48 h, periodo en el cual serán extraídos desde ésta 24 h pe para la realización de la primera evaluación del bioensayo. La segunda retirada de los parásitos de la cámara corresponde a las 48 h pe para la evaluación de las 48 h.

No obstante, es necesario revisar el funcionamiento de la cámara continuamente y también el estado de las cápsulas Petri, específicamente revisar que existe suficiente agua en las cápsulas y que se encuentran bien tapadas.

Al realizar la primera lectura (24 h pe) se debe cambiar el agua de mar de las placas con agua fresca para mantener la calidad de ésta durante el segundo periodo de 24 h.

Una vez que las cápsulas Petri se han trasladado a la cámara con control de temperatura se debe cerrar la bitácora.

7. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA

Esta actividad se inicia con el registro en la bitácora de la fecha, hora de inicio y objetivo de la actividad.

El tiempo en el que se evalúa la respuesta del parásito a la exposición a los químicos depende del químico. Para los antiparasitarios en base a azametifos, deltametrina y cipermetrina la lectura se realiza 24 h y 48 h pe. Sin embargo, para el peróxido de hidrógeno la lectura debe realizarse inmediatamente pe debido a que existe evidencia de que los parásitos inmóviles por exposición al peróxido de hidrógeno se recuperan.

Usando una lupa se debe identificar la condición de cada uno de los parásitos y registrarla en una planilla diseñada para esto (Anexo 2. Planilla 3).

Para definir la condición de los parásitos se han considerado 4 categorías que resultan del análisis bibliográfico y la experiencia de los autores (Ver material complementario, Anexo 2).

A continuación, se describen las características que definen cada condición

Muerto

- 1) Sin natación
- 2) Flota si se mueve el agua donde se encuentra el individuo
- 3) Sin movimientos en extremidades.
- 4) Sin movimiento en aparato digestivo u otros órganos luego de ser levemente presionado con pinza.*

Moribundo:

- 1) Incapaces de adherirse usando la parte plana del cuerpo como disco succionador en las paredes de una placa Petri.
- 2) Los movimientos de las extremidades u órganos internos aún pueden ser observados luego de ser levemente presionado con pinza, y aun cuando sus extremidades se encuentren recogidas.
- 3) Podrían estar adheridos pero no muestran movimientos en sus extremidades ni órganos internos. Esto se observa una vez que se extrae el parásito de la superficie adherida en la placa

Débil:

- 1) Parásitos que muestran una natación lenta e irregular natación (natación en círculo o gira quedando en posición dorso ventral).
- 2) No es capaz de adherirse a la placa Petri.
- 3) Respuesta débil a estímulo con pinza (levantar con pinza desde la furca o zona entre abdomen y cefalotórax del parásito)

Vivo:

- 1) Nado activo, sin ser estimulados y normal (natación en línea recta)
- 2) Pueden adherirse fuertemente a las paredes de placas Petri

3) Al estímulo de pinza responden rápidamente con natación continua.

Los datos registrados en la planilla de papel deben ser traspasados a una planilla Excel diseñada para el bioensayo (Anexo 2. Planilla 4).

Si como resultado de la lectura 24 h pe se observa que la mortalidad promedio del control es mayor a 20% el bioensayo debiera ser descartado.

La lectura a las 48 h pe se realiza de la misma forma que la lectura a las 24 h pe, con la excepción que al finalizar esta lectura los parásitos deben ser descartados y el material lavado de acuerdo al procedimiento establecido por el laboratorio para material utilizado con el tipo de químico utilizado en el bioensayo

Una vez que se han ingresado a Excel los datos deben pasar por un control de calidad para lo cual es necesario que dos personas revisen la correspondencia de los datos de la planilla en papel y la Excel.

La planilla de papel debe quedar almacenada en los archivos del laboratorio de bioensayos. Una copia de éstas y la planilla electrónica deben ser entregadas al responsable del laboratorio para los próximos análisis.

8. ANÁLISIS DE LOS DATOS

La información recolectada permite entregar como resultados los parámetros de sensibilidad EC_{50} y/o LC_{50} para hembras y machos (en la medida que se cumplan los supuestos del análisis estadístico) y el porcentaje de individuos muertos e inmovilizados bajo la concentración recomendada para el tratamiento y para todas las concentraciones a las que fueron expuestos los parásitos.

Los datos obtenidos en base al número de individuos en cada categoría de condición del parásito para cada concentración y réplica deben ser expresados en porcentaje. Para efectos del cálculo de EC_{50} los individuos moribundos y muertos se agrupan en una categoría: afectados o inmovilizados, y los débiles y vivos en la categoría de vivos. Para el cálculo de LC_{50} sólo se consideran los individuos en la categoría de muerto.

Las curvas concentración – respuesta⁴ siguen una forma sigmoidea simétrica a través de la cual se puede determinar el parámetro EC_{50} y/o LC_{50} como la concentración a la cual la respuesta deseada corresponde al punto medio entre la respuesta basal (aquella observada en los organismos control) y la máxima (100% de los individuos muestran la respuesta deseada).

Por esta razón es necesario que la selección del gradiente de concentraciones a utilizar contenga como máxima concentración ensayada aquella que causa el 100% de la mortalidad y se evite la inclusión de varias concentraciones causando el 100% de la respuesta deseada. Dado esto es posible que con un conjunto de concentraciones no pueda estimarse EC_{50} y LC_{50} para un mismo tiempo de exposición.

⁴ Se usa concentración – respuesta en lugar de dosis respuesta (que es la forma en que más se conoce estas curvas) debido a que no se está probando dosis en los individuos, sino que éstos se someten a soluciones que tienen un producto en una determinada concentración

Los parámetros EC_{50} y/o LC_{50} se obtienen al ajustar el conjunto de datos a una de las curvas que conforman la familia de curvas sigmoideas. Cuando se cuenta con gran cantidad de datos respecto de las concentraciones ensayadas y de los organismos sometidos al bioensayo se puede optar por un ajuste a la curva sigmoidea de 4 parámetros. Cuando los datos son limitados se recomienda usar la curva sigmoidea de 3 parámetros. En este caso particular se utiliza la curva de 3 parámetros.

Al presentar el resultado, EC_{50} y/o LC_{50} debe acompañarse con los estadísticos que permiten evaluar el ajuste del modelo sigmoideo de 3 parámetros a los datos. Para esto y dependiendo del software estadístico utilizado se puede estimar el intervalo de confianza al 95% para el parámetro (EC_{50} y/o LC_{50}), R^2 , y como estadísticos que evalúan el ajuste de la curva a los datos usan el X^2 , el F de la prueba de réplicas.

Se debe presentar además las curvas concentración – respuesta con sus respectivos intervalos de confianza 95%. Un gráfico que muestre el porcentaje de individuos afectados a las 24 y 48 h también es recomendable así como un gráfico para los resultados de los individuos muertos.

Una dificultad común en estos bioensayos es que los estadísticos que evalúan el ajuste del modelo a los datos indican que el modelo ajustado no es una buena representación de los datos. Entre las razones por las cuales puede suceder esto es que el conjunto de concentraciones a las cuales se exponen los parásitos no es el apropiado, o que existe mucha variabilidad entre las réplicas y bajo número de réplicas.

A pesar de que el ajuste de la curva es el criterio que mejor fundamenta el valor del parámetro obtenido, es importante analizar también los otros estadísticos e interpretarlos en conjunto.

Material complementario a esta sección se presenta en el Anexo 1

9. REPORTE

El informe debe considerar los siguientes:

Antecedentes generales: nombre de la empresa y centro, especie de pez hospedadora, condición de llegada, fecha de recolección e ingreso al laboratorio de los parásitos, fecha inicio y lectura del bioensayo, además nombre de los muestreadores.

Resultados descripción de los resultados del bioensayo a lecturas de 24 h y 48 h considerando parámetros de EC_{50} y LC_{50} desde el análisis, el intervalo de confianza, prueba de ajuste de los datos y la prueba de las réplicas.

Tablas y gráficos: Considera las tablas obtenidas en la lectura donde se entrega los resultados en las distintas categorías (vivos, débil, moribundo y muertos) en cada una de las 3 réplicas. Los gráficos deben mostrar el porcentaje de individuos afectados/inmovilizados (moribundos + muertos) y la concentración del antiparasitario a las 24 h y 48 h. Un gráfico para los individuos muertos también es recomendable presentar.

10. ANEXOS

10.1. Anexo 1. Puntos a validar en el protocolo

A continuación se presenta la Tabla 9 que resume los puntos necesarios de analizar y/o validar a través de la aplicación de este manual en el estudio de sensibilidad a realizar en conjunto con el análisis genómico. Algunos aspectos se debieran discutir antes de la ejecución de los bioensayos entre laboratorios que actualmente están realizando bioensayos y durante la ejecución del bioensayo y otros se analizarán exclusivamente durante la ejecución del bioensayo.

Tabla 9. Puntos en las etapas del protocolo que requieren análisis y/o validación

Etapa del bioensayo	Puntos a analizar con insumos de otros laboratorios	Puntos a analizar/validar con la aplicación del manual en bioensayos
Colección, transporte de parásitos e ingreso al laboratorio	Definir pertinencia de una aclimatación de 24 h desde la llegada de los parásitos al laboratorio y la realización del bioensayo.	Factibilidad de coleccionar suficientes parásitos para el diseño planteado. Evaluación de la condición de parásitos y tiempos de transporte desde los distintos lugares muestreados. Evaluación de la efectividad de contar con un 20% extra de parásitos para reponer en caso de que la condición de éstos no sea apropiada para el bioensayo.
Preparación de las soluciones	Discutir si se requerirá chequeo de las concentraciones nominales a través de un laboratorio externo Definir si la concentración de deltametrina AMX a usar será de 2 o 3 ppb	
Bioensayo	Disponibilidad de parásitos para el diseño Decisiones a tomar en caso de que el número disponible esté en el límite Tiempo de exposición de la deltametrina AMX (30 min o 20) Organización en la ejecución del bioensayo (manejo de las numerosas	Disponibilidad de parásitos para el diseño Decisiones a tomar en caso de que el número disponible esté en el límite Tiempo de exposición de la deltametrina AMX (30 min o 20) Organización en la ejecución del

	placas y aleatoriedad)	bioensayo (manejo de las numerosas placas y aleatoriedad)
Evaluación de la respuesta		Facilidad para el observador de utilizar la nueva categorización en la definición de la condición de los parásitos
Análisis de los datos		Significancia estadística de los parámetros de sensibilidad Analizar los resultados con distintos software En casos de que el análisis no sea estadísticamente significativo analizar posibles fuentes de error asociados al procedimiento Factibilidad de estimar el LC ₅₀ con el rango de concentraciones ensayadas
Reporte	Pertinencia de la información a presentar en un reporte	

10.2. Anexo 2. Planillas para registro de información

Planilla 1. Planilla tipo de registro de recolección de parásitos en terreno

Registro recolección de parásitos en terreno		Página	
		Código Planilla	
Muestreador 1		Firma	
Muestreador 2		Firma	
Fecha		Hora de inicio	
		Hora de término	
Datos de muestreo			
N° peces muestreados		N° parásitos colectados (aprox.)	
Datos empresa y/o institución			
Nombre Empresa			
Nombre Centro		Área de concesión salmonera	
Región		N° Jaula	
Especie de pez		Peso promedio de peces	
Carga parasitaria centro			
Enfermedades			
Tratamientos antiparasitarios			
Fechas últimos 3 tratamientos (ttos)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Productos usados en los últimos 3 ttos	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Eficacia (última registrada)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Parámetros ambientales del centro			
Temperatura (°C)			
Salinidad (ppt)			
Oxígeno (% , mg/L) (marcar con un círculo según corresponda)			
Observaciones			

Planilla 2. Planilla tipo de registro de ingreso de parásitos en laboratorio

Registro de Ingreso de Parásitos en Laboratorio		Página				
		Código Planilla				
Datos del personal						
Muestreador		Firma				
Encargado de traslado		Firma				
Encargado de recepción		Firma				
Origen de los parásitos						
Nombre empresa		Nombre centro				
Área de concesión salmonera		Región				
Especie de pez		N° Jaula				
Carga parasitaria centro		Enfermedades				
Fecha de ingreso		Hora de ingreso				
Parámetros ambientales del centro						
Temperatura (°C)						
Salinidad (ppt)						
Oxígeno (% , mg/L)						
Parámetros de llegada contenedores:						
N° contenedor	1	2	3	4	5	6
Temperatura (°C)						
Salinidad (ppt)						
Oxígeno (% , mg/L) (marcar con un círculo según corresponda)						
Condición de los parásitos						
Actividad natatoria	SI ()			NO ()		
Respuesta a estímulo	SI ()			NO ()		
Presencia de individuos en el fondo	SI ()			NO ()		
Observaciones:						

Planilla 3.

PLANILLA LECTURA BIOENSAYO (BIO)	Página	
	Código planilla	
	Centro	
	Género	

EMPRESA: _____ TPO EXPOSICIÓN: _____ FECHA: _____ FECHA: _____
 INICIO BIOENSAYO: _____ TÉRMINO BIOENSAYO: _____ TPO LECTURA: 24 h TPO LECTURA: 48 h

PRODUCTOS	CONCENTRACION 24 H								CONCENTRACION 48 H							
	Vivos		Débil		Moribundos		Muertos		Vivos		Débil		Moribundos		Muertos	
Réplica 1																
Réplica 2																
Réplica 3																
Réplica 4																
Réplica 5																

EMPRESA: _____ TPO EXPOSICIÓN: _____ FECHA: _____ FECHA: _____
 INICIO BIOENSAYO: _____ TÉRMINO BIOENSAYO: _____ TPO LECTURA: 24 h TPO LECTURA: 48 h

PRODUCTOS	CONCENTRACION 24 H								CONCENTRACION 48 H							
	Vivos		Débil		Moribundos		Muertos		Vivos		Débil		Moribundos		Muertos	
Réplica 1																
Réplica 2																
Réplica 3																
Réplica 4																
Réplica 5																

ENCARGADO LECTURA 24 HRS

ENCARGADO LECTURA 48 HRS

11. BIBLIOGRAFÍA

- Barría, P., S.L. Marín. 2012 Using the red neutral technique to classify *Caligus rogercresseyi* (Boxshall & Bravo, 2000) condition of live, moribund and dead after sensitivity bioassays to chemotherapeutants. Internacional Sealice Conference, Bergen, Noruega 20-23 Mayo 2012.
- Bravo, S., Treasurer, J., Sepulveda, M. & Lagos, C. 2010. Effectiveness of hydrogen peroxide in the control of *Caligus rogercresseyi* in Chile and implications for sea louse management. *Aquaculture*, **303**, 22-27.
- Bruno, D. & Raynard, R. 1994. Studies on the use of hydrogen peroxide as a method for the control of sea lice on Atlantic salmon. *Aquaculture International*, 2, 10-18.
- Chapman, P.F., M. Crane, J.A. Wiles, F. Noppert, y E.C. McIndoe. 1996. Asking the right questions: Ecotoxicology and Statistics. Society of Environmental Toxicology and Chemistry. Bélgica. 37pp.
- Chávez-Mardones, J., Asencio, G., Latuz, S. & Gallardo-Escárate, C. 2015. Hydrogen peroxide modulates antioxidant system transcription, evidencing sex-dependent responses in *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture Research*. Doi:10.1111/are.12939
- González, L., Carvajal, J., 2003. Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture* 220, 101-117.
- GraphPad Prism version 7.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com”.
- Helgesen, K.O., Horsberg, T.E., 2012. Influence of different materials on the concentration of delousing agents in sea water during bioassays. *J. Fish Dis.* 36, 529-532. Doi:10.1111/jfd.12046.
- Helgesen, K.O., Horsberg, T.E., 2013. Single-dose field bioassay for sensitivity testing in sea lice, *Lepeophtheirus salmonis*: development of a rapid diagnostic tool. *J. Fish Dis.* 36, 261-272. Doi:10.1111/jfd.12053.
- Helgesen, K.O., Romstad, H., Aaen, S.M. & Horsberg, T.E. 2015 First report of reduced sensitivity towards hydrogen peroxide found in the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* in Norway. *Aquaculture Reports*, 1, 37-42.
- Igboeli, O.O., Fast, M.D., Heumann J, Burka, J.F. 2012. Role of P-glycoprotein in emamectin benzoate (SLICE®) resistance in sea lice, *Lepeophtheirus salmonis*. *Aquaculture* 344-349:40-7.
- Igboeli, O.O, Burka, J. F., Fast, M.D., 2013. Sea lice population and sex differences in P-glycoprotein expression and emamectin benzoate resistance on salmon farms in the Bay of Fundy, New Brunswick, Canada. *Pest Manag. Sci.* 70, 905 – 914. Doi:10.1002/ps.3620.
- Marín, S.L., Ibarra, R., Medina, M.H., Jansen, PA. 2015a. Sensitivity of *Caligus rogercresseyi* (Boxshall and Bravo 2000) to pyrethroids and Azamethiphos measured using bioassay tests—A large scale spatial study. *Preventive Veterinary Medicine* 122:33-41. Doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.09.017
- SEARCH, 2006. Sea lice resistance to chemotherapeutants: A handbook in resistance management. Second edition. 52 p. Available: http://www.aquamedicine.no/uploaded_fagfiles.aspe?fag=7&meny=17.

- Sevatdal, S., Horsberg, T.E., 2003. Determination of reduced sensitivity in sea lice (*Lepeophtheirus salmonis* Kroyer) against the pyrethroids deltamethrin using bioassays and probit modelling. *Aquaculture* 218, 21-31.
- Thomassen, J.M. 1993. Hydrogen peroxide as a delousing agent for Atlantic salmon. *Pathogens of wild and farmed fish: sea lice*, 290-295.
- Treasurer, J., Wadsworth, S. & Grant, A. (2000) Resistance of sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer), to hydrogen peroxide on farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Research*, 31, 855-860.
- Valenzuela-Muñoz, V., Nuñez-Acuña, G., Gallardo-Escárate, C., 2014. Molecular Characterization and Transcription Analysis of P-Glycoprotein Gene from the Salmon Louse *Caligus rogercresseyi*. *J Aquac Res Development* 5, 236
Doi:10.4172/2155-9546.1000236.
- 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, 119–131.
- Whyte, S.K., Westcott, J.D., Elmoslemany, A., Hammell, K.L., Revie, C.W., 2013. A fixed-dose approach to conducting emamectin benzoate tolerance assessments on field-collected sea lice, *Lepeophtheirus salmonis*. *J. Fish Dis.* 36, 283-292.