

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 937 941**

51 Int. Cl.:

<b>A01N 37/18</b>	(2006.01)
<b>A01N 43/40</b>	(2006.01)
<b>A01N 43/86</b>	(2006.01)
<b>A01N 47/40</b>	(2006.01)
<b>A01N 51/00</b>	(2006.01)
<b>A01P 7/04</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2017 PCT/EP2017/081924**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2018 WO18104487**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2017 E 17811302 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2023 EP 3550972**

54 Título: **Tratamiento para quitar ectoparásitos a los peces**

30 Prioridad:

**08.12.2016 NO 20161951**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**03.04.2023**

73 Titular/es:

**BENCHMARK ANIMAL HEALTH LIMITED (100.0%)  
Highdown House Yeoman Way Worthing West  
Sussex  
BN99 3HH, GB**

72 Inventor/es:

**MARSHALL, JOHN;  
LONGSHAW, MATTHEW y  
APPLEYARD, ELIZABETH**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 937 941 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Tratamiento para quitar ectoparásitos a los peces

La presente invención se refiere a un neonicotinoide usado para quitar ectoparásitos a un pez en el agua.

5 La infestación de ectoparásitos en acuicultura es una preocupación importante de índole comercial. Además, una infestación en peces de piscifactoría puede afectar a las poblaciones de peces silvestres. Sin embargo, la cantidad de tratamientos comercialmente viables es limitada, por ejemplo, debido a cuestiones relacionadas con la liberación de agentes quimioterapéuticos en el medio ambiente y el desarrollo de resistencia por parte de los ectoparásitos u otra reducción en la sensibilidad a los agentes.

10 Los neonicotinoides son una clase de insecticidas neuroactivos químicamente similares a la nicotina. La familia de neonicotinoides incluye acetamiprid, clotianidina, imidacloprid, nitenpiram, nitiazina, tiacloprid y tiametoxam. En comparación con los insecticidas con organofosfatos y carbamatos, los neonicotinoides causan menos toxicidad en aves y mamíferos que en los insectos.

15 EP0590425 se refiere de forma muy general a un método para combatir los parásitos de los peces mediante la administración a los peces de un agonista o antagonista de receptores nicotinérgicos de la acetilcolina. El único ejemplo en EP0590425 prueba la actividad *in vitro* de imidacloprid a 1 ppm o 100 ppm contra piojos de mar aislados en un baño de agua. Sin embargo, EP0590425 no proporciona orientación sobre una dosis adecuada para su uso *in vivo* contra piojos de mar aislados en un pez en un entorno comercial, no de laboratorio.

20 De hecho, el desarrollo de un tratamiento comercialmente viable que se base en la administración por inmersión en agua ha representado un reto debido a cuestiones medioambientales y de seguridad. En particular, se ha considerado importante minimizar la liberación de neonicotinoides en el medio ambiente en general, debido a su impacto negativo percibido, en particular en los insectos terrestres.

25 WO2009/010755 propone tratamientos de combinación que comprenden un carbamato o un organofosforado, un piretroide o una piretrina, y opcionalmente otro biocida seleccionado de las siguientes clases de moléculas: cloronicotinilo, fenilpirazol, oxadiazina, pirazol o compuesto organoclorado. Sin embargo, no se describen ejemplos prácticos de un tratamiento para peces. WO2010/109187 propone tratamientos de combinación que comprenden un piretroide, un organofosforado y opcionalmente otro biocida seleccionado de los siguientes grupos de moléculas: cloronicotinilo, fenilpirazol, oxadiazina, pirazol o compuesto organoclorado. Sin embargo, no se describen ejemplos prácticos de un tratamiento para peces.

30 US2015/0272931 se refiere al uso de clotianidina para controlar los piojos de mar en una población de peces que comprende, principalmente, dar de comer una formulación de alimentación que comprende clotianidina a la población de peces según un régimen específico. WO2015/198247 se refiere al uso de un alimento medicinado para peces para prevenir o tratar la infección de parásitos en peces, el alimento medicinado para peces comprendiendo gránulos o bolitas de alimento para peces recubiertos con una composición que comprende un neonicotinoide y un excipiente que tiene un alto coeficiente de digestibilidad aparente.

35 Por lo tanto, sigue siendo necesario un tratamiento de inmersión comercialmente viable para los ectoparásitos en los peces que tenga en cuenta problemas de seguridad, medioambientales y de resistencia al tratamiento.

40 Por consiguiente, la invención proporciona un neonicotinoide usado para quitar ectoparásitos a un pez en el agua, donde el neonicotinoide se aplica durante 180 minutos o menos, donde, después de quitar los ectoparásitos al pez, el agua que comprende los ectoparásitos que se han quitado se cambia por agua de recambio, separando así los ectoparásitos que se han quitado y el pez, donde los ectoparásitos son piojos de mar, y donde el neonicotinoide no está configurado ni formulado para su administración en la alimentación.

En las formas de realización de la invención, el neonicotinoide se administra al pez en una concentración de 1-500 ppm, 1-200 ppm, 20-200 ppm, 1-64 ppm, 10-64 ppm, 10-50 ppm, 50 ppm o más, 100 ppm o más, o 200 ppm o más p/v.

45 En formas de realización de la invención, el pez es un salmón, una trucha, un salvelino o un pez limpiador.

En formas de realización de la invención, el neonicotinoide se aplica en una dosis subletal y/o durante un tiempo subletal.

En formas de realización de la invención, el neonicotinoide es imidacloprid, clotianidina, acetamiprid, nitenpiram, nitiazina, tiacloprid o tiametoxam, o las sales o ésteres farmacéuticamente eficaces de estos.

En formas de realización de la invención, después de cambiar el agua, se impide que se suelten al medio ambiente los ectoparásitos que se han quitado.

En formas de realización de la invención, impedir que se suelten los ectoparásitos que se han quitado comprende recoger los ectoparásitos de una muestra de agua que comprende los ectoparásitos que se han quitado.

- 5 Las formas de realización de la invención comprenden además matar los ectoparásitos que se han quitado y que permanecen vivos, después de concentrar opcionalmente los ectoparásitos.

En formas de realización de la invención, el neonicotinoide se administra al pez durante 120 minutos o menos, 60 minutos o menos, menos de 30 minutos, menos de 20 minutos, 15 minutos o menos, menos de 10 minutos, o 5 minutos o menos.

- 10 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La descripción adicional se proporciona solo a título informativo.

- 15 Los inventores han descubierto que el neonicotinoide es más eficaz contra los ectoparásitos en un estadio móvil de su ciclo de vida. Por lo tanto, según la descripción, el ectoparásito puede estar en un estadio del ciclo de vida móvil. Según la descripción, el ectoparásito puede estar en un estadio del ciclo de vida inmóvil. Dentro de una población de ectoparásitos, los ectoparásitos pueden estar en estadios tanto móviles como inmóviles del ciclo de vida. Por lo tanto, el tratamiento puede ser eficaz en los estadios tanto móviles como inmóviles del ciclo de vida.

Por ejemplo, el neonicotinoide puede administrarse al pez en una concentración de 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 64, 100, 200 o 500 ppm p/v.

Normalmente, el neonicotinoide se administra al pez en una concentración de 15 ppm p/v o 20 ppm p/v.

- 20 En ejemplos particulares, el neonicotinoide se administra al pez en una concentración de 100 ppm p/v o más durante 5-15 minutos, preferiblemente en una concentración de 200 ppm p/v o más durante 5-15 minutos.

Por lo tanto, el neonicotinoide proporciona una forma segura y eficaz de quitar ectoparásitos de peces en su medio, que puede ser por ejemplo un buque vivero.

- 25 El entorno del buque vivero presenta un reto único en el que están limitados el espacio y el tiempo para el tratamiento, y existen riesgos adicionales respecto a garantizar que los piojos de mar tratados no se suelten al medio ambiente. A pesar de estos retos, la presente invención de forma ventajosa trata con éxito los piojos de mar en su medio y, por ejemplo, evita la necesidad de que un buque vivero viaje de regreso a la orilla, o haga bombear su agua a otro buque para su procesamiento o transporte a la orilla para quitar los piojos de mar del agua del tratamiento.

- 30 La presente invención puede utilizarse o llevarse a cabo de manera adecuada en cualquier área de contención, lo que evita la liberación en el medio ambiente de ectoparasitocidas o piojos de mar que se han quitado. La invención se puede llevar a cabo en un buque vivero.

De forma sorprendente, los inventores han descubierto que el uso de neonicotinoides es más eficaz para quitar ectoparásitos que azametifos o deltametrina.

- 35 Se cree que el neonicotinoide es eficaz contra todos los ectoparásitos. Sin embargo, en la invención, el ectoparásito es un piojo de mar. En formas de realización particulares, el piojo de mar es *Lepeophtheirus salmonis*. En formas de realización particulares, el piojo de mar es una especie de *Caligus*, tal como *C. elongatus* o *C. rogercresseyi*.

Se cree que el neonicotinoide es eficaz contra la infestación de ectoparásitos en todos los peces. En una forma de realización de la invención, el pez es un salmón, una trucha, un salvelino o un pez limpiador.

- 40 En todos los aspectos y formas de realización de la presente invención descritos en la presente memoria, el término "pez limpiador" se refiere a especies de peces que proporcionan un servicio a otras especies de peces al quitar materia no deseable, tal como pieles muertas y/o ectoparásitos. En cualquier forma de realización de la invención, el pez limpiador puede ser uno o más seleccionados del grupo que consiste en: lumpo/ciclópetero (*Cyclopterus lumpus*), lábrido de la familia Labridae, tautoga americana (*Tautogolabrus adspersus*) y róbalo patagónico (*Eleginops maclovinus*). El lábrido de la familia Labridae puede ser uno o más seleccionados del grupo que consiste en: maragota (*Labrus bergylta*); porredana (*Symphodus melops*); centrolabro (*Centrolabrus exoletus*); tabernero (*Ctenolabrus rupestris*); y gallano (*Labrus mixtus*). En formas de realizaciones particulares de la invención, el pez limpiador es un lumpo o un lábrido.
- 45

En una forma de realización particular de la invención, el neonicotinoide es imidacloprid o sus sales o ésteres farmacéuticamente eficaces. En otras formas de realización de la invención, el neonicotinoide es acetamiprid, clotianidina, nitenpiram, nitiazina, tiacloprid o tiametoxam, o sus sales o ésteres farmacéuticamente eficaces.

5 Las formas de realización de la invención no requieren que el neonicotinoide mate los ectoparásitos al principio. En lugar de eso, se induce a los ectoparásitos a soltarse o saltar del pez, y cada ectoparásito que se ha quitado estará en uno de los siguientes estados: vivo, moribundo y muerto. Cuando se tratan peces infestados de una población mixta de piojos de mar que pueden tener, por ejemplo, diferentes sensibilidades a los ectoparasiticidas usados, es más probable que la población de piojos de mar que se han quitado esté en una mezcla de dos o más estados. Por lo tanto, aunque estas formas de realización no requieren que se maten los ectoparásitos al principio, se matarán algunos o todos durante el tratamiento. En formas de realización que requieren que se suelten pero no que se maten los ectoparásitos, el neonicotinoide puede aplicarse en una dosis subletal y/o durante un tiempo subletal. Esta forma de realización es útil de forma ventajosa para quitar poblaciones de ectoparásitos que exhiban un grado de resistencia al ectoparasiticida, cuya dosis requerida puede aumentar a niveles que sean poco prácticos o demasiado caros de conseguir para matar al ectoparásito. A este respecto, la invención proporciona una solución a la resistencia al tratamiento.

El neonicotinoide puede aplicarse en una dosis letal y/o durante un tiempo letal.

En los tratamientos subletales, los factores reguladores y las buenas prácticas pueden requerir que se tomen medidas para evitar que se suelten al medio ambiente los ectoparásitos que se han quitado. Por lo tanto, las formas de realización de la invención comprenden una etapa final para impedir que se suelten al medio ambiente los ectoparásitos que se han quitado.

El neonicotinoide puede aplicarse a una temperatura de 4-18 °C, de 4-16 °C, de 5-15 °C, de 10-14 °C o de 12-14 °C.

También se describe una composición usada para tratar una infestación de ectoparásitos en un pez que comprende uno o más ectoparasiticidas, donde uno del uno o más ectoparasiticidas es el neonicotinoide usado según la presente invención.

25 La composición puede comprender un ectoparasiticida. Es decir, la composición incluye solo el neonicotinoide y excluye otras formas de ectoparasiticida.

Así, por ejemplo, una composición puede comprender un neonicotinoide pero excluir uno o más de los agentes seleccionados de: un carbamato, un organofosfato, un piretroide, una piretrina, un clonicotinilo, un fenilpirazol, una oxadiazina, un pirazol o un compuesto organoclorado.

30 No es suficiente que el neonicotinoide mate o, si no, inmovilice los piojos de mar en el pez. En lugar de eso, los piojos de mar deben separarse del pez para permitir la recogida de los piojos de mar, ya sean vivos o muertos, opcionalmente para matarlos una vez separados. Por lo tanto, la invención permite el tratamiento de una infestación de ectoparásitos sin el requisito de matar al ectoparásito usando un tratamiento químico, sino para separar el ectoparásito y el pez de manera que pueda atraparse el ectoparásito. Cada ectoparásito que se ha quitado por el método estará en uno de los siguientes estados: vivo, moribundo y muerto. Esto es particularmente ventajoso ya que los tratamientos que matan a los ectoparásitos antes de quitarlos del pez requieren someter al pez a un procesamiento adicional para quitar los ectoparásitos muertos, y a menudo como resultado, firmemente sujetos al pez. En un contexto de acuicultura, el método también proporciona un pescado que está relativamente libre, sustancialmente libre o completamente libre de contaminación por piojos de mar.

40 Por lo tanto, la invención es útil de forma ventajosa para quitar poblaciones de ectoparásitos que exhiban un grado de resistencia al ectoparasiticida, cuya dosis requerida puede aumentar a niveles que sean poco prácticos o demasiado caros de conseguir para matar al ectoparásito. A este respecto, la invención proporciona una solución a la resistencia al tratamiento.

45 El neonicotinoide se puede aplicar durante un período de tiempo suficiente para quitar del pez el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 98 %, el 99 % o todos los ectoparásitos.

Por consiguiente, se puede deducir el tiempo efectivo apropiado. Esto puede comprender monitorizar los piojos de mar después de la administración del neonicotinoide para evaluar un nivel aceptable de desparasitación (por ejemplo el porcentaje de desparasitación), y así derivar la dosis y el período de tiempo requerido para lograr el nivel aceptable de desparasitación. Estos parámetros pueden usarse luego cuando se aplique el método en el medio sin monitorizar el nivel de desparasitación sabiendo que probablemente se alcance un nivel aceptable de desparasitación.

"Subletal" puede estar relacionado con la dosis y/o el tiempo de un tratamiento. Se puede definir con respecto al conocimiento de la dosis y/o el tiempo requerido para matar un ectoparásito. En algunas formas de realización,

"subletal" se relaciona con la dosis y/o el tiempo requerido para matar un ectoparásito que ha desarrollado un grado de resistencia al ectoparasiticida. Por lo tanto, la subletalidad puede ser un tratamiento que no mate a todos los ectoparásitos de una población, opcionalmente a temperaturas de 4-18° C.

5 Por lo tanto, las formas de realización de la invención no requieren que el neonicotinoide mate a los ectoparásitos al principio, sino que más bien se les induzca a soltarse o saltar del pez. Esto minimiza el uso de un agente potencialmente peligroso en el medio. Minimizar el tiempo de aplicación es útil en el medio donde el recinto de tratamiento puede no estar completamente aislado del entorno circundante y, por tanto, podría producirse una fuga de activos. La concentración en tales circunstancias debe mantenerse durante todo el tiempo de tratamiento, y por tanto acortar el tiempo de tratamiento puede minimizar la pérdida del agente en el medio ambiente.

10 El neonicotinoide puede ser el único ectoparasiticida administrado durante el tratamiento. Esto es ventajoso con respecto a los tratamientos combinados porque cabe esperar que los tratamientos combinados tengan un mayor impacto medioambiental negativo debido a un mayor número de efectos colaterales y aumenten la probabilidad del desarrollo de resistencia.

15 En formas de realización de la invención, después de cambiar el agua, se impide que se suelten al medio ambiente los ectoparásitos que se han quitado. Esto puede hacerse recogiendo los ectoparásitos de una muestra de agua que comprende los ectoparásitos que se han quitado.

La muestra de agua puede ser toda el agua utilizada en la invención.

20 Los ectoparásitos, ya sean vivos, muertos y/o moribundos, incluidas las cadenas de huevos, si las hay, pueden recogerse pasando la muestra a través de un filtro de malla. El experto será capaz de obtener y usar un filtro de malla adecuado para la aplicación. El filtro de malla puede tener un tamaño de agujero de al menos 30 µm, al menos 60 µm o al menos 150 µm, por ejemplo alrededor de 150, 60 o 30 µm. A modo de ejemplo, un filtro de malla adecuado para piojos de mar tendría un tamaño de agujero de alrededor de 150 µm.

25 Las formas de realización de la invención pueden comprender además recoger los ectoparásitos que se han quitado, opcionalmente concentrar los ectoparásitos y matar a cualquier parásito que quede vivo. Esto es ventajoso para garantizar que los ectoparásitos estén muertos cuando se supone que el neonicotinoide mata a los ectoparásitos, o cuando se sabe que el régimen de administración del neonicotinoide no mata sino que simplemente quita el ectoparásito. Esto ayuda a evitar que se produzcan problemas con respecto a la desensibilización del ectoparásito o de la población de ectoparásitos al neonicotinoide. El matar a cualquier parásito que quede vivo puede conseguirse por cualquier medio adecuado, tal como medios mecánicos o químicos, normalmente aplicando un ectoparasiticida.

30 Los peces, que han sido tratados en un entorno cerrado tal como un buque vivero, pueden liberarse de vuelta al medio ambiente, tal como a un corral marino.

La presente invención se describirá ahora a modo de ejemplo con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

35 la Figura 1 muestra la proporción de piojos que se han quitado del salmón con un tratamiento de inmersión con imidacloprid en cinco concentraciones (0, 10, 15, 20 y 25 mg/l); y  
la Figura 2 muestra un gráfico de Kaplan-Meier de la proporción de pez infectado en función de la duración del tratamiento en minutos (n = 10; t ≤ 56 minutos) con un tratamiento con 10 mg/l y 20 mg/l de imidacloprid.

## Ejemplos

Ejemplo 1 - Tratamiento con 10, 30 y 50 ppm de imidacloprid

### 1.1 Exposición a piojos de mar

40 Se prepararon ocho tanques de tratamiento con flujo continuo conteniendo cada uno 15 peces. Los peces eran salmones (*Salmo salar*) que tenían un peso medio de aproximadamente 270 g y eran de sexo mixto. Se recogieron y cultivaron cadenas de huevos quitadas a la hembra ovígera *Lepeophtheirus salmonis* hasta que se produjeron copepoditos infectivos. Se asignaron aleatoriamente ocho botellas que contenían aproximadamente 330-350 copepoditos a un tanque de tratamiento (para proporcionar una media de 22 piojos por pez).

45 En la preparación para la exposición, se detuvieron los flujos de agua en los tanques y se redujeron los niveles de luz. Luego se añadieron los piojos a cada tanque y los tanques se mantuvieron en total oscuridad durante 6 horas, después de lo cual se elevaron los niveles de luz y se reanudó el flujo de agua.

Los peces fueron expuestos a piojos de mar durante una semana o durante seis semanas.

1.2 Tratamiento

1.2.1 Tratamiento después de una semana de exposición

5 Una semana después de la exposición a piojos de mar, los peces en tres de los tanques fueron tratados con 10 ppm p/v, 30 ppm p/v o 50 ppm p/v de imidacloprid. Uno de los tanques se trató con DMSO al 0,03 % y otro tanque se trató con placebo con agua de mar como controles.

Para cada tanque de tratamiento se disolvió la cantidad apropiada de imidacloprid (véase la Tabla 1) en 100 ml de DMSO y se mezcló con aproximadamente 900 ml de agua de mar del tanque experimental para obtener una solución de tratamiento. El flujo de agua en los tanques experimentales se detuvo y luego se añadió la solución de tratamiento.

10 Los peces fueron expuestos durante 60 minutos a agua estática con aireación completa y se observaron durante el período de exposición. Al final del período de exposición, se vació el agua rápidamente hasta aproximadamente 1/3 del volumen, antes de que se reanudaran los flujos en los tanques.

Tabla 1

Grupo	Tipo de tratamiento	Volumen del tanque (litros)	Peso de imidacloprid utilizado en el tratamiento (g)	Línea de tratamiento, número de semanas después de la exposición a los piojos
Grupo 1	Control - agua de mar	N/A	-	1 semana
Grupo 2	Control - agua de mar/DMSO	N/A	-	1 semana
Grupo 3	10 ppm de imidacloprid	273,2	2,73	1 semana
Grupo 4	30 ppm de imidacloprid	271,6	8,15	1 semana
Grupo 5	50 ppm de imidacloprid	288,2	14,41	1 semana
Grupo 6	10 ppm de imidacloprid	293,3	2,9	6 semanas
Grupo 7	30 ppm de imidacloprid	278,4	8,4	6 semanas
Grupo 8	50 ppm de imidacloprid	292,0	14,6	6 semanas

1.2.2 Tratamiento después de seis semanas de exposición

15 Seis semanas después de que los peces fueran expuestos a piojos de mar, los peces en los tres tanques de tratamiento restantes fueron tratados con 10 ppm p/v, 30 ppm p/v o 50 ppm p/v de imidacloprid. El tratamiento se llevó a cabo de la misma manera que para los tanques de tratamiento una semana después de la exposición (véase 1.2.1). Las cantidades de imidacloprid añadidas a cada tanque de tratamiento se muestran en la Tabla 1.

- Observaciones a 50 ppm p/v

20 No se observaron piojos en la columna de agua del grupo de tratamiento de 50 ppm p/v durante las observaciones realizadas entre 2 y 6 minutos después de añadir imidacloprid.

25 Después de 12 minutos de tiempo de tratamiento, se observó que aproximadamente 10 piojos se habían desprendido del hospedador y estaban sueltos en la columna de agua. Después de 18 minutos de tiempo de tratamiento, se observaron aproximadamente 20 piojos en la columna de agua. No se registraron movimientos activos en estos piojos. 44 minutos después de añadir imidacloprid, se apreció que los piojos permanecían inactivos en el fondo del tanque. Además, se apreció que solo cinco peces estaban infectados, cada uno con un único piojo. 53 minutos después de añadir imidacloprid, solo 2-3 peces parecían tener una infección de un único piojo. 58 minutos después de añadir imidacloprid, se apreció solo un piojo en un único pez. 81 minutos después de añadir imidacloprid, no se veían piojos en el pez.

30 Dos días después del tratamiento se apreció que las lesiones previamente asociadas a la alimentación y la fijación de los piojos habían desaparecido casi por completo.

- Observaciones a 30 ppm p/v

Se observaron aproximadamente 1-2 piojos en la columna de agua del tanque que contenía peces tratados con 30 ppm p/v de imidacloprid 10 minutos después de añadirlo. 18 minutos después de añadirlo había aproximadamente 10 piojos en la columna de agua. 25 minutos después de añadirlo se apreciaron aproximadamente 20 piojos en el agua y menos de 6 peces parecían estar infectados con una estimación de 1-2 piojos por pez. 33 minutos después de añadir imidacloprid, se consideró que la mayoría de los peces daban negativo en cualquier infección por piojos. Todos los piojos separados del hospedador estaban inmóviles. 47 minutos después de añadirlo, solo 3 peces parecían estar infectados, cada uno con un único piojo. 59 minutos después de añadir imidacloprid, no se veía a ningún pez infectado con piojos. Aparentemente, piojos aislados se volvieron a fijar en 4 peces, observándose 1 piojo en cuatro peces a los 78 minutos después de añadir imidacloprid. 6 minutos más tarde, no se observó ningún piojo en estos peces y todos los piojos de los tanques estaban inmóviles.

Dos días después del tratamiento se apreció que las lesiones previamente asociadas a la alimentación y la fijación de los piojos habían desaparecido casi por completo.

- Observaciones a 10 ppm p/v

No se apreciaron piojos en la columna de agua en los primeros 19 minutos después de añadir imidacloprid. 21 después de añadirlo, se observaron varios piojos nadando activamente en la columna de agua. Cuatro minutos más tarde, la mayoría de estos piojos estaban inmóviles. 54 minutos después de añadirlo, se apreciaron 2 peces infectados, cada uno parasitado por una única hembra ovígera. 86 minutos después de añadirlo, se observó que un único piojo hembra se desprendía de su hospedador. Aunque no se observó directamente, se apreció que la hembra ovígera que quedaba se había desprendido de su hospedador. 91 minutos después de añadirlo, se observó un único piojo macho en la cabeza de su hospedador. Se observó este piojo en su hospedador durante al menos cinco días después del tratamiento.

1.2.3 Finalización

Ocho semanas después de que los peces fueran expuestos a piojos de mar, se terminó el estudio. Los peces se sobreenestesiaron con MS222 (metanosulfonato de tricaina) y se descerebraron y desmedularon usando una herramienta Ikijime. Se registró la longitud y el peso de cada pez y los síntomas externos. Se quitaron todos los piojos de cada pez y se anotó el sexo y el estadio de desarrollo. Los piojos se almacenaron en etanol y se confirmaron el sexo y el estadio usando un estereomicroscopio.

Los recuentos finales de piojos se realizaron a ciegas y los resultados se muestran en la Tabla 2. Los datos se expresan como prevalencia y abundancia. La prevalencia se define como el número de hospedadores infectados con uno o más individuos de una especie de parásito dividido por el número de hospedadores examinados (incluyendo hospedadores infectados y no infectados) y expresado como un porcentaje.

Tabla 2

Tratamiento	Prevalencia	Abundancia (y clase) de piojos machos adultos	Abundancia (y clase) de piojos hembras adultas	Abundancia (y clase) de hembras ovígeras	Abundancia media (y clase) o todos los estadios de los piojos
Control con DMSO	100	1,2 (0-4)	0 (0-0)	1,47 (0-4)	2,67 (1-6)
Control con agua de mar	93,33	2 (0-7)	0,067 (0-1)	1,8 (0-6)	3,87 (0-11)
1 semana de exposición + 10 ppm de imidacloprid	100	0,87 (0-2)	0,067 (0-1)	1,47 (0-3)	2,4 (1-5)
1 semana de exposición + 30 ppm de imidacloprid	93,33	0,8 (0-1)	0 (0-0)	1,4 (0-3)	2,2 (0-4)
1 semana de exposición + 50 ppm de imidacloprid*	100	1,23 (0-3)	0 (0-0)	1,69 (0-5)	2,92 (0-7)
6 semana de exposición + 10 ppm de imidacloprid	0	0	0	0	0
6 semana de exposición + 30 ppm de imidacloprid	0	0	0	0	0
6 semana de exposición + 50 ppm de imidacloprid	0	0	0	0	0

Tratamiento	Prevalencia	Abundancia (y clase) de piojos machos adultos	Abundancia (y clase) de piojos hembras adultas	Abundancia (y clase) de hembras ovígeras	Abundancia media (y clase) o todos los estadios de los piojos
*Se sacaron dos peces de este grupo de tratamiento. Pez 1: Largo de horquilla 316 mm, peso total 452 g. Se recuperaron 3 machos adultos y 6 hembras adultas. Pez 2: Largo de horquilla 290 mm, peso total 379 g. Se recuperaron 1 macho adulto y 1 hembra adulta.					

5 No se consideró que la prevalencia de infección de todos los estadios de los piojos en los peces examinados en la semana 8 difiriera entre los dos grupos de control y en los peces tratados con 10, 30 o 50 ppm p/v de imidacloprid una semana después de la exposición. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, no se recuperaron piojos de los peces tratados con 10, 30 o 50 ppm p/v de imidacloprid seis semanas después de la exposición a los piojos de mar. Se consideró que el tratamiento era 100% efectivo en todas las dosis de tratamiento contra los estadios parasíticos móviles de los piojos.

10 No se observaron diferencias significativas en la abundancia general de piojos en los peces tratados una semana después de la exposición en comparación con el control con DMSO; se evidenció una pequeña diferencia en la abundancia de piojos en comparación con los controles de agua de mar, pero no se consideró significativo. De manera similar, se observaron pocas diferencias entre la abundancia de piojos machos recuperados de los peces tratados una semana después de la exposición y los grupos de control. No se apreciaron diferencias significativas en la abundancia de hembras ovígeras entre los peces tratados una semana después de la exposición y los grupos de control.

#### Ejemplo 2 - Optimización de la concentración del tratamiento

##### 2.1 Exposición a piojos de mar

15 120 salmones (*Salmo salar*) se dividieron en cinco tanques de tratamiento con flujo continuo y se aclimataron durante 24 horas antes de su exposición a los parásitos.

Se recogieron y cultivaron cadenas de huevos quitadas a la hembra ovígera de *Lepeophtheirus salmonis* hasta que se produjeron copepoditos infectivos. A continuación, los copepoditos se distribuyeron uniformemente en cinco botellas que contenían agua de mar y se almacenaron a ~10 °C durante la noche.

20 En la preparación para la exposición, se detuvieron los flujos de agua en los tanques de tratamiento y se redujeron los niveles de luz. Se añadieron 650 ±20 copepoditos (~27 por hospedador) al agua estática y los tanques se mantuvieron en total oscuridad durante 7 horas, después de lo cual se elevaron los niveles de luz y se reanudó el flujo de agua.

##### 2.2 Estudio de eficacia relativa

25 Los peces se dividieron aleatoriamente en diez grupos de diez peces y se mantuvieron en "cubetas de tratamiento" estáticas que contenían 30 l de agua y alta aireación como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Grupo	Concentración de imidacloprid (mg/l)	Duración del tratamiento (minutos)	N.º de réplicas	Número total de peces/rep.
1 y 2	0	60	2	10
3 y 4	10	60	2	10
5 y 6	15	60	2	10
7 y 8	20	60	2	10
9 y 10	25	60	2	10

Ocho de los grupos (3-10) fueron tratados con las concentraciones requeridas de imidacloprid durante 60 minutos: se disolvió imidacloprid en DMSO y se añadió a ~1 l de agua del tanque antes de añadirlo a las cubetas de tratamiento. El grupo restante y su réplica (1 y 2) fueron controles con DMSO al 0,03 %.

30 Los animales del experimento se monitorizaron atentamente para detectar reacciones adversas y el estado de la infección por parásitos. Siempre que fue posible, se registró el momento en que se creía que todos los parásitos se

habían desprendido. Como los tratamientos se realizaron en sistemas estáticos, la temperatura y el oxígeno disuelto se monitorizaron regularmente durante todo el procedimiento y la aireación se ajustó según se requería.

Después del período de tratamiento, los animales de la prueba se sacaron de la solución de tratamiento y se sacrificaron compasivamente. Cada pez se pesó, se midió y se evaluó su carga parasitaria individual. El número de parásitos en la solución de tratamiento también se contó y se evaluó cualitativamente por: sexo y madurez, signos aparentes de envenenamiento por neonicotinoides y/o recuperación potencial.

#### - Resultados

La proporción total de piojos quitados en las cuatro concentraciones de tratamiento 10, 15, 20 y 25 mg/l de imidacloprid combinado con una concentración de DMSO del 0,03 % se muestra en la Tabla 4 y la Figura 1 (n = 2, t = 60 minutos, las barras de error indican  $\pm$ EEM).

Tabla 4

Grupo	Concentración de imidacloprid (mg/l)	Réplica	Primer pez fuera (min después de añadir imidacloprid)	Último pez fuera (después de añadir imidacloprid)	Eliminación total estimada de parásitos (min después de añadir imidacloprid)
1	0	1	60	65	n/a
2	0	2	60	65	n/a
3	10	1	60	65	n/a
4	10	2	60	65	46
5	15	1	58	64	33
6	15	2	60	66	43
7	20	1	59	64	32
8	20	2	60	65	38
9	25	1	60	66	31
10	25	2	60	66	22

Las cuatro dosis de tratamiento eliminaron el 80-100 % de la infección parasitaria durante un tratamiento de 60 minutos.

Se utilizó la regresión logística para comparar la eliminación de parásitos después del tratamiento con cada una de las concentraciones. Los análisis de regresión logística se realizaron utilizando la función de modelo lineal generalizado (GLM, por sus siglas en inglés) en R v.2.13.0 y asumieron una distribución de errores binomial o quasibinomial (determinada a través de la comparación de la desviación nula con los grados de libertad).

Se determinó que la eliminación de parásitos en todas las concentraciones de tratamiento era significativamente mayor que la de 0 mg/l ( $p < 0,01$ ). Aunque la eliminación fue significativamente mayor con 25 mg/l ( $97 \pm 3$  %) que con 10 mg/l ( $80 \pm 11$  %) ( $p < 0,05$ ), no se pudo determinar una diferencia significativa en la eficacia entre concentraciones iguales o superiores a 15 mg/l ( $92 \pm 4$ %) ( $p > 0,4$ ). La eliminación de parásitos cuando los animales hospedadores se trataron con 20 mg/l fue de  $92 \pm 7$  %. En resumen, el imidacloprid eliminó eficazmente *L. salmonis* de su hospedador en todas las concentraciones probadas.

#### 2.3 Estudio de determinación de la velocidad

Se observó que los piojos de mar expuestos a 10 mg/l de imidacloprid parecían tardar más en caerse del hospedador en comparación con los expuestos a 30 mg/l.

Con el fin de cuantificar la relación entre la concentración y el tiempo para hacer efecto, veinte animales hospedadores se asignaron aleatoriamente a una concentración de tratamiento de 10 o 20 mg/l de imidacloprid (10 peces por concentración). La logística del estudio de determinación de la velocidad fue esencialmente la misma que la del estudio de eficacia relativa, con la excepción de que los peces se sacaron de la solución de tratamiento y se sacrificaron tan pronto como se produjo la eliminación total de parásitos, reduciendo así el tiempo bajo el procedimiento y las cuestiones de bienestar asociadas.

## - Resultados

El tratamiento con 10 mg/l y 20 mg/l de imidacloprid dio como resultado la eliminación total de parásitos de los hospedadores. Los animales del experimento se monitorizaron atentamente durante todo el procedimiento y el tiempo hasta la eliminación total se registró hasta el último minuto. Este evento representó el punto final del experimento y los animales se sacaron y se sacrificaron en ese momento.

Se utilizó el análisis de supervivencia para determinar si el tiempo hasta la eliminación de parásitos era significativamente diferente entre 10 mg/l y 20 mg/l. La Figura 2, que representa visualmente las velocidades como un gráfico de Kaplan-Meier y Mantel-Cox (prueba del orden logarítmico), determina que no hay diferencia significativa entre ellas ( $p = 0,48$ ,  $n = 10$ ,  $t \leq 56$  minutos). Los resultados muestran que la concentración de imidacloprid no influye en el tiempo hasta la eliminación de parásitos y estima un tiempo letal del 50 % (TL50) para ambas concentraciones de ~27,5 minutos.

Este estudio determinó que 15 mg/l era la concentración óptima dentro del intervalo probado; no se observó un aumento estadísticamente significativo en la eficacia por encima de esta concentración. Además, no se pudo establecer ninguna relación entre la concentración y el tiempo hasta hacer efecto, es decir, la probabilidad de la eliminación total de parásitos en un hospedador individual en cualquier punto del tiempo ( $\leq 56$  minutos) no fue significativamente diferente con 10 o 20 mg/l de imidacloprid.

## 2.4 Recuperación de piojos de mar

En el punto de muestreo para el estudio de eficacia relativa (véase 2.2), un número de parásitos permanecieron fijados a sus hospedadores (20 % de los expuestos a 10 mg/l, 8 % de los expuestos a 15 y 20 mg/l y 3 % de los expuestos a 25 mg/l).

Los parásitos expuestos a imidacloprid, tanto en los estudios de eficacia relativa como en los de determinación de la velocidad (tanto los que se quitaron manualmente de su hospedador después del tratamiento como los que se desprendieron durante el tratamiento), se sumergieron en agua de mar limpia y se observaron los signos de recuperación.

En el momento de la primera observación, se determinó que los individuos expuestos estaban muertos o aún activos. De los que seguían activos, la excitación muscular era descoordinada, descontrolada y limitada. Estos individuos eran claramente incapaces de llevar a cabo sus funciones básicas (fijación al hospedador y movimiento con un objetivo), lo que sugiere que los parásitos que permanecieron fijados a su hospedador después del tratamiento podrían haberse desprendido posteriormente aguas abajo.

Durante el período posterior a la exposición (hasta 6 horas) no se apreciaron signos claros de recuperación funcional en ninguno de los parásitos expuestos a imidacloprid en cualquier concentración.

## Ejemplo 3 - Tratamiento de infestación de piojos de mar en un buque vivero

Los salmones que tratar se reunieron en una jaula de acuicultura estándar y luego se succionaron con bombas a un estanque oxigenado de un buque vivero hasta una densidad de peces en cada estanque de 90 o 120 kg por metro cúbico de agua. Se añadió al estanque imidacloprid mezclado previamente en una dosis de 20 ppm p/v. Luego, se trataron los peces durante un período de 60 minutos. Al final del período de tratamiento, los peces fueron succionados con bombas desde el estanque y se les quitó el agua para garantizar que el agua tratada fuera devuelta al estanque. Para hacerlo, los peces fueron pasados sobre una rejilla o barras de nivelación y también se enjuagaron con agua de mar no tratada para eliminar cualquier residuo del agua de tratamiento del exterior de los peces antes de su regreso al corral marino. Toda el agua del enjuague se retuvo después de su uso.

El agua se pasó a través de un filtro de malla con un tamaño de malla de alrededor de 50  $\mu\text{m}$  o alrededor de 150  $\mu\text{m}$  para eliminar la materia orgánica, incluidos los piojos de mar moribundos y muertos y sus cadenas de huevos.

Ejemplo 4 - Tratamiento para especies de piojos de mar *L. salmonis* y *Caligus* en el medio

La eficacia de imidacloprid contra las infecciones en el salmón del Atlántico de piscifactoría por *L. salmonis* y *Caligus* sp. en los estadios de preadulto y adulto se investigó contando los piojos de mar antes y después del tratamiento en el salmón sometido a un tratamiento con imidacloprid. Este ensayo se realizó en una granja comercial de salmón en Noruega. Los salmones se succionaron con bombas a un buque vivero y fueron expuestos a 20 ppm de imidacloprid durante 60 minutos. El peso medio del salmón era de 3,5 kg y el número medio de salmones por corral era de 180.000. Se evaluaron 30 peces por corral con respecto a *L. salmonis* y *Caligus* sp., y se registró el número según el estadio de vida de cada *L. salmonis* encontrado. Esto se realizó en las 24 horas antes del tratamiento, y en las 24 horas después del tratamiento.

Estas evaluaciones se realizaron en cuatro corrales de salmones en total. Antes del tratamiento, los peces se reunieron dentro del corral para poder ser succionados con bombas al buque vivero, que es donde se realizaron las evaluaciones de piojos de mar previas al tratamiento. Las evaluaciones de piojos de mar después del tratamiento se realizaron sacando los peces de la tubería de salida en el buque vivero.

- 5 Todas las veces se sacaron 3 peces y se colocaron en un baño anestésico. Esto se repitió 10 veces hasta haber evaluado 30 peces.

Los números de piojos de mar observados por pez para este ensayo por cada uno de los cuatro corrales probados según el estado del ciclo de vida de los piojos de mar antes o después de la administración del activo se presentan en la Tabla 5. Se observaron todos los peces a lo largo del tratamiento sin que se observaran comportamientos adversos.

10

Tabla 5 - recuentos de piojos de mar antes y después del tratamiento

Estadio	Corral A		Corral B		Corral C		Corral D	
	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después
Chalimus	1,2	0,5	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Macho preadulto	1,8	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Hembra preadulto	1,9	0,0	1,1	0,0	0,4	0,0	0,6	0,0
Macho adulto	0,9	0,0	1,0	0,0	1,7	0,0	0,8	0,0
Hembra adulta	2,0	0,0	0,8	0,0	1,0	0,0	0,8	0,0
Hembra grávida	0,5	0,0	0,4	0,0	0,4	0,0	0,3	0,0
Total	8,3	0,0	4,0	0,0	3,6	0,0	2,5	0,0
<i>Caligus</i>	2,9	0,0	0,7	0,1	3,0	0,0	0,5	0,0

Por lo tanto, el tratamiento con imidacloprid es eficaz en el medio contra los piojos de mar *L. salmonis* y *Caligus* sp.

Ejemplo 5 - Escala de tiempo del efecto de imidacloprid contra piojos de mar

- 15 Para determinar la escala de tiempo del efecto de imidacloprid, los salmones infectados con piojos de mar preadultos y adultos se sacaron de un tanque de almacenamiento y se mataron con un golpe seco en la cabeza. Se suspendieron los peces en 30 litros de agua con 0, 20, 50, 100, 200 o 500 ppm de imidacloprid, y se observaron piojos de mar durante 30-60 minutos para controlar si abandonaban a su hospedador y cuándo.

- 20 En el caso de peces expuestos a 0 ppm de imidacloprid (controles negativos), se realizaron observaciones durante 60 minutos. Con la excepción de un único pez expuesto a 500 ppm de imidacloprid que se observó durante 60 minutos, todos los otros peces tratados se observaron durante 30 minutos. Se hicieron pruebas en tres peces por grupo de tratamiento.

Se anotaron observaciones sobre el momento en que los piojos abandonaron al hospedador, y el sexo y el estadio del piojo de mar. Todo piojo que abandonó al hospedador fue transferido inmediatamente a agua de mar limpia. Además, todo piojo que permanecía en el hospedador al final del período de exposición se retiró del hospedador y se transfirió a agua de mar limpia.

- 25 Se observaron los piojos poco después y aproximadamente 2 horas después del final del período de exposición.

La proporción de piojos de mar machos y hembras era de alrededor de 50:50. La temperatura del agua era de alrededor de 12 °C.

- 30 Los piojos de peces muertos mantenidos en agua de mar no tratada no abandonaron al hospedador durante un período de observación de sesenta minutos y mostraron un movimiento normal una vez transferidos a placas de Petri. Estos movimientos incluían nadar y el movimiento típico y controlado de los apéndices.

Poco después se administró imidacloprid, se observó que los piojos experimentaban dos cambios notables: en primer lugar, los márgenes laterales del caparazón tiraron hacia adentro dando a los piojos una apariencia jorobada y, al hacerlo, se levantó la parte inferior del piojo separándose del pez, y en segundo lugar, el abdomen de los individuos afectados se levantó en un ángulo de aproximadamente 45° con respecto a la superficie del pez.

Antes de abandonar al hospedador, los piojos generalmente se volvían muy activos, moviéndose sobre la superficie del pez, a menudo en un patrón circular. Una vez que abandonaban a los peces se movían en una amplia espiral, un movimiento hacia abajo, antes de quedar inmóviles en el fondo del tanque de pruebas.

5 En grupos expuestos a entre 20 y 200 ppm de imidacloprid, alrededor del 50 % de los piojos abandonaron al hospedador en los primeros 15 minutos. En peces expuestos a 500 ppm de imidacloprid, alrededor del 70% de los piojos abandonaron al hospedador en los primeros 9 minutos. Los piojos restantes permanecieron en el hospedador hasta el final del período de exposición. Los piojos en el hospedador experimentaron una compresión lateral del caparazón durante el tratamiento dando lugar a una apariencia jorobada de los piojos.

Por lo tanto, la mayoría de los piojos de mar abandonaron al hospedador tratado en 15 minutos.

10 Los piojos machos parecían ser más propensos a abandonar al hospedador en comparación con las hembras. Los piojos expuestos a imidacloprid mostraron normalmente una pérdida total de movilidad y contracciones rápidas en los apéndices. Los piojos hembras mostraron menos movimientos en los apéndices en comparación con los machos, pero mostraron movimientos peristálticos del intestino en comparación con los machos.

– Observaciones de piojos separados del huésped (en agua de mar limpia)

15 Control negativo: los piojos no expuestos a imidacloprid mostraron comportamientos típicos de piojos quitados de su hospedador. Esto incluía nadar activamente y un movimiento peristáltico del intestino. El movimiento de los apéndices se consideró metódico y controlado. Los piojos eran reactivos al estímulo físico, alejándose activamente.

20 20 ppm: de los 49 piojos expuestos a 20 mg/L de imidacloprid, dos se consideraron muertos a los 30 minutos posteriores a la exposición (p.e.). Cuando se tocaron con unas pinzas, los piojos se cayeron del lado de la placa de Petri, se giraron boca abajo y nadaron una corta distancia. Sin embargo, la natación era errática y parecía ser causada por el mayor movimiento de la mayoría de los apéndices. Los piojos restantes se consideraron moribundos con contracciones rápidas de sus apéndices, incluidos la pata, el segundo maxilar y la antena primaria. Se apreció peristaltismo del intestino en las hembras expuestas a 20 ppm de imidacloprid durante 30 minutos. Doce de 49 fueron consideradas vivas y reactivas, nadando activamente sin estímulos. Ningún piojo expuesto durante 30 minutos mostró signos de recuperación.

30 50 ppm: de los 21 piojos expuestos a 50 ppm de imidacloprid, cuatro se consideraron muertos a los 30 minutos. Se apreciaron contracciones de los apéndices principales en los piojos restantes con la excepción del peristaltismo que se apreció en dos hembras adultas expuestas durante 30 minutos. 14 piojos examinados a las 2 horas p.e. se consideraron muertos, no se detectó movimiento. Dos individuos tenían contracciones en una pata y cuatro hembras adultas mostraron movimiento peristáltico del intestino.

35 100 ppm: de los 28 piojos expuestos a 100 ppm de imidacloprid, cuatro se consideraron muertos al final del período de exposición. Los piojos mostraban normalmente contracciones de las antenas secundarias y del segundo maxilar. Otros 11 piojos mostraron movimientos peristálticos del intestino. Se apreció una compresión lateral del caparazón en un número de individuos. A las 2 horas p.e. se consideraron muertos 17/28 piojos. El movimiento peristáltico del intestino se observó en 9 de 28 piojos 2 horas p.e.; todos eran hembras adultas. Finalmente, una antena de un piojo y una pata 4 de otro piojo mostraron movimientos de contracción limitados a las 2 horas p.e.

40 200 ppm: de los 26 piojos expuestos a 200 ppm de imidacloprid, cuatro se consideraron muertos al final del período de exposición. Los piojos restantes estaban normalmente inmóviles excepto por la contracción de la antena secundaria, y se apreció un movimiento peristáltico del intestino en cuatro piojos hembra adultos. La contracción del ano de un piojo se apreció a los 30 minutos p.e. Seis piojos se consideraron muertos a las 2 horas posteriores a la exposición. Además, se registraron contracciones limitadas en los animales restantes y consistían principalmente en contracciones de las antenas primaria y secundaria y peristaltismo del intestino en 3 hembras adultas.

45 500 ppm: seis de 20 piojos se consideraron muertos a los 30 minutos p.e. Se registró que, de estos, dos mostraban peristaltismo intestinal o contracciones menores 2 horas más tarde. Los piojos restantes examinados a los 30 minutos p.e. fueron tipificados por contracciones rápidas de la primera y segunda antena, con algunas contracciones de los maxilípedos y movimiento peristáltico del intestino en 4 individuos. A las 2 horas p.e. se consideraron muertos 15/20 piojos. Tres piojos mostraron contracciones de las antenas secundarias y se registró peristaltismo intestinal en dos piojos.

Ejemplo 6 - Comparación con azametifos y deltametrina en piojos de mar aislados

50 Se utilizaron estadios tanto preadultos como adultos (estadios móviles) de ambos sexos, y se distribuyeron equitativamente entre los grupos. Los piojos de mar fueron expuestos a imidacloprid durante 60 minutos, a azametifos durante 60 minutos y a deltametrina durante 30 minutos en baños de un litro en un intervalo de concentraciones

(Tablas 6, 7 y 8). Los piojos de mar se transfirieron a agua de mar aireada limpia después del tratamiento. La temperatura del agua de mar durante el experimento fue de 12 °C, pero durante la exposición la temperatura se elevó a aproximadamente 14 °C en regímenes expuestos durante 60 minutos (imidacloprid y azametifos) y a 13 °C para el régimen expuesto en 30 minutos (deltametrina).

- 5 Los números de piojos vivos e inmovilizados (incluidos los muertos) en cada régimen se registraron aproximadamente 20 h después del final de la exposición. Cada piojo se investigó individualmente.

El efecto proporcional de imidacloprid, azametifos y deltametrina en esta prueba *in vitro* se muestra en las Tablas 6, 7 y 8.

Tabla 6 - efecto de imidacloprid en piojos de mar

Dosis (ppm)	Vivos	Inmovilizados	% de efecto
0	9	0	0
0	11	0	0
5	7	3	30
5	7	3	30
10	5	5	50
10	6	4	40
15	0	10	100
15	0	10	100
20	0	10	100
20	0	10	100
30	0	10	100
30	0	10	100

10

Tabla 7 - efecto de azametifos en piojos de mar

Dosis (ppm)	Vivos	Inmovilizados	% de efecto
0	11	0	0
0	11	0	0
5	10	0	0
5	10	0	0
10	9	1	10
10	9	1	10
15	10	0	0
15	10	0	0
20	9	1	10
20	8	2	20
30	9	1	10
30	6	4	40

Tabla 8 - efecto de deltametrina en piojos de mar

Dosis (ppm)	Vivos	Inmovilizados	% de efecto
0	10	0	0
0	11	0	0
5	10	0	0
5	10	0	0

## ES 2 937 941 T3

Dosis (ppm)	Vivos	Inmovilizados	% de efecto
10	10	0	0
10	9	2	18,2
15	8	2	20
15	9	1	10
20	8	2	20
20	9	1	10
30	10	1	9,1
30	8	2	20

El valor estimado de la CE<sub>50</sub> para imidacloprid fue de 7,6 ppm, y el valor estimado de la CE<sub>90</sub> para imidacloprid fue de 14,4 ppm. No se calcularon los valores de la CE<sub>50</sub> y CE<sub>90</sub> para azametifos y deltametrina.

Ejemplo 7 - Dependencia de la concentración y del tiempo del tratamiento con imidacloprid *in vivo*

- 5 Para determinar la dependencia de la concentración y del tiempo del tratamiento con imidacloprid *in vivo*, salmones del Atlántico (con un promedio de 320,9 g) fueron expuestos a imidacloprid en agua de mar (32,5 % de salinidad) a 12 °C. El nivel de agua en el tanque se redujo y se empleó aireación durante la administración del activo. El cultivo de copepoditos de piojo de salmón se contó y ajustó para obtener un nivel objetivo de alrededor de 40 copepoditos por pez en el tanque de exposición en cada momento de la exposición.
- 10 Los piojos del salmón en los peces se contaron utilizando métodos estándares. Solo se investigaron piojos en la superficie externa de los peces, sin incluir las branquias ni las cavidades orales/bucales.
- 15 Se registraron los números de piojos disociados en el agua del tanque o fijados a las paredes del tanque. Los piojos en el agua del tanque se recogieron y evaluaron para determinar la capacidad de fijarse por succión a una superficie plástica lisa inmediatamente después del tratamiento y nuevamente después de 30-60 minutos (para evaluar una posible reanimación). Los piojos vivos y viables también se recogieron de los grupos de control con tratamiento simulado como referencia y se mantuvieron en cámaras de reanimación durante el mismo período de tiempo para evaluar el sistema.
- 20 El comportamiento/aspecto de los peces se evaluó *in vivo* durante cada prueba. Se registró cualquier cambio en el comportamiento y/o el aspecto, incluyendo la mortalidad. Ningún pez murió en el ensayo ni se realizó ninguna autopsia.
- 20 Las soluciones de prueba del activo se prepararon (se añadieron y homogeneizaron con agua de mar) y se administraron a un volumen de tratamiento de 40 litros.
- 25 Tres peces infectados con piojos de mar del tanque de espera se reunieron aleatoriamente y se condujeron cuidadosamente a un barril que formaba un compartimento interno (diámetro = 34,5-40 cm; altura = 54 cm) que se sumergió en el tanque y cuya base se había reemplazado con una pantalla de malla de plástico con agujeros cuadrados de 9 mm<sup>2</sup>.
- 25 Los peces se transfirieron al compartimento interno dentro de los 3 minutos de cada inicio de prueba. El compartimento interno se suspendió/sumergió en el tanque de espera pendiente de tratamiento. Los tratamientos y tratamientos simulados se implementaron vaciando el compartimento interno con peces y transfiriéndolo a un barril que contenía la solución de prueba. Los tratamientos/tratamientos simulados se realizaron en agua estática con aireación/oxigenación. La aireación se ajustó para establecer la saturación de oxígeno al 70-100 %.
- 30 Para terminar el tratamiento, el compartimento interno con los peces tratados se elevó a la superficie y se vació, luego los peces se transfirieron directamente y sin agua a una segunda batea con una sobredosis letal de anestésico y se dejaron morir. Se registraron todos los piojos que quedaban en estos peces y piojos que se cayeron en el baño anestésico.
- 35 Los piojos restantes en el baño de tratamiento se filtraron a través de una red para plancton (tamaño del poro de 2 mm) que se suspendió en un baño de agua con agua de mar limpia. Los piojos en este colector se transfirieron a un vaso de precipitados de plástico (1 litro) y luego nuevamente a un tubo de reanimación (5 cm de diámetro, 10 cm de longitud). Los piojos que eran capaces de fijarse a las paredes de los tanques de tratamiento o del vaso de precipitados dentro de los 3 minutos tras la finalización de cada prueba se calificaron como viables. Los piojos que no se fijaron a

la pared se monitorizaron durante 30-60 minutos en el tubo de reanimación. Los piojos que parecían ser viables en los tubos de reanimación después de 30-60 minutos y los que no lo eran se puntuaron en categorías separadas.

Los controles de tratamiento simulado se llevaron a cabo de una manera similar.

5 Cada pez tenía una media de 11 piojos por pez antes del tratamiento. Los tiempos de exposición con imidacloprid variaron de 3 a 60 minutos, y las dosis variaron de 20 ppm a 200 ppm.

Ningún pez murió en el ensayo.

La Tabla 9 muestra el porcentaje de piojos quitados de los peces mediante el tratamiento con imidacloprid.

Tabla 9 - Resultados de tratamientos de baños con imidacloprid

Dosis (ppm)	Duración del tratamiento (minutos)				
	3	5	15	30	60
0 (control)	0 <sup>24</sup> /0 <sup>16</sup>	-	-	-	0 <sup>18</sup> /7,3 <sup>23</sup>
20	-	-	-	63,9 <sup>36</sup>	74,1 <sup>27</sup>
50	-	-	-	91,3 <sup>23</sup>	-
100	7,0 <sup>43</sup>	-	73,7 <sup>38</sup>	-	-
200	-	55,9 <sup>34</sup>	91,5 <sup>47</sup>	-	-

10 La Tabla 9 muestra el porcentaje de piojos quitados de los peces después del tratamiento en relación con el número total de piojos. Los grupos de control negativo a los 3 y 60 minutos se duplicaron. Los números en superíndice indican el número total de piojos en los 3 peces en cada prueba.

Por lo tanto, imidacloprid fue eficaz para quitar piojos utilizando períodos de tiempo de tratamiento.

15 La Tabla 10 muestra el porcentaje de los piojos de mar que se desprendieron de los peces por el tratamiento, y de los piojos de mar que permanecieron unidos durante el tratamiento pero que se recogieron posteriormente, los cuales permanecieron activos a los 30-60 minutos después del tratamiento.

Tabla 10 - Velocidades de reanimación de los piojos de mar

Régimen de la prueba	% de piojos que estaban activos a los 30-60 min. posteriores al tratamiento			
	Piojos desprendidos recogidos del agua del tanque		Piojos fijados recogidos de los peces	
	n.º piojos	% activos	n.º piojos	% activos
Control a los 3 min	0	NA	0	NA
Control a los 3 min	0	NA	26	7,7
Control a los 60 min	0	NA	0	NA
Control a los 60 min	3	0,0	16	50,0
Imidacloprid 20 ppm 30 min	23	4,3	9	11,1
Imidacloprid 20 ppm 60 min	20	0,0	0	NA
Imidacloprid 50 ppm 30 min	31	0,0	0	NA
Imidacloprid 100 ppm 3 min	3	33,3	0	NA
Imidacloprid 100 ppm 15 min	28	0,0	0	NA
Imidacloprid 200 ppm 5 min	13	0,0	13	0,0
Imidacloprid 200 ppm 15 min	43	0,0	0	NA

Por lo tanto, los piojos de mar responden al imidacloprid desprendiéndose. Algunos de los piojos de mar tratados parecen seguir siendo viables. Los piojos de mar desprendidos (y muertos) potencialmente viables se quitan usando filtración del agua de tratamiento.

5 A modo de comparación, los peces infectados con piojos de mar de las mismas fuentes se trataron con azametifos a 0,1 mg/l y deltametrina a 0,2 µl/l durante 30 minutos, según las pautas de administración recomendadas. Los tratamientos se llevaron a cabo en condiciones similares a las tratadas con imidacloprid. También se administró un control de tratamiento simulado. Cada condición de tratamiento se administró por duplicado. Los resultados de este estudio comparativo se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11 - Resultados de tratamientos de baños con azametifos y deltametrina

Compuesto	% Desparasitación
Control 1	0 <sup>29</sup>
Control 2	0 <sup>42</sup>
Deltametrina 1	0 <sup>37</sup>
Deltametrina 2	0 <sup>37</sup>
Azametifos 1	3,8 <sup>52</sup>
Azametifos 2	3,0 <sup>33</sup>

La Tabla 11 muestra el porcentaje de piojos quitados de los peces después del tratamiento en relación con el número total de piojos. Los números en superíndice indican el número total de piojos en los 3 peces en cada prueba.

10 Por lo tanto, los piojos de mar permanecen sustancialmente fijados al pez en respuesta a la deltametrina o a los azametifos a diferencia con el efecto observado con imidacloprid en el que los piojos de mar se desprenden del pez.

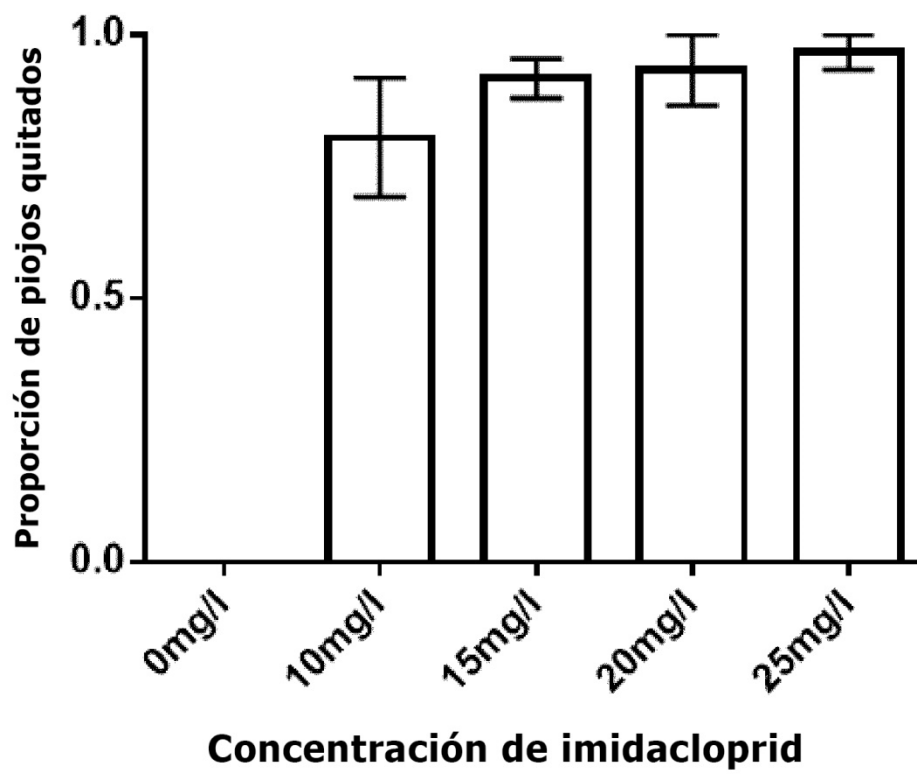
#### Ejemplo 8 - Seguridad del imidacloprid

15 Se evaluó la seguridad del tratamiento con imidacloprid en peces. Los peces mantenidos en un tanque de flujo continuo que contenía 271,8 l de agua de mar fueron expuestos a 65 ppm p/v del ingrediente activo imidacloprid. Se disolvieron 17,67 g de imidacloprid en 100 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) y la solución se añadió a aproximadamente 900 ml de agua de mar y se mezcló. El flujo continuo en el tanque se detuvo y se añadió la solución de imidacloprid.

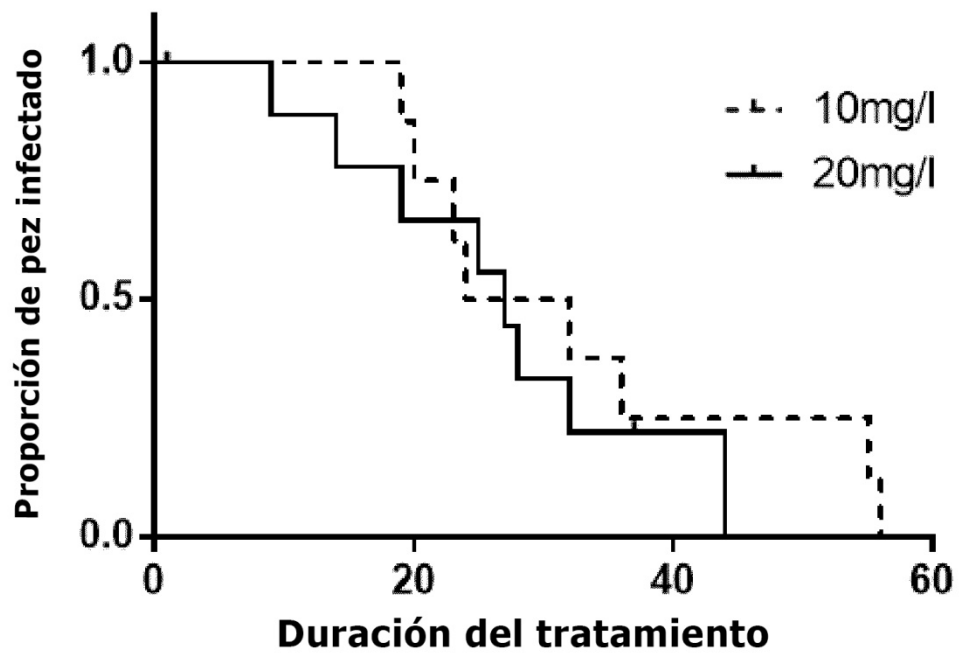
20 Los peces fueron expuestos a 65 ppm de imidacloprid en agua estática durante 1 hora y se observaron sus cambios de comportamiento en intervalos de 5-10 minutos. Luego los peces se mantuvieron durante otros 7 días antes de terminar. No se apreciaron cambios observables en el comportamiento de los peces durante el período de exposición. Los peces se monitorizaron durante otros 7 días sin que se apreciaran reacciones adversas. Al finalizar, no se apreciaron patologías externas.

**REIVINDICACIONES**

1. Neonicotinoide usado para quitar ectoparásitos a un pez en el agua, donde el neonicotinoide se aplica durante 180 minutos o menos,  
donde, después de quitar los ectoparásitos al pez, el agua que comprende los ectoparásitos que se han quitado se cambia con agua de recambio, separando así los ectoparásitos que se han quitado y el pez, donde los ectoparásitos son piojos de mar, y donde el neonicotinoide no está configurado ni formulado para su administración en la alimentación.
2. Neonicotinoide para su uso según la reivindicación 1, donde el neonicotinoide se administra al pez en una concentración de 1-500 ppm, 1-200 ppm, 20-200 ppm, 1-64 ppm, 10-64 ppm, 10-50 ppm, 50 ppm o más, 100 ppm o más, o 200 ppm o más p/v.
3. Neonicotinoide para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el pez es un salmón, una trucha, un salvelino o un pez limpiador.
4. Neonicotinoide para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el neonicotinoide se aplica en una dosis subletal y/o durante un tiempo subletal.
5. Neonicotinoide para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el neonicotinoide es imidacloprid, clotianidina, acetamiprid, nitenpiram, nitiazina, tiacloprid o tiametoxam, o las sales o ésteres farmacéuticamente eficaces de estos.
6. Neonicotinoide para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde después de cambiar el agua, se impide que se suelten al medio ambiente los ectoparásitos que se han quitado.
7. Neonicotinoide para su uso según la reivindicación 6, donde impedir que se suelten los ectoparásitos que se han quitado comprende recoger los ectoparásitos de una muestra de agua que comprende los ectoparásitos que se han quitado.
8. Neonicotinoide para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además matar los ectoparásitos que se han quitado y que permanecen vivos, después de concentrar opcionalmente los ectoparásitos.
9. Neonicotinoide usado para tratar una infestación de ectoparásitos en un pez según una reivindicación anterior cualquiera, donde el neonicotinoide se administra al pez durante 120 minutos o menos, 60 minutos o menos, menos de 30 minutos, menos de 20 minutos, 15 minutos o menos, menos de 10 minutos, o 5 minutos o menos.



**Fig. 1**



**Fig. 2**