

**PROTOCOLOS TRABAJO CON ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN
FONDECYT POSTDOCTORADO N.º 3210502**

Título del Proyecto: Cuerpos de inclusión como inmunoestimulantes de administración oral para el control de *Piscirickettsia salmonis* en Salmón del Atlántico.

Investigador Responsable: Dra. Débora Torrealba Sandoval.

Especie: *Salmo salar*, Salmón del Atlántico.

Metodología del proyecto

Primero se diseñará y desarrollará plásmidos para expresar las proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. Se purificarán, caracterizarán y cuantificarán las proteínas recombinantes. Posteriormente se evaluará la capacidad de inmunoestimulación de las proteínas en Salmon del Atlántico a través de intubación por un periodo de 48h. Se realizará análisis molecular de genes relacionados con la respuesta inmune en riñón, bazo y branquias. En base a estos resultados se elegirá la dosis ideal para tratar a los peces. En el ensayo final se administrarán las proteínas a través del alimento a los peces para luego ser desafiados con *P. salmonis* durante 30 días y de esta manera evaluar la capacidad de protección de las proteínas producidas frente a un patógeno. La evaluación se realizará en base a curva de sobrevivencia y análisis moleculares.

Protocolo de supervisión de los animales

Durante la fase de aclimatación y experimental se supervisarán los estanques, sistemas de cultivo y componentes diariamente, para detectar anomalías que puedan poner el riesgo la salud y bienestar de los peces. Además, diariamente se registrará variables ambientales (O_2 , pH, So/oo , T° , CO_2 , Amonio, Nitrito, Nitrato, alcalinidad mortalidad). Asimismo, se verificará el comportamiento de los peces como la mortalidad, si se detectan peces aletargados o enfermos, previo a los ensayos, estos peces serán extraídos y sacrificados para disminuir la posibilidad de un brote infeccioso en el laboratorio.

Protocolo de anestesia

Los peces serán anestesiados previo a su manipulación, intubación de la dieta e inyección del patógeno. Los peces se colocarán en un contenedor con agua de mar que contendrá una solución anestésica de benzocaína al 20% (BZ-20, Verterquímica). Cuando el pez se voltee (dorso hacia arriba) se procederá a la intubación o inyección del patógeno, según corresponda. Estos procedimientos tardan alrededor de 1 minuto. Una vez realizado el procedimiento, cada pez será colocado en un estanque de recuperación acondicionado con oxigenación, para posteriormente se devuelto al estanque de experimentación.

Metodología para aplicar eutanasia

Para la eutanasia en *Salmo salar* se aplicará una dosis triple de anestésico en el agua. Este procedimiento es mejor que la inyección ya que evita la manipulación y estrés del animal. Previo a la eutanasia los peces estarán en ayuno por 24 horas para aumentar la absorción del anestésico por el intestino y evitar la regurgitación. Los peces serán depositados con una red en una solución que contendrá una dosis letal de benzocaína diluida en agua (4ml en 20L de agua), se esperara a que el dorso del animal quede hacia arriba y sin movimiento de opérculos y boca, signo de que el animal ha muerto. El efecto del anestésico es rápido y no produce sufrimiento ni estrés al pez. Se verificará que el pez este muerto frente a la ausencia de movimiento frente a estímulos mecánicos.

Eliminación animales eutanasiados y los productos de desecho

La mortalidad y los residuos orgánicos son retirados a diario y guardados en un contenedor hermético debidamente identificados, con el tipo de residuo, fecha e investigador a cargo y serán almacenados en un congelador a -17 °C. Posteriormente, los desechos serán retirados por una empresa que se encarga de la gestión de residuos orgánicos y sustancias peligrosas.