



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**Determinación de factores de riesgo asociados a la presentación
de brotes de Anemia Infecciosa del Salmón en *Salmo salar*
cultivados en Chile**

Pedro Jiménez Bluhm

Memoria para optar al
Título Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal

Profesor Guía: Julio Larenas Herrera

SANTIAGO – CHILE
2010



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**Determinación de factores de riesgo asociados a la presentación
de brotes de Anemia Infecciosa del Salmón en *Salmo salar*
cultivados en Chile**

Pedro Jiménez Bluhm

Memoria para optar al
Título Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal

Profesor Guía: Julio Larenas Herrera

Profesor Colaborador: Javier González Foretic

SANTIAGO – CHILE
2010

I. RESUMEN

El virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAv; *Orthomixoviridae: Isavirus*), es un agente etiológico que produce un cuadro clínico sistémico y letal únicamente en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), caracterizado por causar anemia grave y hemorragia de diversos órganos. Los primeros casos de esta enfermedad se reportaron en Noruega, en 1984. Desde el mes de julio de 2007 se han reportado continuos brotes de la enfermedad en el territorio nacional, centrándose en las regiones X y XI.

Durante el periodo comprendido entre los meses de enero a diciembre del año 2008, se muestrearon branquias, riñón anterior y corazón, de distintos centros de agua dulce y de mar de una empresa salmonera con centros ubicados entre la Región del Maule (VII) hasta la Región de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo (XI). Estas muestras fueron luego analizadas por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa reversa en tiempo real (Real time RT-PCR), con el fin de detectar la presencia del virus ISA. Además, se recolectó información epidemiológica (indicadores productivos y ambientales) durante el muestreo y posteriormente a éste, a través de los registros computarizados de cada centro productivo. De esta forma fue posible establecer así una completa base de datos para ser analizada estadísticamente.

Se encontró una relación inversamente proporcional a la presentación de brote de ISAv asociado a las siguientes variables: Peso al brote ($p=0,047$), peso al traslado ($p=0,032$) y promedio diario de oxígeno disuelto ($p=0,025$). Las variables que se relacionaron directamente proporcional con la presentación de brotes fueron: días de ayuno ($p=0,006$); carga promedio de *Caligus rogercressey* por pez y por centro ($p=0,011$), cantidad de meses en producción en mar por generación antes de presentar brote ($p=0,004$ y $p=0,005$); y mortalidad acumulada a las ocho semanas antes del brote ($p=0,03$). Además, se observó una mayor incidencia de la enfermedad durante los meses de primavera y se correlacionó positivamente el índice de predación de los sitios de cultivo con los días de ayuno ($p=0,011$).

II. SUMMARY

The infectious salmon anemia virus (ISAv; *Orthomixoviridae: Isavirus*), is an etiologic agent that produces a systemic and lethal clinical disease only in the Atlantic salmon (*Salmo salar*), characterized by a severe anemia and hemorrhage of several organs. The first cases were reported in Norway in 1984. Since the month of July of 2007 there have been continuous reports of outbreaks of the disease in the national territory, mainly in the X and XI region.

During the period ranging in between the month of January and December of 2008, samples of gills, anterior kidney and heart were taken from a variety of fresh water sites and sea sites from a salmon producing company located from the VII Maule Region to the XI General Carlos Ibañez del Campo Region. These samples were then analyzed by the reverse transcript real time polymerase chain reaction (Real time RT-PCR) method, in order to detect the presence of the ISA virus. Furthermore, epidemiological information (productive and environmental data) was collected during sampling and afterwards by means of the digitalized registries of each production site. It was therefore possible to create a complete data base that could be statistically analyzed.

An inversely proportional relation to the presence of an outbreak of ISAv was found in the following variables: Body weight at outbreak ($p=0,047$); body weight at movement to sea ($p=0,032$) and daily average of registered value of dissolved oxygen ($p=0,025$). The variables related directly proportional to the presentation of an outbreak were: days of fasting ($p=0,006$); average amount of *Caligus rogercresseyi* per fish and per site ($p=0,011$), amount of months in production at sea by generation before outbreak ($p=0,004$ and $p=0,005$); and accumulated mortality eight weeks before outbreak ($p=0,03$). Furthermore, an increased incidence of the disease was observed during the months of spring and a positive correlation was found between the sites predation index and the amount of fasting days ($p=0,011$).

II. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente al Dr. Javier González, quien me dio la posibilidad de entrar al fascinante mundo de la acuicultura, tema que aun me motiva y cautiva. Sus consejos e ideas fueron indispensables para llevar a cabo esta memoria de título. Además, ha dejado una profunda marca en el desarrollo de mi carrera profesional, senda que trataré de continuar hacia el futuro.

También quiero agradecer al Dr. Julio Larenas, por sus consejos y correcciones de esta memoria de título. Además por su constante apoyo en cuanto a mis aspiraciones académicas a futuro. Igualmente quiero agradecer al Dr. Pedro Smith por sus valiosas contribuciones a mi tesis.

Quiero agradecer además a Marcela Ortega, quien fue fundamental en la recopilación de los datos epidemiológicos de esta memoria de título y por enseñarme sobre las diversas facetas productivas y de bioseguridad de la industria salmonera en Chile.

Además, quiero agradecer al todo el equipo de EWOS Innovation AS. Noruega, fundamentalmente a Siri Vike y Henrik Duesund por el análisis de las muestras biológicas. Quiero agradecer especialmente a Kari Ruhonen, por elaborar el análisis multivariado de esta memoria de pregrado. También quiero agradecer al equipo de EWOS Innovation SA. Chile, por la ayuda en la toma de muestra, el envío de las muestras biológicas y por consejos varios respecto a la memoria de título.

En general, quiero agradecer a todas aquellas personas; veterinarios, jefes de centro y operarios, sin los cuales hubiese sido imposible recolectar toda la información necesaria para esta memoria de título.

Finalmente, quiero agradecer a la Dra. Leticia Gutiérrez, mi esposa, por su constante apoyo durante este largo trayecto y por no dejarme dormir en los laureles.

III. ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
3. OBJETIVOS.....	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
5. RESULTADOS.....	25
6. DISCUSIÓN.....	42
7. CONCLUSIONES.....	50
8. BIBLIOGRAFÍA.....	53

1. INTRODUCCIÓN

La mayor parte de la producción acuícola chilena corresponde al cultivo de salmónidos lo que incluye principalmente al salmón del Atlántico (*Salmo salar*); salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*); y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), con alrededor de 445 mil toneladas exportadas durante el año 2008, lo que corresponde a un total de 2.392 millones de dólares americanos (FOB). De este total, un 51,1% correspondió a la exportación de salmón del Atlántico. En tanto, las exportaciones agregadas para el año 2008 crecieron alrededor de un 12% en comparación con el año 2007, pero las circunstancias para cada especie fueron distintas. Mientras que las exportaciones para trucha arco iris y salmón coho crecieron acorde a la expansión de la industria, el crecimiento porcentual del salmón del Atlántico fue causado principalmente debido a la cosecha acelerada, relacionada con brotes de anemia infecciosa del salmón (ISA) (SalmonChile, 2009).

El virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAv), es un agente perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*, género *Isavirus*. Este agente etiológico produce un cuadro clínico únicamente en el salmón del Atlántico, salvo excepciones (Kibenge *et al.*, 2001). Los primeros casos de esta enfermedad se reportaron en Noruega, en 1984 (Thorud y Djupvik, 1988). Luego fue descrito el año 1996 en Canadá (Mullins *et al.*, 1998) y en 1998 en Escocia (Rodger *et al.*, 1998). En el año 1999 se detectó su presencia en Chile en muestras de salmón coho (Kibenge *et al.*, 2001). Finalmente, en el año 2000, fue descrito en los Estados Unidos de América (Bouchard *et al.*, 2001).

Desde el invierno del año 2007, se han reportado continuos brotes de la enfermedad en el territorio nacional, centrándose en las regiones X y XI. A diferencia del supuesto brote registrado en 1998, en el que se vio afectado únicamente el salmón coho, el virus actual afecta exclusivamente al salmón del Atlántico (Godoy *et al.*, 2007).

Se han reportado dos variantes del virus, una europea (EU-ISAv) y una norteamericana (NA-ISAv). La variante EU-ISAv, puede a su vez ser dividida en tres genogrupos: G1, G2 y G3 (Nylund *et al.*, 2003). El brote registrado en Chile a fines de la década pasada se atribuyó a un virus de la variante NA-ISAv (Kibenge *et al.*, 2001), sin embargo, estudios recientes han clasificado aislados del virus que actualmente se encuentra

en el país como perteneciente a la variante EU-ISAv (Godoy *et al.*, 2007, Vike *et al.*, 2008).

Durante el periodo comprendido entre los meses de enero a diciembre del año 2008, se muestrearon branquias, riñón anterior y corazón, de distintos centros de agua dulce y de mar de una empresa salmonera con centros ubicados entre la Región del Maule (VII) hasta la Región de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo (XI). Estas muestras fueron luego analizadas por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa reversa en tiempo real (RT-PCR), con el fin de detectar la presencia del virus ISA. Las muestras positivas fueron cultivadas en células renales de salmón del Atlántico (ASK) obteniéndose suficiente material genético para secuenciar el virus. Además, se recolectó información epidemiológica durante el muestreo y posteriormente a éste, a través de los registros computarizados de cada centro productivo.

Esta memoria de título pretende dilucidar, en base a los resultados de laboratorio y a un estudio epidemiológico, cuáles son los principales factores de riesgo asociados a un brote de ISAv en un centro de cultivo de mar. Se analizaron, para este propósito, factores de estrés ambientales, de manejo y biológicos. Además, se trató de asociar las pisciculturas de origen de las ovas con los posteriores brotes de ISAv en mar.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Debido a que es necesario reproducir el ciclo natural del salmón del Atlántico en cautiverio, su ciclo vida en un ambiente productivo intensivo debe reflejar las circunstancias naturales de vida del salmón. Es por esto que el ciclo comienza en una primera etapa de agua dulce, generalmente en estanques en tierra, que consiste en la fase de fertilización, maduración y eclosión de las ovas, seguido de una etapa de alevinaje. Posteriormente le sigue una fase de “esmoltificación”, previo al traslado al agua de mar. Ésta etapa productiva se lleva a cabo tanto en lagos y aguas estuarinas, como también en estanques en tierra. Una vez alcanzado el estatus de “smolts”, los peces son trasladados a centros de engorda marinos, donde permanecerán hasta la cosecha y posteriormente ser faenados en plantas de proceso. El período comprendido entre huevo fertilizado hasta la etapa de “smolt” puede llevar entre 9 a 15 meses bajo condiciones productivas intensivas, mientras que la etapa de engorda en mar para *Salmo salar* puede durar entre 14 y 17 meses (Stead y Laird., 2001).

Durante este prolongado ciclo productivo, los salmónidos son susceptibles de contraer una serie de enfermedades infecciosas, ya sean agudas o crónicas; una de las cuales es la enfermedad causada por el virus de la anemia infecciosa del salmón. Este agente, un *Orthomyxovirus* perteneciente al género *Isavirus*, causa importantes pérdidas económicas en la industria productora de salmón del Atlántico alrededor del mundo, y desde el año 2007 se han registrado constantes brotes de esta enfermedad en nuestro país (Godoy *et al.*, 2007).

El virus de la anemia infecciosa del salmón es un virus envuelto, de entre 100 a 130 nm de diámetro, que *in vivo*, replica en células endoteliales, del endocardio (Mjaaland *et al.*, 1997) y en leucocitos polimorfonucleares, de miembros de la especie *Salmo salar*. Éste virus presenta sus máximos niveles de replicación a 15° C, mientras que a temperaturas iguales o mayores que 25° C ésta no se produce (Falk *et al.*, 1997).

El peso molecular total de su genoma, basado en el tamaño de los segmentos individuales de ARN, se estima que es de aproximadamente 14,5 kb (Mjaaland *et al.*, 1997). Se ha descrito que su material genómico consiste en ARN de una hebra, constituido por ocho segmentos de polaridad negativa, de manera similar a otros

Orthomyxovirus (Falk *et al.*, 2004). Sin embargo, considerando la distancia evolutiva existente entre la especie hospedera de este *Orthomyxovirus* y la de aves y mamíferos, la ausencia de homología entre secuencias aminoacídicas no es inesperada (Mjaaland *et al.*, 1997).

La morbilidad y la mortalidad dentro de una jaula en fase de mar pueden comenzar con niveles muy bajos. La mortalidad diaria varía de 0,5 a 1% en las jaulas infectadas. El margen de mortalidad acumulada durante un brote va desde un valor insignificante a moderado, pero en casos graves puede sobrepasar el 90%. Los brotes de enfermedad en el salmón del Atlántico se han descrito principalmente en jaulas marinas; sólo se han reportado unos cuantos casos en las fases de agua dulce (OIE, 2006).

Los signos clínicos y lesiones actualmente asociados a ISAv en Chile son: palidez branquial, hemorragia periocular, enteritis hemorrágica, palidez ó severa congestión hepática, hemorragia de ciegos pilóricos y de grasa visceral. A diferencia de esta presentación clásica del virus, en Chile se había asociado hasta el año 2007 al Síndrome Ictérico que se presenta sólo en el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), sin haberse podido aislar nuevamente el virus (Godoy *et al.*, 2007).

El ISAv penetra las células del hospedero mediante la adhesión a receptores moleculares presentes en la membrana plasmática. Esta etapa inicial determina el rango de hospederos del virus y su tropismo por ciertos tejidos (Eliassen *et al.*, 2000).

La proteína de membrana de mayor presencia en la superficie viral es la hemaglutinina-esterasa, codificada por el segmento 6 del genoma viral. Esta tiene una función dual: la porción hemaglutinante es responsable del reconocimiento y unión a la célula del hospedero, mientras que la porción esterasa es responsable de la destrucción enzimática de estos receptores, disolviendo la hemoaglutinación y, por lo tanto, liberando al virus de la célula (Falk *et al.*, 2004). La proteína responsable de la unión de las membranas celulares y la consiguiente endocitosis del virus es la proteína de fusión, codificada por el segmento 5 del genoma viral (Aspehaug *et al.*, 2005).

Una de las regiones del ARN viral que más difiere entre los distintos aislados virales obtenidos hasta ahora, se encuentra codificada por el segmento 6. El largo total de este segmento varía de entre 1161 pares de bases a 1233 pares de bases, dependiendo del largo de la región hipervariable (HPR). Prácticamente toda la variación nucleotídica de este

segmento se explica por la región HPR, que hasta ahora se ha documentado de un tamaño de entre 33 a 105 nucleótidos. Se postula que las variaciones en el tamaño y secuencia de la región HPR estarían relacionadas con la patogenicidad del virus. Específicamente, las deleciones producidas en una región HPR completa (HPR0), proveniente de una variante apatógena del virus, llevaría a diferentes regiones HPR (Mjaaland *et al.* 2002; Nylund *et al.*, 2003), como sucede en el caso de HPR7 y HPR35 ambos de diferente patogenicidad, entre otros.

Basado en una comparación genómica del segmento 6 del virus, se pueden diferenciar dos genogrupos: uno europeo y uno norteamericano. El genogrupo europeo, puede a su vez ser dividido en tres genogrupos: EU-ISAv G1, G2 y G3 (Nylund *et al.*, 2003). Estudios de comparación de cepas nacionales en base a la secuencia nucleotídica del segmento 5 y 6 del genoma viral, establecieron porcentajes de similitud de entre 95,9 a 98,2% y 95,7 a 99,5% respectivamente con aislados pertenecientes al genogrupo europeo. Además, según análisis recientes, se han encontrado aislados nacionales pertenecientes al genogrupo EU-ISAv G3 (Godoy *et al.*, 2007).

Dado que todas las especies salmonídeas del hemisferio sur han sido introducidas desde Europa o Norteamérica, se excluye la posibilidad de reservorios naturales de este virus en el país. Considerando, además, que Chile importa todo los años ovas desde Noruega y otros países europeos, no es de extrañar que año a año se hayan introducido patógenos, como el virus ISA, de manera vertical a través de las ovas embrionadas. A la luz de las similitudes genómicas con cepas coetáneas noruegas de virus ISA, la vía de transmisión vertical podría ser la forma más probable por la cual se haya introducido el virus a nuestro país (Vike *et al.*, 2008).

Evidencias aportadas por Nylund, *et al.* (2007), sugieren la posibilidad de algún tipo de transmisión transgeneracional, que explicaría la recurrencia de brotes y la circulación de ciertos aislados virales dentro de Noruega. Esto, se debería a la amplia presencia de la forma avirulenta del virus (HPR0) dentro de la población de *Salmo salar* cultivado en Noruega, siendo el cambio a una variante virulenta un evento estocástico dependiente de la tasa de replicación del virus y de los cambios subsecuentes en la región HPR. En estudios recientes, se han considerado una serie factores de riesgo de transmisión de virus ISA, como: ubicación adyacente con sitios afectados por virus ISA, origen compartidos de

“smolt” y compañías de reproductores en común (Lyngstad *et al.*, 2007), cercanía a plantas de proceso de peces, historial de brotes de ISA virus en los distintos sitios y ausencia de prácticas de descanso sanitario de los centros productivos entre generaciones de peces (Gustafson, *et al.*, 2005).

Los salmónidos en particular tienen requerimientos de oxígeno demandantes. La concentración de oxígeno disuelta óptima para ellos se encuentra entre las 8 a 10 ppm. Si los niveles caen bajo las 3 ppm, comienzan a manifestar signos claros de sofocación. Se consideran niveles de entre 5 y 6 ppm de oxígeno disuelto como críticos para mantener niveles productivos a lo largo del tiempo (Crampton *et al.*, 2003, Svobodova *et al.*, 1993).

Además se consideran, como factores desencadenantes de brotes de anemia infecciosa, las altas cargas parasitarias por piojo de mar, manejos estresantes para los peces durante el ciclo productivo y la estación del año. Sin intervención, la mortalidad aumenta y parece alcanzar el máximo a principios de verano y en el invierno (Farstad, *et al.*, 2007; Lyngstad *et al.*, 2007; OIE, 2006).

Estudios realizados en Noruega han demostrado que especies del piojo de mar no presentes en Chile como *Caligus elongatus* y *Lepeophtheirus salmonis*, pueden actuar como vectores del virus ISA, pudiendo éstos potenciar el contagio y diseminación de la enfermedad durante brotes epidémicos. Sin embargo, se desconoce la importancia de esta ruta de infección en relación a otras posibles vías (Nylund *et al.*, 1994).

Pruebas de sobrevivencia del virus han demostrado que el agente se puede mantener viable en agua de mar por al menos 20 horas a 6° C y durante 4 días en tejido a 6° C. Éste hecho es de gran relevancia para explicar la mantención y diseminación de la enfermedad (Nylund *et al.*, 1994).

Como factores de riesgo asociados a la intensidad del brote, se ha considerado el tiempo de cosecha de las jaulas afectadas desde la detección del brote, como también las altas densidades de peces registradas en los centros de cosecha (Gustafson, *et al.*, 2005).

Para el control de esta enfermedad, es de suma utilidad establecer factores de riesgo ambientales, biológicos y de manejo, como asimismo otros asociados al origen de ovas, piscicultura y centros de “smoltificación”. Esta memoria de título intentará dilucidar las interrogantes planteadas.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar factores de riesgo asociados a la presentación de brotes de anemia infecciosa del salmón Atlántico (ISA) en Chile, en centros de cultivo en mar pertenecientes a una empresa privada ubicada desde la Región VII a la XI.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la importancia de factores asociados al manejo y condiciones medioambientales de los centros de cultivo sobre el riesgo de la presentación de brotes de la enfermedad.
2. Determinar la relación entre las pisciculturas de origen de los peces y la presentación de brotes de la enfermedad en mar.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Área de estudio:

Las muestras de tejido de salmón del Atlántico para este estudio fueron obtenidas de diversos centros de agua dulce y centros de mar ubicados entre la VII Región del Maule hasta la XI Región de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo. La recolección se realizó durante el período comprendido entre enero y diciembre del año 2008. Se obtuvieron un total de 9.113 muestras (branquias, corazón y riñón) de peces provenientes de 35 centros de cultivo.

Las muestras fueron analizadas por terceros, con la técnica de RT-PCR en el laboratorio Patogen Analyse AS, Noruega. La secuenciación viral fue realizada por investigadores del Instituto de Biología de la Universidad de Bergen, Noruega.

4.2 Obtención de las muestras:

Para efectuar el análisis de RT-PCR, método de diagnóstico escogido por su especificidad y sensibilidad para virus ISA, se obtuvieron muestras de tejidos de un $n=60$ peces por jaula, con una prevalencia de la enfermedad esperada de al menos un 5%, considerando una población de 1.000.000 de individuos por centro (OIE, 2006). De no existir sospecha de la presencia de la enfermedad en el centro a muestrear las muestras se recolectaron de forma aleatoria. En cambio, si existía sospecha de enfermedad, el muestreo realizado fue dirigido solamente a peces enfermos, muestreándose por grupo de origen de cada centro a examinar. Esto, independientemente de la fase productiva del pez. Considerando que normalmente cada centro muestreado contaba con peces pertenecientes al menos a tres grupos de origen distintos, en cada muestreo se obtuvieron muestras provenientes de aproximadamente 180 peces por centro. Hubo centros que se muestrearon más de una vez.

Se entiende como grupo origen a la trazabilidad de un grupo de peces que se encuentran en un determinado momento de su fase productiva. La trazabilidad se obtiene

asignándole un código alfanumérico a cada grupo de peces, el cual indica: Año de producción de ovas, compañía productora de las ovas, centro de eclosión, centro de alevinaje, centro de smoltificación y centro de engorda. Por lo general, cada batea, estanque y jaula que contiene peces, debe estar rotulada con este código.

Las muestras de tejido analizadas fueron de branquias (segundo arco branquial), riñón anterior y corazón (ápex), obtenidos en forma estéril. Las muestras de cada órgano no superaron un tamaño de 8 mm³. Éstas fueron colocadas en tubos Falcon estériles de 15 mL en una solución de etanol al 70%, en una relación volumétrica de 1/10 muestra/etanol. Las muestras fueron almacenadas al menos durante 24 hrs a un promedio de -14 °C. El etanol de 70% luego fue reemplazado por etanol al 95% en las mismas proporciones descritas anteriormente. Las muestras fueron luego almacenadas a -14 °C hasta su envío a la Universidad de Bergen, Noruega.

El envío de las muestras se realizó a través de un servicio de correo especializado en envío internacional de muestras biológicas, contando éste con la capacidad técnica que aseguraba una correcta mantención de la cadena de frío de las muestras durante el envío. Se contó además con un permiso expreso del gobierno Noruego para la internación de muestras biológicas destinadas a estudios de caracterización genómica en las instalaciones del departamento de Biología de la Universidad de Bergen, en el marco de un estudio epizootico molecular (comunicación personal del Dr. Are Nylund, Departamento de Biología de la Universidad de Bergen, Noruega).

Adicionalmente se ocupó el “kit” de colección de muestras del laboratorio Patogen Analyse AS, consistente en una serie de tubos pre-rotulados que contienen no menos de 1 mL RNAlater^{MR} (Applied Biosystems, Japón) por tubo. Se colocaron dos muestras del mismo órgano y de un tamaño no mayor a 8 mm³ cada una por tubo. Sólo se ocuparon muestras de corazón con este “kit”. Las muestras fueron mantenidas permanentemente a 4°C hasta su envío al laboratorio Patogen Analyse AS, a través de la Universidad de Bergen.

El análisis de las muestras se efectuó en la Universidad de Bergen, en el contexto de una investigación en conjunto con el Instituto de Biología de dicha Universidad y la empresa salmonera. Se contó con su experiencia en el análisis de las muestras y con el

convenio con que cuenta su departamento con el laboratorio Patogen Analyse AS, para obtener resultados confiables de los análisis.

4.3 Análisis de laboratorio:

Extracción de RNA:

Las muestras de branquia, corazón y riñón obtenidas de los salmónidos fueron homogenizadas en 1 mL de reactivo TRIZOL (Gibco BRL, USA) (50 a 100 mg de tejido cada 1 mL de TRIZOL). Las muestras homogenizadas fueron luego incubadas a 20 °C por 15 min. Después de la incubación, se adicionó 0,2 mL de cloroformo cada 1 mL de TRIZOL y los tubos se agitaron en un Vortex por 15 segundos. Luego fueron incubadas por 5 min a 20°C. Las muestras fueron subsecuentemente centrifugadas a 12.000 $x g$ por 15 min a 4°C. La fase acuosa superior (que contiene el RNA) fue transferida a un nuevo tubo y el RNA fue precipitado al adicionar 0,5 mL de alcohol isopropílico. Las muestras fueron luego incubadas a 20 °C por 10 min y centrifugadas a 12.000 $x g$ por 15 min a 4 °C. Al precipitar el RNA formó un “pellet” al fondo del tubo. El sobrenadante fue removido y el pellet lavado con 1 mL de etanol al 75% (las muestras fueron centrifugadas a 7.500 $x g$ por 5 min a 4°C). Los “pellets” fueron secados por un corto tiempo (<10 min) y disueltos en 50 μL de agua. Luego las soluciones de ARN fueron inmediatamente precipitadas al adicionar 100 μL de etanol al 100% y 5 μL de acetato de sodio 3 molar (pH= 5,2). Esta solución fue almacenada al menos durante una hora a -20 °C antes de la centrifugación a 15.000 $x g$ por 25 min. Los “pellets” de ARN fueron lavados dos veces con etanol al 80%, luego secados por 10 min y disueltos en 50 μL de agua. La doble limpieza del ARN fue efectuada para reducir la cantidad de posibles inhibidores provenientes de los tejidos del hospedero, a los que podría ser susceptible la técnica de RT-PCR. La calidad y cantidad de los ácidos nucleicos purificados fueron determinados midiendo la absorbancia (A) a 260 nm/280 nm, en un espectrofotómetro. Estas soluciones de ARN fueron luego usadas para análisis RT-RT-PCR (Real Time - Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction). Para efectos de esta memoria de título, la técnica se identificará sólo como RT-PCR.

Obtención de cADN:

Alrededor de 1,5 µg totales de ARN más 1,5 µg de hexámeros al azar [pd(N)₆] fueron incubados en un total de 10 µL, los que fueron incubados a 70 °C por 5 min y luego enfriados a 4 °C. El mix para RT-PCR contenía 5 µL buffer 5 x RT más 1,2µL 200 mM de DDT más 2,5 µL 10 mM dNTP más 0,5 µL de RNasina (20 U µL⁻¹) más 4,3 µL dH₂O más 1,5 µL (20 U µL⁻¹) de transcriptasa reversa proveniente del Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV-RT) a temperatura ambiente, haciendo un total de 25 µL. Esta solución fue incubada a 37 °C por 60 min.

RT-PCR:

El RT-PCR consistente en 2 µL de solución de cADN fue adicionado a 23 µL de mezcla reactiva consistente en 14,2 µL de ddH₂O, 2,5 µL (x10) de “buffer”, 2 µL (mM MgCl), 2 µL de dNTP (10 mM), 1 µL de cada sonda “TaqMan” (20 µL) y 0,3 µL (5 U µL⁻¹) de polimerasa Taq (Pharmacia Bitech) (Tabla 1). La mezcla fue denaturada a 94 °C por 3 min y la amplificación se realizó en 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 59 °C por 45 s, y 72 °C por 90 s, seguida por una extensión a 72 °C por 10 min. Luego, los tubos fueron mantenidos a 4 °C. La amplificación y la transcripción reversa se realizó en un termociclador (Applied Biosystems 7500 Fast).

Tabla 1: Sondas “TaqMan”, específicas al segmento 8 del ISAV, utilizadas en el protocolo RT-PCR.

ISAV S8	S8-UNIF	5'-CTACACAGCAGGATGCAGATGT-3'
	S8-UNIR	5'-CAGGATGCCGGAAGTCGAT-3'
	S8uni-Probe	FAM-5'-CATCGTCGCTGCAGTTC-3'-MGB

Interpretación del RT-PCR:

Para el análisis cuantitativo de las muestras, se evaluaron las curvas de amplificación producidas por la fluorescencia de las sondas “TaqMan”. Cada curva está compuesta al menos de tres fases distintivas: 1) La fase de latencia, en la cual la cantidad de material acumulado es muy poco para ser medido, 2) la fase exponencial y 3) la fase “plateau”. El número de las copias de ADN producidas se puede estimar con gran precisión por la cantidad de ciclos de amplificación necesarios hasta que la curva intersekte con un umbral arbitrario. Este punto es, por lo tanto, conocido como valor de umbral (C_t) o punto de intersección (C_p). El umbral debe intersectar a la curva de amplificación en su fase exponencial, ya que en esta fase se correlaciona con la acumulación de material genético producido (Wilhelm *et al.*, 2003). El programa utilizado para este análisis fue el Applied Biosystems 7500.

4. 4 Identificación de los factores de riesgo:

Durante esta memoria de título, se analizaron una serie de factores asociados a los centros de producción en mar que han presentado o no han presentado brotes de la enfermedad.

Se realizó la recopilación de la información de los distintos centros de con la colaboración de un subgerente de bioseguridad, el jefe de salud y un encargado de asistencia técnica de la empresa salmonera.

Además, durante el mes de Enero de 2009 se realizó un estudio de carácter interno en la empresa salmonera en cuestión, en el que se intentó dilucidar a grandes rasgos las variables que aparentemente tienen alguna influencia sobre los brotes de Anemia Infecciosa del Salmón en centros de cultivo en mar. Este estudio se realizó con la participación de todas las personas mencionadas anteriormente. El resultado de aquel estudio se ve reflejado en las variables a estudiar en esta memoria de título.

Se consideraron como sitios en brote, aquéllos que además de presentar signos clínicos típicos de ISAv en peces muertos, hayan sido positivos a la prueba diagnóstica de RT-PCR usando sondas “TaqMan”, con valores $C_t < 20$ en al menos una de las muestras

enviadas a análisis durante la presentación de las mortalidades sospechosas (norma técnica de la empresa y comunicación personal del Jefe de Salud).

Las variables que se evaluaron como posibles factores de riesgo de brotes de anemia infecciosa del salmón en centros de cultivo de mar, son las siguientes:

- Cantidad de días con niveles de oxígeno disuelto registrados bajo 6,5 ppm: Se consideran niveles de oxígeno disuelto entre 6,5 ppm y 7 ppm por períodos prolongados como mínimos para no afectar el estado de salud de los peces salmonídeos (Crampton *et al.*, 2003). Esta medición se realiza diariamente a medio día y entre las 4 y 5 de la tarde, a una profundidad de cinco metros, en los centros de cultivo y es registrada a través de un medidor de oxígeno disuelto (OxiGuard Polaris, de OxiGuard International A/S). Se consideraron para el análisis los datos obtenidos durante un período de ocho semanas antes del brote. Para los centros que no han hecho brote, se consideraron los datos de oxígeno de enero y febrero del año 2009. Esto debido a que durante aquellos dos meses la mayoría de los centros positivos aún no habían sido cosechados completamente y por lo tanto comparten características medio ambientales similares con los centros que no habían presentado brote.
- Carga promedio de *Caligus rogercressey* por pez y por centro: Como carga promedio se entiende el conteo promedio semanal por centro y por pez, obtenido de una muestra de diez peces por jaula, efectuado por operarios y jefes de centro. Se consideraron los valores promedio de cada centro durante todo el ciclo productivo. Es esperable un importante error de observación en esta medición.
- Cantidad y frecuencia de tratamientos por baño con deltametrina contra *Caligus* antes del brote: Se consideraron los baños con deltametrina realizados por grupo de origen de cada centro de cultivo de mar, durante todo el ciclo productivo. Los baños fueron realizados ya sea con lona completa o con lona en “faldón”. La técnica en “faldón” consiste en paños de lona que cuelgan por los vértices de las jaulas, produciendo un cierre incompleto, pero efectivo para la administración del fármaco. En cambio la técnica con lona completa consiste en el cierre completo del fondo de la jaula por una gran lona, produciendo un aislamiento completo de la jaula por el

tiempo que dura el tratamiento. Además, se consideraron los datos ya sea hasta la presentación de la enfermedad o, para el caso de los centros negativos, hasta el mes de febrero del año 2009.

- Días de ayuno o de no alimentación: Esta condición afecta a los centros principalmente por causas climáticas, por lo cual la autoridad marítima declara estado de “puerto cerrado”, durante el cual están estrictamente prohibidas las faenas en los centros de cultivo y por lo tanto no se alimenta a los peces. Se consideraron los datos recopilados por ocho semanas antes del brote. Para los centros que no han hecho brote se consideraron los datos obtenidos de Enero y febrero del año 2009. Esto debido a que durante aquellos dos meses la mayoría de los centros positivos aun no habían sido cosechados completamente y por lo tanto comparten características medio ambientales similares con los centros que no habían presentado brote.
- Estacionalidad del brote: Mes del año en que se presentó el brote de la enfermedad.
- Mes de traslado de “smolts” al mar: Mes en que fueron trasladados los “smolts” desde los centros de “smoltificación” a centros de mar.
- Peso promedio de los peces al momento del brote.
- Semana productiva al momento del brote: Número de semanas en producción desde la siembra de los peces en mar, hasta la manifestación del brote de la enfermedad. En el caso de los centros que no han presentado brote, se consideraron las semanas en producción desde la siembra en mar hasta la fecha en que se realizó el registro.
- Ataque de predadores a los centros de cultivo. Se entiende como predadores a lobos de mar y a aves marítimas, principalmente gaviotas, cormoranes y pelícanos. Se consideró la historia completa del ciclo productivo. Este dato fue obtenido a través de una encuesta directa a los veterinarios encargados de cada centro de cultivo y los valores son expresados en la siguiente distribución: baja presencia, mediana presencia, alta presencia. Se debía escoger sólo un valor por centro y se consideró el ciclo completo de producción en mar.
- Pisciculturas de origen de los peces y año de producción. Se tomaron en cuenta como factores de riesgo el año de producción de la ova, si corresponde a ova

nacional o importada, la piscicultura de origen de las ovas y los alevines, además de los centros de “smoltificación”.

- Tratamientos recibidos: Se consideró la cantidad de tratamientos orales e inyectables que recibieron los peces por grupo de origen de cada centro de cultivo durante todo el ciclo productivo o hasta la presentación del brote para los centros con enfermedad.
- Mortalidades antes del brote y a la transferencia: Se consideraron las mortalidades acumuladas, expresadas como un % del total del grupo de origen por centro. Para la variable de mortalidad antes del brote, se consideraron las mortalidades 8 semanas antes del brote, mientras que para la variable de mortalidad al traslado a mar, fueron consideradas las mortalidades 8 semanas luego de la transferencia de los “smolts” a los sitios de cultivo en mar. Para hacer comparables las mortalidades antes del brote con los centros que no presentaron la enfermedad, se consideraron para éstos centros las mortalidades acumuladas 8 semanas antes del registro de los datos.

Ciertos datos fueron obtenidos de mediciones hechas por trabajadores de los centros de cultivo. Estos datos incluyen: carga de *Caligus*, mediciones de oxígeno disuelto y peso promedio de los peces.

Los datos de origen de ovas, año de producción, fecha de traslado a centros de mar, semana productiva al brote, fecha de brote, días de no alimentación, frecuencia de baños con deltametrina, carga de *Caligus*, cantidad de oxígeno disuelto, peso promedio de los peces al momento de los brotes y centro en donde se encontraban los reproductores antes del desove, fueron obtenidos retrospectivamente de los registros electrónicos que posee la empresa y exportados desde el programa FarmControl 4.5.

4.5 Análisis de datos:

Análisis univariado:

Se analizaron ciertas variables en relación a la condición de brote o no brote de los centros de engorda. Para este análisis se efectuaron pruebas de t para dos muestras independientes. Se contrastaron los promedios para cada variable entre los dos grupos, para así dilucidar si existe una diferencia significativa entre ambos.

Para las variables registradas como porcentaje, primero se realizó una transformación de arcoceno para normalizar la distribución de los datos. Además, se realizó una prueba de igualdad de varianzas de Levene para cada variable, para así efectuar una prueba de t de Welch en los casos que no se cumpla la condición de igualdad de varianza entre medias. El valor crítico escogido para ambas pruebas fue de $\alpha=0,05$ e intervalos de confianza de un 95%.

Para el análisis de los meses en producción en mar por generación, se realizó una prueba de ANDEVA univariada. La prueba fue realizada con un $\alpha=0,05$ e intervalos de confianza de un 95%. Además, se analizó la varianza entre medias. Posteriormente fue realizada una prueba de Tukey, la cual nos dice cual de las generaciones es significativamente diferente de las demás.

Para relacionar los días de ayuno con el índice de predación, se realizó una correlación, usando el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman.

Todos los análisis fueron realizados con la versión 17.0 del paquete estadístico SPSS para Windows, versión en inglés.

Las variables analizadas en el análisis univariado fueron las siguientes:

1. Peso promedio del grupo al momento brote o al momento de la recolección de datos.
2. Peso promedio de los peces al traslado a mar.
3. Número de mediciones de oxígeno disuelto en el agua bajo las 6,5 ppm, medidas ocho semanas antes del brote.

4. El promedio de mediciones de oxígeno registrado en los centros de cultivo de ocho semanas antes del brote o al momento de la recolección de datos.
5. Promedio de carga de *Caligus* registrada en los centros, ocho semanas antes del brote o al momento de la recolección de los datos.
6. La cantidad de días de ayuno registrados durante ocho semanas antes del brote.
7. La cantidad de tratamientos con deltrametrina recibidos por grupo de peces, habiéndose analizado por separado la cantidad de tratamientos totales, de tratamientos con faldón y de tratamientos con lona.
8. El peso promedio de los peces al primer baño con deltametrina.
9. El peso promedio de los peces al traslado a mar.
10. Meses en producción en mar, por generación de peces.
11. Mortalidad acumulada ocho semanas después del traslado de los “smolts” a mar.
12. Mortalidad acumulada ocho semanas antes del brote u ocho semanas antes de la recolección de datos para los centros que no presentaron brote.

Análisis multivariado:

Se analizaron los datos de los centros con brote de ISA diagnosticado y centros donde no se manifestó la enfermedad clínicamente, en relación a que tan significativas son las variables en cuestión. Para esto se hizo una relación entre las interacciones de las variables y se estimó su significancia. Esto se llevó a cabo mediante un análisis estadístico de regresión logística, técnica que permite relacionar una variable dependiente cualitativa dicotómica, en éste caso brote o no brote, con una serie de variables independientes, ya sean cuantitativas o cualitativas, explicativas de la variable dependiente. Esto permitió evaluar la preponderancia de cada una de las variables ligadas a los brotes del ISAv. Cabe destacar el amplio uso de esta técnica estadística en estudios de determinación de factores de riesgo en la presentación de ISAv. Todos los modelos estadísticos fueron conducidos con el lenguaje R y sus paquetes correspondientes (R versión 2.9.0 2009-04-17). El análisis

multivariado fue realizado con la colaboración del Dr. Kari Ruohonen, de la empresa EWOS Innovation A.S., Noruega.

La información recopilada inicialmente para el estudio incluyó 64 variables, como se describe previamente. Estadísticamente, 64 variables son demasiadas para ser determinadas de un set de datos de tan solo 32 observaciones, pero debido a que se deseó obtener la mayor cantidad de indicadores respecto a cuáles fueron los posibles factores de riesgo en juego, se utilizó una gran cantidad de parámetros para este análisis. Se aplicaron, por lo tanto, una serie de métodos estadísticos de reducción de datos para disminuir el número de potenciales factores de riesgo. Se utilizaron cuatro técnicas para reducir el número de variables a considerar:

1. Agrupación de variables en base al ρ^2 de Spearman como medida de similaridad. El criterio de agrupación a utilizar fue $\rho^2 > 0.1$ (los valores posibles van de -1 a 1).
2. Agrupación de variables en base a la D de Hoeffdings. El criterio de agrupación fue $30 \times D > 0.0$ (los valores posibles van desde -0.5 a 1).
3. Selección de variables en base a un análisis de redundancia.
4. Selección de variables por representatividad.

Las opciones 1 y 2 (variables agrupadas en base al ρ de Spearman y a la D de Hoeffdings) son métodos de agrupaciones jerárquicas que utilizan ya sea ρ o D como medidas de similaridad. Estos métodos comienzan asignándole a cada observación su propio grupo y luego combinan los similares hasta que queden sólo algunos grupos. Es decir, son métodos aglomerativos (Norman y Streiner, 2008)

La opción 3 (análisis de redundancia), usa modelos paramétricos aditivos flexibles para determinar cuán bien puede ser predicha cada variable en función de las otras. Las variables se reducen de manera gradual, removiendo la más predecible en cada nivel. Las variables restantes son utilizadas como predictores. Este proceso continúa hasta las variables restantes no puedan ser predichas con el valor de umbral o un valor mayor a este. El valor de umbral usado fue un R^2 común (Quinn y Keough, 2002)

La opción 4 (selección por representatividad) utiliza la selección subjetiva de variables.

Ambos métodos aglomerativos pueden ser considerados muy débiles debido a los bajos valores de umbral de aglomeración utilizados ($>0,1$ para Spearman y $>0,0$ para Hoefdings). Sin embargo, un umbral más ajustado hubiese llevado a una mayor cantidad de grupos y a una menor magnitud en la reducción de datos, necesaria para mantener un bajo número de variables en vista del reducido número de datos.

El modelo estadístico usado fue la regresión logística, usando la variable binaria “brote” como respuesta (0= no brote, 1=brote). Los predictores para el modelo fueron los mencionados anteriormente. El modelo usado fue uno generalizado lineal binomial, con una función de enlace “logit”, que permite relacionar el predictor lineal con la media de la distribución de la función. El modelo fue estimado usando la función bayesiana “bayesglm” que usa el algoritmo EM (algoritmo esperanza-maximización, para encontrar estimadores de máxima verosimilitud de parámetros en este modelo probabilístico) y algunos priores débiles (configuración por defecto, paquete “arm” del lenguaje R). Esto fue importante para tener una estimación robusta de este conjunto de datos tan reducidos.

5. RESULTADOS:

Análisis univariado:

Los resultados para las pruebas de t de dos muestras independientes arrojaron diferencias significantes para ciertas variables. Para la categoría de peso, las variables de “peso al brote” ($p=0,047$), como para “peso al traslado” ($p=0,032$), son significativamente diferentes entre las medias para ambos grupos, a diferencia de la variable “peso al primer baño” ($p=0,863$). Los peces que manifestaron la enfermedad presentaban un peso menor al momento del brote (los peces sanos pesaban en promedio 3421 gr, a diferencia de un peso promedio de 2282 gr de los peces enfermos). A su vez, los peces que enfermaron también presentaron un peso menor al momento de ser trasladados al mar (143 gr, en comparación a los 197 gr del grupo que no presentó brote). La diferencia de 63 gr en el peso al primer baño no resultó ser estadísticamente significativa (Tabla 2).

Tabla 2: Resultados del análisis univariado para las variables relacionadas con peso:

		Independent Samples Test								
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
peso.brote	Equal variances assumed	,002	,964	-2,068	30	,047	-1138,63710	550,65562	-2263,22591	-14,04829
	Equal variances not assumed			-1,964	13,287	,071	-1138,63710	579,85132	-2388,58901	111,31480
peso.traslado	Equal variances assumed	,035	,852	-2,247	30	,032	-53,37681	23,75885	-101,89885	-4,85477
	Equal variances not assumed			-2,391	16,763	,029	-53,37681	22,32843	-100,53640	-6,21723
peso.1er.baño	Equal variances assumed	,101	,753	-,175	28	,863	-63,04000	360,93601	-802,38390	676,30390
	Equal variances not assumed			-,155	12,031	,879	-63,04000	405,94072	-947,25330	821,17330

Para las variables relacionadas con niveles de oxígeno, la variable “promedio de oxígeno” mostró una diferencia significativa a favor del grupo de peces que no presentó brotes de ISA ($p=0,025$), mientras la variable “oxígeno menor a 6,5 ppm” ($p=0,393$) no lo hace (Tabla 3). Sin embargo, cabe destacar que ambos grupos están en promedio por sobre

el nivel mínimo productivo de oxígeno de 6,5 ppm (Svobodová *et al.*, 1993). Queda de manifiesto el rol preponderante que juega esta variable en términos de la presentación de la anemia infecciosa, en vista de los efectos nocivos que tiene sobre el sistema inmune de los peces la carencia de oxígeno.

Tabla 3: Resultados para las variables relacionadas con niveles de oxígeno molecular promedio y número de mediciones de oxígeno menor a 6,5 ppm durante el estudio para los centros con y sin brote de la enfermedad:

Independent Samples Test											
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper	
ox.prom	Equal variances assumed	1,736	,199	-2,367	27	,025	-.81550	,34447	-1,52229	-,10871	
	Equal variances not assumed			-2,010	11,127	,069	-.81550	,40579	-1,70740	,07640	
ox.bajo.6.5	Equal variances assumed	,770	,388	,868	27	,393	3,56111	4,10198	-4,85545	11,97767	
	Equal variances not assumed			1,003	22,235	,327	3,56111	3,55092	-3,79852	10,92074	

La variable relacionada con carga promedio de *Caligus*, arroja una diferencia significativa entre medias ($p=0,011$), encontrándose en promedio un 86% más *Caligus* en el grupo que presentó brote. Para las variables relacionadas con tratamientos con deltametrina, ninguna de las tres variables, “número total de tratamientos con deltametrina”, “tratamientos con deltametrina con faldón” y “tratamientos con deltametrina por baño” arrojaron diferencias significativas entre los grupos de peces con y sin brote ($p=0,585$, $p= 0,35$ y $p=0,943$, respectivamente) (Tabla 4).

Tabla 4: Resultados del análisis univariado para las variables carga promedio de *Caligus* y tratamientos por baño con deltametrina durante el estudio para los centros con y sin brote de la enfermedad:

		Independent Samples Test								
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
prom.caligus	Equal variances assumed	10,169	,003	1,790	29	,084	5,47328	3,05728	-,77956	11,72613
	Equal variances not assumed			2,789	22,360	,011	5,47328	1,96277	1,40654	9,54002
trat.delta.total	Equal variances assumed	,576	,454	-,553	29	,585	-,87374	1,58102	-4,10729	2,35981
	Equal variances not assumed			-,497	12,192	,628	-,87374	1,75832	-4,69810	2,95063
trat.delta.faldon	Equal variances assumed	1,408	,245	-,950	29	,350	-,78788	,82952	-2,48444	,90868
	Equal variances not assumed			-,849	12,061	,413	-,78788	,92849	-2,80975	1,23399
trat.delta.baño	Equal variances assumed	,550	,464	-,072	29	,943	-,08586	1,19870	-2,53747	2,36575
	Equal variances not assumed			-,083	21,375	,934	-,08586	1,03116	-2,22798	2,05626

En relación a las mortalidades, la variable “mortalidad al traslado” no mostró una diferencia significativa entre las medias ($p=0,556$), mientras que la variable de “mortalidad acumulada a las ocho semanas antes del brote” si mostró diferencias, mostrando el grupo de peces enfermos un aumento de por sobre un doble en mortalidad con respecto al grupo de peces sanos en igual periodo ($p=0,03$) (Tabla 5).

Tabla 5: Resultados del análisis univariado para las variables de mortalidad al traslado al mar y porcentaje de mortalidad acumulada 8 semanas previas al brote:

		Independent Samples Test								
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
morta.transf	Equal variances assumed	2,826	,103	-,717	30	,479	-,0245031	,0341631	-,0942735	,0452673
	Equal variances not assumed			-,608	11,066	,556	-,0245031	,0403336	-,1132119	,0642056
morta.8sem	Equal variances assumed	,439	,513	2,526	28	,017	,06391	,02530	,01209	,11573
	Equal variances not assumed			2,466	11,938	,030	,06391	,02591	,00742	,12040

La mayor diferencia entre medias se registró para la variable “días de ayuno”, con un valor de $p<0,001$. Los sitios en brote sufrieron un promedio de 6,9 días de ayuno durante

las ocho semanas previo al brote, con valores máximos de hasta 19 días de ayuno, mientras que los sitios que no presentaron brote fueron afectados con apenas 0,67 días de ayuno en promedio durante igual período, muchos de los cuales no presentaron días de ayuno en lo absoluto (Tabla 6).

Tabla 6: Resultados de la variable “cantidad de días de ayuno” registrada durante las ocho semanas previas al brote:

		Independent Samples Test								
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
dias.ayuno	Equal variances assumed	14,462	,001	2,965	30	,006	6,15942	2,07716	1,91728	10,40156
	Equal variances not assumed			4,564	26,530	,000	6,15942	1,34964	3,38789	8,93095

Al analizar los brotes por generación de peces, se encontró una diferencia significativa en cuanto al tiempo que llevaba en producción en mar la generación 2007 antes de presentar un brote, con respecto a la generación 2005 y 2006. Dicha generación (2007), estuvo en fase de mar un promedio de 5,7 meses antes del brote, comparado con los 11,7 y 14,7 meses para las generaciones 2006 y 2005, respectivamente. Es decir, en la generación 2007, la presentación de la enfermedad fue más temprana después del traslado de los peces al mar al compararla con las otras dos generaciones (Gráfico 1, Tabla 7). Sin embargo, entre las generaciones 2005 y 2006, no se evidencian diferencias ($P = 0,450$), ver Tabla 7.

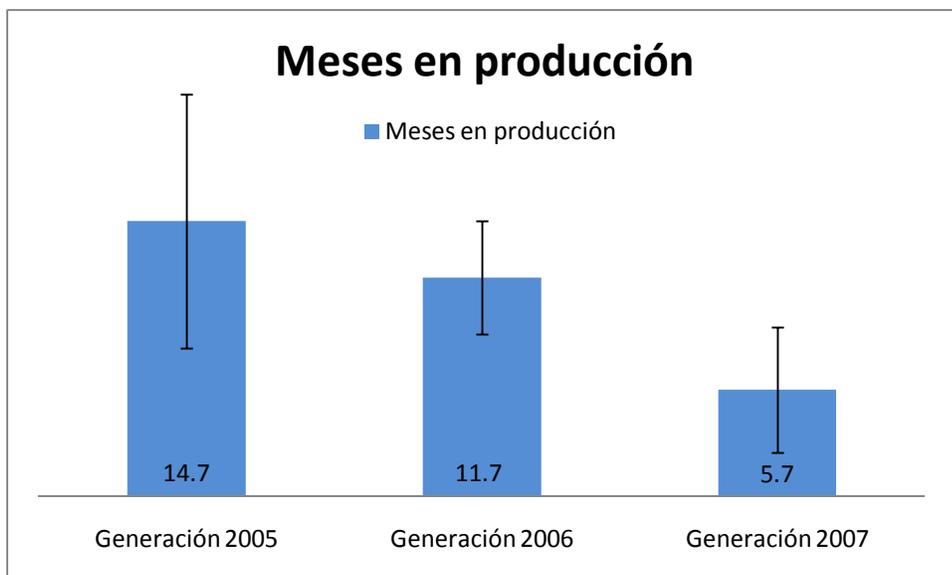


Gráfico 1: Cantidad de meses promedio en el mar de los centros de cultivo por generación de peces, antes de presentar un brote de Anemia Infecciosa del Salmón. DS 6,78; 3,03 y 3,35 respectivamente.

Tabla 7: Resultado de la prueba de Tukey en base al resultado del análisis de varianza. Se observan diferencias significativas (*) entre la generación 2007 y las generaciones 2005-2006 ($p=0,004$ y $0,005$ respectivamente).

Meses.prod
TukeyHSD

(I) Generacion	(J) Generacion	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Gen.2005	Gen.2006	2,9636	2,41019	,450	-3,1341	9,0614
	Gen.2007	8,9889*	2,46691	,004	2,7476	15,2301
Gen.2006	Gen.2005	-2,9636	2,41019	,450	-9,0614	3,1341
	Gen.2007	6,0253*	1,66319	,005	1,8174	10,2331
Gen.2007	Gen.2005	-8,9889*	2,46691	,004	-15,2301	-2,7476
	Gen.2006	-6,0253*	1,66319	,005	-10,2331	-1,8174

Como un análisis puramente descriptivo, se observó una mayor incidencia de brotes en los períodos de primavera-verano, ocurriendo un 65,2% de los brotes registrados en ese período, del cual un 43,5% de los casos se presentó en primavera. En contraste, tan solo un

34,6% de los casos ocurrió en el período de otoño-invierno, encontrándose la menor incidencia de los casos en otoño (8,7%) (Gráfico 2).



Gráfico 2: Estacionalidad de brotes de ISA expresada en porcentaje

Por último, se analizó si existía alguna correlación entre dos factores de estrés para los peces: días de ayuno y predación (Tabla 8). Este examen arroja una fuerte relación entre ambas variables, aunque debido a la naturaleza del análisis, existe la posibilidad de que existan otras causas no consideradas que estén influyendo en este resultado.

Tabla 8: Resultado de la correlación, usando el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman. Valores significativos (*) a un valor crítico de 0,05:

		días.ayuno	predación
días.ayuno	Correlation Coefficient	1,000	,521*
	Sig. (2-tailed)	.	,011
	N	23	23
predación	Correlation Coefficient	,521*	1,000
	Sig. (2-tailed)	,011	.
	N	23	23

Tabla 9: Resumen de variables consideradas en el análisis estadístico de pruebas de t para dos muestras independientes:

Variable	Centro con Brote \pm DS	Centro sin Brote \pm DS	Significancia <i>p</i>
Peso al brote (gr)	2282,42 \pm 1354,81	3421,06 \pm 1519,14	0,047*
Peso al traslado (gr)	143,95 \pm 62,47	197,33 \pm 54,40	0,032*
Peso al 1er baño (gr)	819,01 \pm 782,29	473,63 \pm 193,43	0,879
Promedio de oxígeno (ppm O ₂)	7.59 \pm 0.72	8.41 \pm 1.11	0,025*
Mediciones de oxígeno \leq 6,5ppm O ₂	11.14 \pm 8.45	7.59 \pm 4.89	0,393
Promedio carga <i>Caligus</i>	11.78 \pm 9.06	6.3 \pm 1.06	0,011*
Tratamientos totales deltametina	4.48 \pm 3.73	5.56 \pm 4.72	0,585
Tratamientos con deltametrina con faldón	1.92 \pm 1.55	2.5 \pm 2.3	0,350
Tratamientos con deltametrina por baño	3.27 \pm 3.13	3.22 \pm 2.28	0,943
Mortalidad al traslado (%)	4.81 \pm 3.77	6.32 \pm 5.9	0,556
Mortalidad acumulada a las ocho semanas antes del brote (%)	5.67 \pm 5.27	2.38 \pm 2.12	0,03*
Días de ayuno ocho semanas antes del brote	6.83 \pm 6.11	0.67 \pm 1.32	0,006*

*Valor significativo a un nivel de 0,05

Análisis multivariado:

Para este análisis, algunas de las variables fueron omitidas, incluyendo peso medio al brote y porcentaje de mortalidad acumulada ocho semanas antes del brote. La razón de su omisión radicó principalmente en que no es posible definir las variables correspondientes para estos casos sin que existiesen los datos correspondientes para los sitios que no hicieron brote. Adicionalmente, no se incluyeron los datos de oxígeno disuelto en las mediciones PM, debido principalmente a la ausencia de datos (prácticamente un tercio de las mediciones). En las variables restantes, hubo siete de ellas con ausencia de datos. Por lo tanto, para este análisis las observaciones utilizadas para el análisis fueron tan solo 25.

Después de agrupar las variables gracias a la utilización de las técnicas de Spearman y Hoeffdings, se formaron nuevos factores de riesgo desde los grupos con la ayuda del análisis de componentes principales. Éste es un procedimiento matemático que transforma una cantidad de posibles variables correlacionadas en una menor cantidad de variables no correlacionadas. El primer componente principal considera la mayor cantidad de la varianza posible de los datos, y los siguientes componentes principales cubren la mayor cantidad de la varianza restante (Dunteman G., 1989). Se usó el primer componente principal como la nueva variable para cada grupo. Para los grupos formados por la ρ^2 de Spearman el primer componente principal cubrió entre el 54% y 94% de la varianza de las variables. Para los grupos basados en la D de Hoeffding, fue de entre un 53% y un 82%. Haber utilizado una mayor cantidad de componentes principales hubiese dado una mayor cobertura de la varianza de cada grupo, pero fue imposible debido a la necesidad de una alta reducción de datos debido a la pequeña cantidad de observaciones disponibles. Algunas variables no se agruparon en ningún grupo, por lo que fueron analizadas independientemente. Las variables categóricas, es decir, año de producción y origen de “smolts”, siempre fueron agregadas independientemente al modelo y no fueron incluidas en el agrupamiento. Para las variables que describen el número de observaciones mayores a 6.5 ppm de oxígeno disuelto y menores no iguales a 6.6 ppm de oxígeno disuelto, sólo una de ellas fue utilizada, ya que están completamente correlacionadas.

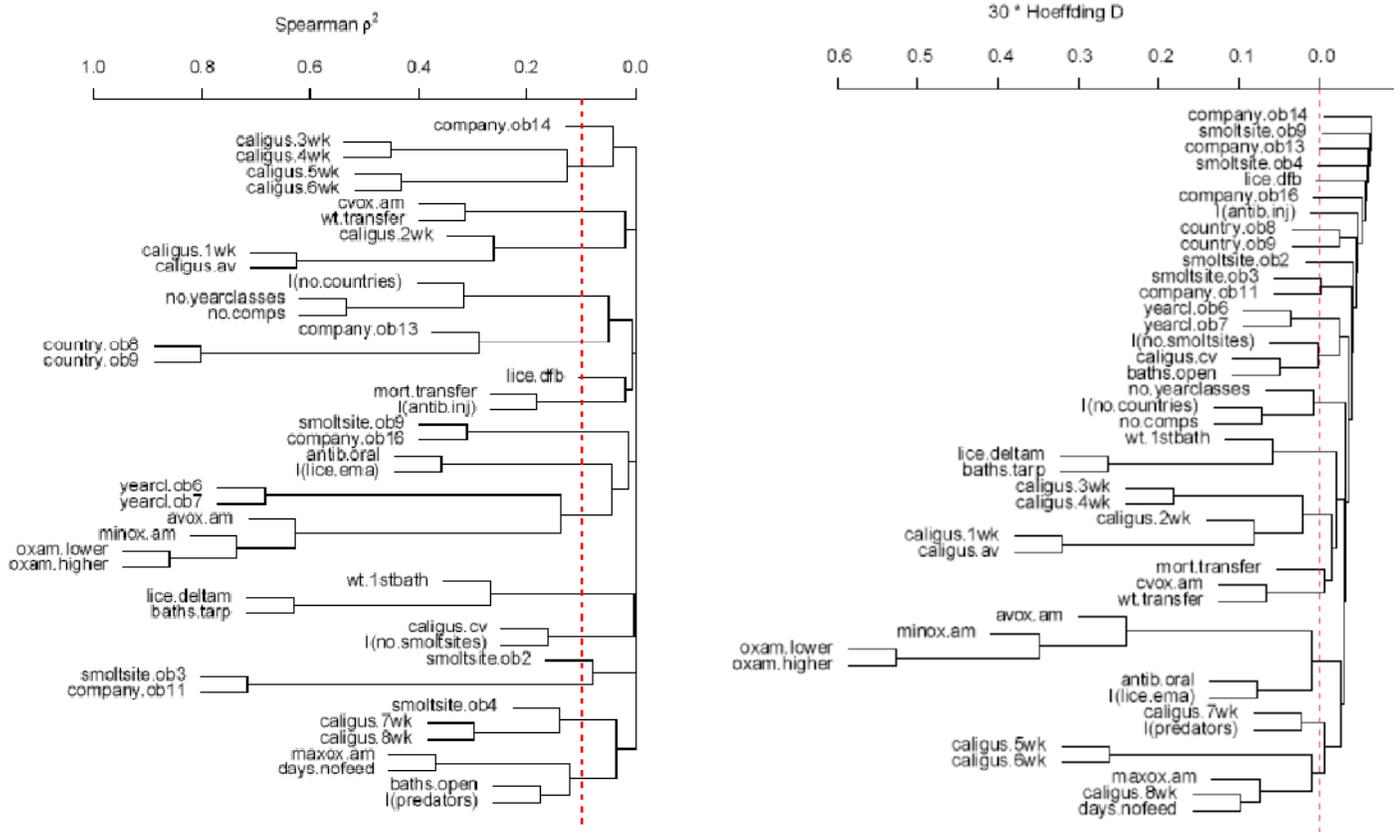


Figura 1: Agrupamientos de variables según la ρ^2 de Spearman y la D de Hoeffdings. La línea punteada demarca el valor umbral utilizado, 0.1 y 0, respectivamente.

Los agrupamientos se muestran en la Figura 1. El contenido de cada grupo está dado en la Tabla 10. El agrupamiento por la ρ^2 de Spearman dio como resultado once grupos, mientras que el agrupamiento por la D de Hoeffdings, dio como resultado a nueve. Las variables consideradas tras el análisis de redundancia fueron diez y están dadas en la Tabla 11. Finalmente, las variables resultantes de la selección por representatividad están dadas en la Tabla 12 y fueron un total de catorce.

Una vez analizados, ninguno de los modelos muestra alguna relación significativa o confiable en cuanto a factores de riesgo. Todos los factores contaron con amplios intervalos de confianza, por lo que no se pueden hacer aseveraciones certeras sobre ellos. Sin embargo, se pueden hacer algunas observaciones en cuanto a la magnitud de algunos efectos. Coeficientes de regresión positivos se relacionan con un mayor riesgo de brote, mientras que valores negativos se relacionan con una menor probabilidad de brote.

Tabla 10: Descripción de los grupos por métodos aglomerativos usados en el análisis multivariado de Spearman y Hoeffdings:

Número de grupo	Spearman ρ^2	Hoeffdings D
1	predators (predadores), maxox.am (niveles máximos de oxígeno AM), days.nofeed (días de ayuno), baths.open (baños con faldón)	days.nofeed (días de ayuno), Caligus.8wk (<i>Caligus</i> 8 semanas antes del brote), maxox.am (niveles máximos de oxígeno AM)
2	antib.oral (tratamientos con antibióticos orales), lice.ema (tratamientos con emamectina oral)	antib.oral (tratamientos con antibióticos orales), lice.ema (tratamientos con emamectina oral)
3	minox.am (niveles mínimos de oxígeno en la mañana), avox.am (promedio de oxígeno), oxam.higer (medición máxima de oxígeno AM)	minox.am (niveles mínimos de oxígeno AM), avox.am (promedio de oxígeno), oxam.higer (medición máxima de oxígeno AM)
4	Caligus.3wk (<i>Caligus</i> 3 semanas antes del brote), Caligus.4wk (<i>Caligus</i> 4 semanas antes del brote), Caligus.5wk (<i>Caligus</i> 5 semanas antes del brote), Caligus.6wk (<i>Caligus</i> 6 semanas antes del brote)	baths.open (baños con deltametrina con faldón), Caligus.cv (coeficiente de variación de <i>Caligus</i>), no.smoltsites (cantidad de sitios de “smoltificación”)
5	Caligus.7wk (<i>Caligus</i> 7 semanas antes del brote), Caligus.8wk (<i>Caligus</i> 8 semanas antes del brote)	Caligus.7wk (<i>Caligus</i> 7 semanas antes del brote), predators (predadores)
6	cvox.am (coeficiente de variación de oxígeno AM), wt.transfer (peso medio al traslado a mar)	cvox.am (coeficiente de variación de oxígeno AM), wt.transfer (peso medio al traslado a mar), mort.transfer (mortalidad a la transferencia a mar)
7	Caligus.1wk (<i>Caligus</i> 1 semanas antes del brote), Caligus.2wk (<i>Caligus</i> 2 semanas antes del brote), Caligus.av (promedio de <i>Caligus</i> 8 semanas antes del brote),	Caligus.av (promedio de <i>Caligus</i> 8 semanas antes del brote),

Número de grupo	Spearman ρ^2	Hoeffdings D
8	mort.transfer (mortalidad acumuladas a las 8 semanas de la tranferencia a mar), antib.inj (cantidad de tratamientos con antintibióticos inyectables)	no.comps (cantidad de compañías productoras de “smolts” en el centro), no.countries (cantidad de países productores de “smolts” en el centro), no.yearclases (cantidad de generaciones de peces presentes en el centro)
9	no.comps (cantidad de compañías productoras de “smolts” en el centro), no.countries (cantidad de países que dieron origen a las ovas utilizadas para producir los de “smolts” en el centro), no.yearclases (cantidad de generaciones de peces presentes en el centro)	wt.1stbath (peso al primer baño), lice.deltam (tratamiento con deltametrina por baño), baths.tarp (número de baños con deltametrina con lona)
10	wt.1stbath (peso medio al primer baño), lice.deltam (tratamiento con deltametrina por baño), baths.tarp (número de baños con deltametrina con lona)	
11	no.smoltsites (cantidad de sitios de “smoltificación” en el centro), calicus.cv (coeficiente de variación de <i>Caligus</i>)	
Sin agrupar	lice.dfb (tratamientos con diflubenzuron oral), company.ob (empresa proveedora de ovas), smoltsite.ob (centro de smoltificación), yearcl.ob (generación), country.ob (país de origen de las ovas)	lice.dfb (tratamientos con diflubenzuron oral), antib.inj (cantidad de tratamientos con antintibióticos inyectables), company.ob (empresa proveedora de ovas), smoltsite.ob (centro de smoltificación), yearcl.ob (generación), country.ob (país de origen de las ovas)

Tabla 11: Descripción de las variables escogidas por análisis por redundancia

Variable	Significado
oxam.higer	Nivel máximo de oxígeno disuelto medido en la mañana.
Caligus.5wk	Tasa de infestación por <i>Caligus</i> 5 semanas antes del brote.
Caligus.7wk	Tasa de infestación por <i>Caligus</i> 7 semanas antes del brote.
Caligus.av	Promedio de <i>Caligus</i> de las 8 semanas antes del brote.
wt.transf	Peso de los peces al traslado a mar.
days.nofeed	Días de ayuno.
yearcl.ob	Generación productiva de los peces (2005, 2006 o 2007).
smoltsite.ob	Centro de “smoltificación”.
company.ob	Empresa proveedora de ovas.
no.yearclasses	Cantidad de generaciones productivas de peces presentes en el centro.

Tabla 12: Descripción de las variables escogidas por representatividad

Variable	Significado
oxam.higer	Para representar condiciones máximas de oxígeno disuelto en la mañana.
Caligus.av	Para representar severidad de infestación por <i>Caligus</i> .
mort.transfer	Para representar la mortalidad a la transferencia.
wt.transfer	Para representar peso al traslado a mar
days.nofeed	Para representar condiciones de ayuno
yearcl.ob	Para representar la generación del grupo de peces que hizo brote.

smoltite.ob	Para representar el centro de “smoltificación” del grupo que hizo brote
company.ob	Para representar la empresa que originó las ovas del grupo que hizo brote
no.comps	Para representar la cantidad de compañías presentes en el centro.
no.yearclasses	Para representar la cantidad de generaciones presentes en el centro.
baths	Para representar la cantidad de baños recibidos.
antib	Para representar la cantidad de tratamientos con antibióticos.
lice	Para representar la cantidad de tratamientos contra <i>Caligus</i> .

El modelo de regresión logística basado en la ρ^2 de Spearman (Figura 2) indica que una mayor tasa de ataque de predadores, un mayor porcentaje de días en ayuno, los baños con deltametrina contra *Caligus* con faldón y niveles más bajos de oxígeno en AM (Grupo 1) pueden aumentar la incidencia de un brote (coeficiente de 0.68). En cambio, una menor variación en los niveles de oxígeno en AM y un mayor peso medio al traslado al mar (Grupo 6), parecen disminuir la incidencia de un brote (coeficiente de -0,56). Los tratamientos con diflubenzurón (lice.dfb) están relacionados con una mayor incidencia de brotes (coeficiente de 1.53), pero debido a la completa ausencia de sitios que no hayan presentado brote y que hayan sido tratados con éste fármaco, la relación es cuestionable. Hubo diferencias entre las empresas de origen de ovas, sitios de “smoltificación” y países de origen de las ovas en relación al riesgo de brote. La empresa 14 (company.ob14; coeficiente de 1.28) y el sitio de “smoltificación” 3 (smoltsite.ob3; coeficiente de 0,84) presentaron un mayor riesgo de brote. Contrariamente a esto, el país de origen de las ovas 9 (country.ob9; coeficiente de -1,61) parece tener un menor riesgo de brote.

Modelo basado en la ρ^2 de Spearman

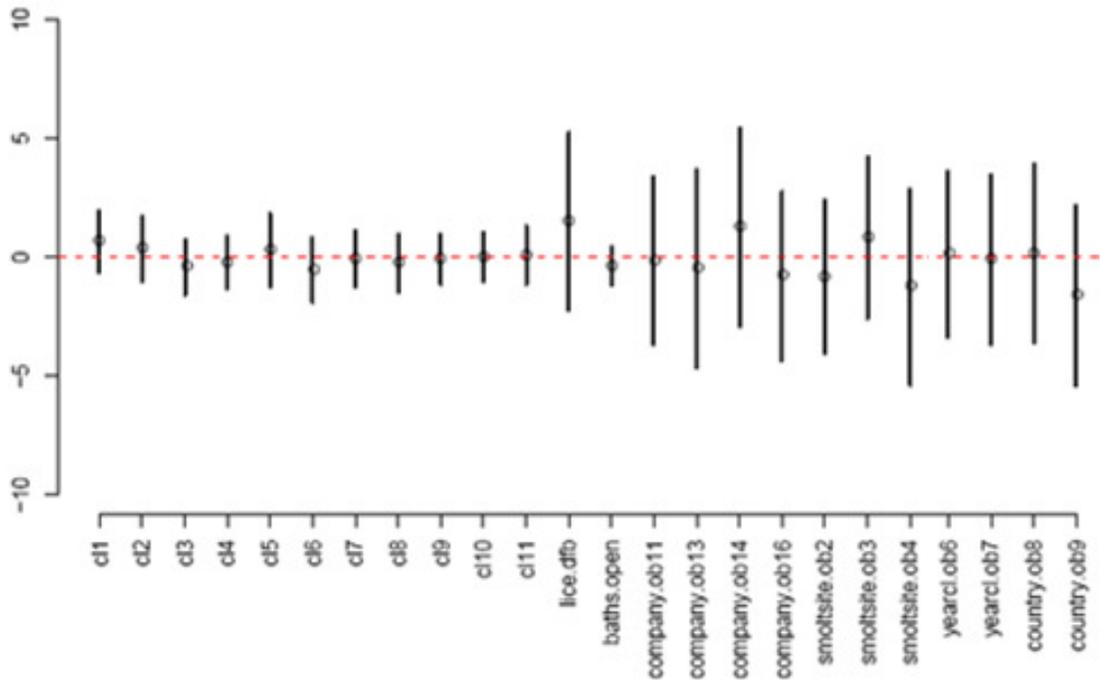


Figura 2: Resultados aplicando el modelo basado en la ρ^2 de Spearman que muestra los coeficientes y sus respectivos intervalos de confianza de 95% para los diferentes factores de riesgo estudiados. No se indica el intercepto para el modelo.

La regresión logística, siguiendo la reducción de datos de Hoeffding (Figura 3) indica que el grupo 1 (cd1; coeficiente de 0,53), 4 (cd4; coeficiente de 0,63) y 5 (cd5; coeficiente de 0,46) pueden tener un efecto relacionado con una situación de brote. Estos tres grupos tienen como denominador común su relación preponderante con *Caligus*, por lo que estarían relacionados con mayores niveles de infestación por este parásito como factor de riesgo. En cambio el grupo número 3 (cd3; coeficiente de -0,47) tiene un menor efecto sobre el riesgo de brote y está relacionado con buenas condiciones de oxígeno. Nuevamente encontramos un riesgo elevado en cuanto al uso de diflubenzurón (lice.dfb; coeficiente de

1,04) como agente antiparasitario, mientras que los tratamientos inyectables con antibióticos parecen tener un efecto menor sobre la posibilidad de brote (antib.inj; coeficiente de -1,45). En cuanto a la trazabilidad de los grupos, tanto el sitio de “smoltificación” número 3 (smoltside.ob3; coeficiente de 0,98) como la compañía productora de ovas 14 (company.ob14; coeficiente de 1,22) muestran una mayor tendencia a provocar un brote. En tanto, la compañía productora de ovas 16 (company.ob16; coeficiente de -0,8), el sitio de “smoltificación” número 2 (smoltsite.ob2; coeficiente de -0,82) y el país de origen número 9 (country.ob9; coeficiente de -1,74), muestran una menor probabilidad de brote (Figura 3).

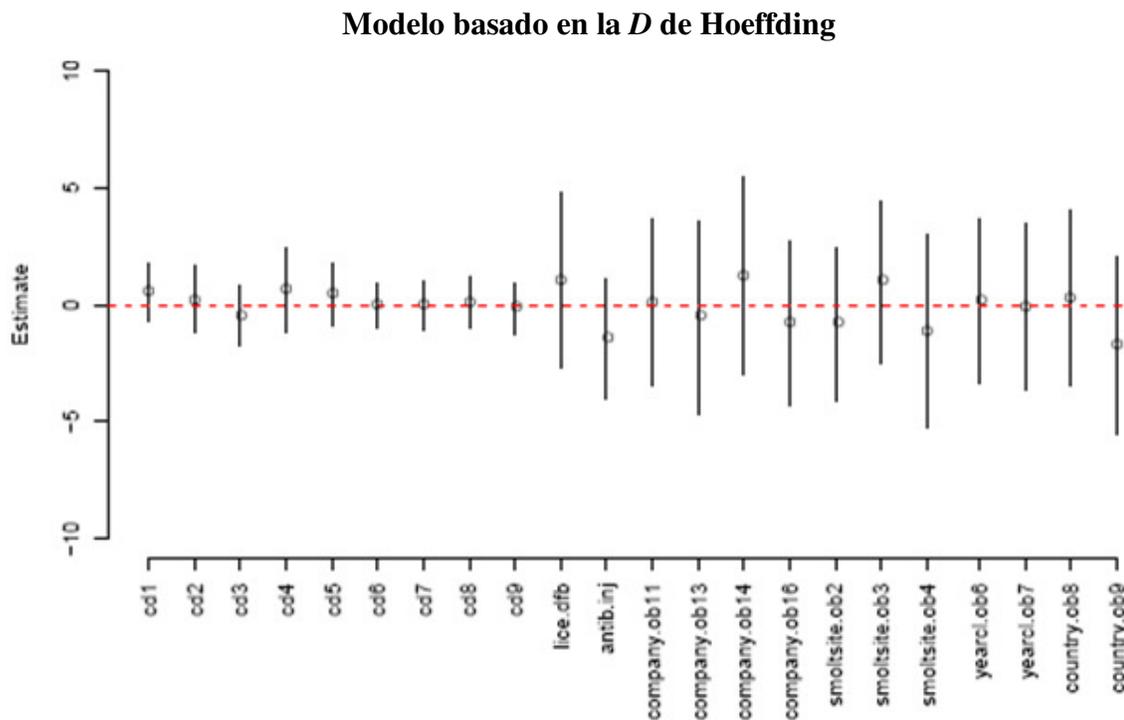


Figura 3: Resultados aplicando el modelo basado en la *D* de Hoeffding que muestra los coeficientes y sus respectivos intervalos de confianza de 95% para los diferentes factores de riesgo estudiados. No se indica el intercepto para el modelo.

El modelo basado en las variables restantes luego del análisis de redundancia revela que el mayor peso medio de los peces al traslado al mar contó con un amplio efecto

negativo sobre la posibilidad de brote (wt.transfer; coeficiente de -18,34), pero con una alta incertidumbre. Los peces provenientes del sitio de “smoltificación” número 4 (smoltsite.ob4; coeficiente de -1,16) y la compañía 13 (company.ob13; coeficiente de -1,07), presentan una menor posibilidad de brote. A su vez, los días de ayuno aparentemente tienen un efecto levemente positivo sobre la posibilidad de brote (days.bofeed; coeficiente de 0,15). Además, los peces provenientes del sitio de “smoltificación” número 14 (smoltsite.ob14; coeficiente de 0,24) también producen un leve incremento en la posibilidad de riesgo (Figura 4).

Modelo basado en el análisis de redundancia

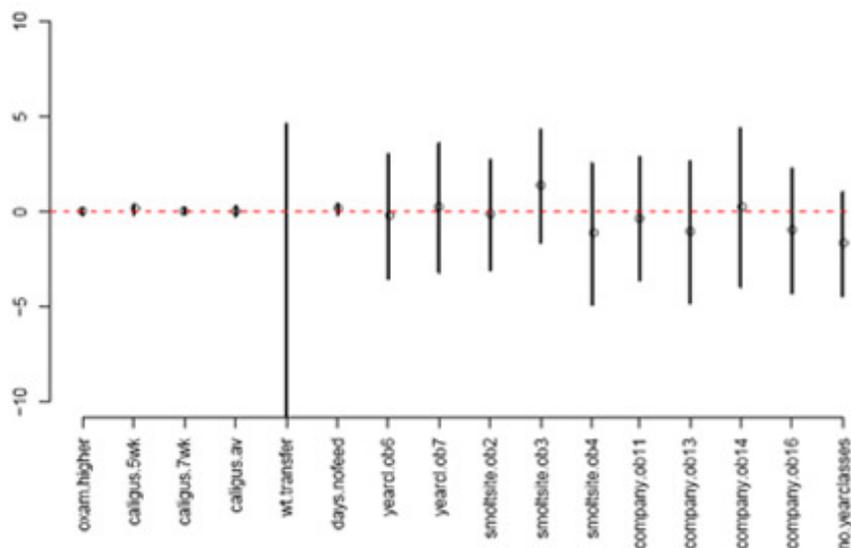


Figura 4: Coeficientes y sus respectivos intervalos de confianza de 95% para los diferentes factores de riesgo estudiados. No se indica el intercepto para el modelo. El valor para peso al traslado queda fuera de la escala, con un valor de -18,34 y amplios márgenes de confianza.

El modelo basado en selección de variables por representatividad, muestra nuevamente un importante efecto menguante sobre la posibilidad de brote de la variable “peso al traslado” (wt.transfer; coeficiente de -13,46), sin embargo, al igual que en el

modelo basado en el análisis por redundancia, ésta presenta una alta incertidumbre. La cantidad de generaciones de peces presentes en el sitio (no.yearclasses) sugiere un riesgo menor sobre la posibilidad de brote (coeficiente de -2,64). Similarmente al análisis anterior, los días de ayuno (days.nofeed) aparentemente aumentan en el riesgo de brote (coeficiente de 0,2). Además encontramos que el sitio de “smoltificación” número 3 (smoltsite.ob3; coeficiente de 1,14), la compañía productora de ovas número 11 (company.ob11; coeficiente de 0,34) y la compañía número 14 (coeficiente de 0,26), presentan un mayor riesgo de brote, al igual que la gran cantidad de compañías presentes en un sitio (coeficiente de 0,58). La suma de todos los tratamientos con antibióticos (coeficiente de -0,37) y la suma de todos los tratamientos con deltrametrina (coeficiente de -0,2) indican una menor posibilidad de brote, mientras que la suma de todos los tratamientos con emamectina como antiparasitario oral, indican un leve aumento en la posibilidad de brote (coeficiente de 0,13). (Figura 5)

Modelo basado en la selección de variables por representatividad

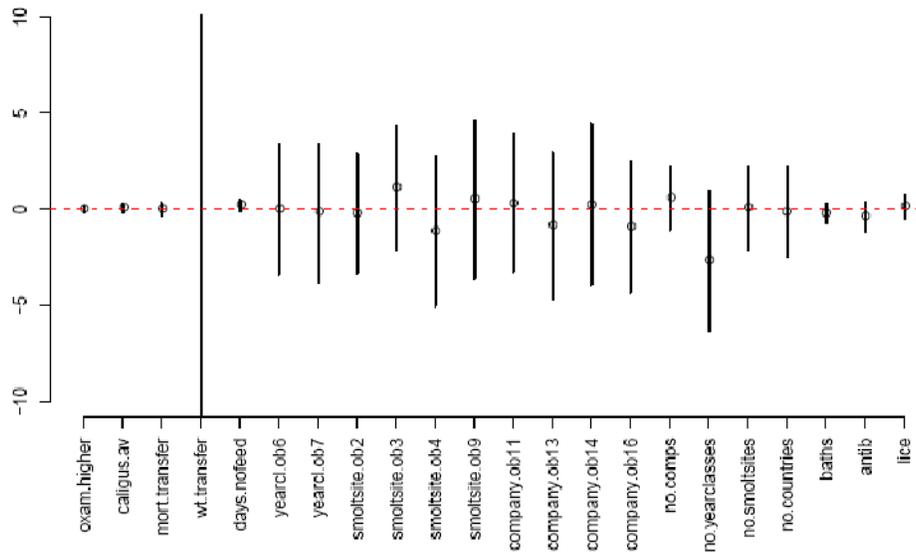


Figura 5: Coeficientes y sus respectivos intervalos de confianza de 95%. No se indica el intercepto para el modelo. El valor para peso al traslado queda fuera de la escala, con un valor de -13,43 y amplios márgenes de confianza.

6. DISCUSIÓN

6.1 Factores de riesgo ambientales:

Los salmónidos tienen requerimientos exigentes de oxígeno disuelto, y bajos niveles en este aspecto pueden llevar a situaciones de stress, que afectan directamente el sistema inmune de los peces, haciéndolos más susceptibles a contraer enfermedades infecciosas (Svobodova *et al.*, 1993, Crampton *et al.*, 2003, McClure *et al.*, 2005). Más aún, en casos severos es recomendable suspender la alimentación de los peces, debido a la mayor demanda de oxígeno durante la digestión (McClure *et al.*, 2005). En este aspecto, el análisis univariado arrojó una diferencia significativa entre las medias de oxígeno para los sitios en brote y los que no presentaron la enfermedad. Si bien ninguna de las dos medias está por debajo del umbral de los 6,5 ppm de oxígeno disuelto, es de considerar que en promedio los sitios positivos presentaron 63,5% más días con niveles de oxígeno considerados críticos comparados con los sitios que no presentaron brote. El análisis multivariado no logra establecer sino una posible relación, en este caso protectora, de mejores condiciones de oxígeno en relación a la ausencia de brote.

Factores que posiblemente puedan haber influenciado este fenómeno, podrían ser la ubicación geográfica de los sitios de cultivo y la estación del año. La mayoría de los sitios que presentaron brote corresponden a concesiones marítimas antiguas, ubicadas en aguas de menor corriente marítima y de menor profundidad. Esto, sumado al uso continuo de estas concesiones durante años, y en consecuencia, el depósito orgánica en el suelo marino y la resultante anaerobiosis, podrían conducir a condiciones de baja oxigenación del agua (Svobodova *et al.*, 1993). En cambio, la gran mayoría de los sitios que no presentaron brote se ubican en concesiones ocupadas hace un menor tiempo y que se encuentran más expuestas a corrientes marinas, lo que lleva a un mayor recambio de agua en la zona y a una mejor oxigenación.

Se evidencia así el rol preponderante que juega esta variable en términos de la presentación de la anemia infecciosa, en vista de los efectos nocivos que tiene sobre el sistema inmune de los peces la carencia de oxígeno. La evidencia sugiere que episodios continuos de bajos niveles de oxígeno llevan a favorecer un brote, fenómeno que se ve

acentuado durante los meses más estivales, ya que a mayores temperaturas y salinidad, se produce un gradiente negativo en la cantidad máxima de oxígeno que se puede disolver en el agua. Además, el aumento de la temperatura y luminosidad está asociado a una mayor cantidad de fitoplancton presente en el agua marina, el cual es un productor de oxígeno derivado de la fotosíntesis durante el día, pero se transforma en un consumidor neto durante la noche. Esto produce bajas importantes de oxígeno en la noche y particularmente durante el alba (Crampton *et al.*, 2003). La concentración de fitoplancton presente en el mar de la décima y undécima región de Chile varía estacionalmente, observándose un incremento de máxima abundancia en primavera (Fuica, *et al.*, 2007). Ambas condiciones, altas temperaturas del agua y aumento en la cantidad de fitoplancton, ocurren durante la temporada primavera-verano, temporada en la que se han registrado la mayor cantidad de brotes en este estudio. Esta estacionalidad en los brotes ya ha sido descrita anteriormente por Rolland *et al.*, 2003, sin embargo, ha sido discutida por algunos autores, que aseguran que la estacionalidad no se debe a condiciones climáticas, sino que en realidad es producida durante la temporada normal de traslado de “smolts” a mar en primavera, manejo y estado fisiológico que los hacen más susceptibles a contraer la enfermedad. Por otra parte, la estacionalidad registrada en éste estudio implica que la mayor parte de la transmisión e incubación viral ocurre previo al mes de Octubre, cuando la temperatura del agua aún es menor. Luego, la incidencia acumulada de brotes comienza a aumentar hasta alcanzar un máximo durante los meses de verano, cuando la temperatura del agua llega a su máximo anual.

Cabe señalar que en el presente estudio, tan sólo un 13% de los grupos que presentaron brote durante la temporada primavera-verano fueron trasladados unos pocos meses antes a mar. Más aún, un 61% de los grupos que presentaron brote fueron trasladados a mar durante la temporada de otoño-invierno, desestimando así, en vista de los resultados de éste estudio, un efecto del traslado o estado de “smolt” sobre la presentación de los brotes.

6.2 Factores de riesgo del hospedero

Considerando la mortalidad acumulada por cierto período de tiempo como un reflejo del estado de salud de los peces durante ese mismo período; se ha descrito que la mortalidad acumulada luego del traslado de los peces al mar está relacionada con un mayor riesgo de presentar un brote de anemia infecciosa durante la segunda mitad del ciclo productivo en mar. Mayores tasas de sobrevivencia durante los comienzos del ciclo productivo en mar de los peces, pueden considerarse una medida indirecta de muchos factores de manejo sanitarios (Hammell y Dohoo, 2005a). En vista de este argumento, no se encontró una diferencia significativa relativa a las mortalidades al traslado de los peces en relación a los grupos que presentaron o no brote. Tampoco hubo resultados atingentes a la mortalidad al traslado como un posible factor de riesgo en vista del análisis multivariado.

En este aspecto también puede ser utilizada la variable de “peso al traslado” como un indicador del futuro estado sanitario de los peces. Se ha documentado la relación existente entre menores pesos al traslado con un mayor riesgo de presentar brotes de anemia infecciosa en el futuro, ya que el tamaño de los “smolts” refleja, de cierta manera, la calidad de la “smoltificación” de los peces (Gustafson, *et al.*, 2007). Estos resultados coinciden con el análisis realizado a los centros de cultivo investigados en esta memoria de título. Tanto a un nivel univariado como multivariado, este factor destaca como uno de los más importantes en cuanto a la presentación de brotes de anemia infecciosa. Es de suponer que peces pequeños, aún en un temprano estado de desarrollo y con una capacidad osmorreguladora aún no completamente adaptada a las condiciones de alta salinidad al momento de ser trasladados a mar, vean comprometidos su sistema inmune a futuro. Este argumento también es compartido por McClure *et al.*, 2005, quien encontró una relación entre bajos pesos al traslado y un mayor riesgo brotes de anemia infecciosa; atribuyendo un mayor peso de los “smolts” a una mejor adaptación al agua marina por parte de los peces. Consecuentemente, se podría esperar una mayor susceptibilidad a contraer y desarrollar la enfermedad en cuestión por parte de peces de bajo peso. Cabe destacar que el sitio que presentó el brote de mayor severidad registrado en éste estudio, fue además el sitio que presentó el menor peso al traslado, con tan sólo 77 gr, muy por debajo de la media de 143,9 gr registrada para los otros grupos que presentaron brote.

Siendo éste es un estudio observacional no es válido establecer una relación de causalidad entre factores. Sin embargo, el efecto del peso de los peces al traslado sobre la susceptibilidad a presentar la anemia infecciosa del salmón parece ser un importante indicador de riesgo.

Es necesario enfatizar que existieron diferencias significativas entre los dos grupos en cuanto a la mortalidad registrada ocho semanas antes del brote. De hecho, los centros de cultivo que presentaron brote registraron en promedio un 4,2% de mortalidad acumulada total durante el período, duplicando así la mortalidad del grupo que no presentó la enfermedad. Éste aumento en la mortalidad se debería probablemente a una “subdiagnóstico” de ISAv en las etapas más tempranas de la enfermedad, en las que se podría producir un leve aumento de la mortalidad general de cada grupo, sin que ésta haya sido reconocida a tiempo.

Se sugiere la importancia del monitoreo de los patrones de mortalidad, puesto que ellos pueden ayudar a predecir similares patrones, dadas las mismas circunstancias productivas (Hammel y Dohoo, 2005b). Sin embargo, es posible que las mortalidades registradas antes de los brotes en este estudio sean más severas que en brotes futuros, ya que ésta fue la primera vez que los salmónidos fueron expuestos a tan elevadas cargas virales de ISAv en Chile. No se puede descartar la posibilidad de que a futuro pueda existir algún tipo de adaptación más favorable entre el huésped y el patógeno, debido a la coexistencia entre ellos a lo largo del tiempo o debido a la inmunización de los peces a través de vacunas contra la anemia infecciosa del salmón.

6.3 Factores de riesgo relacionados con *Caligus*

A pesar que se desconoce la importancia de la transmisión de ISAv a través de vectores biológicos en relación a otras vías de transmisión como la coprofagia, la transmisión pasiva a través de agua de mar o el rol del zooplancton y de las algas marinas como sustrato biológico, la transmisión de ISAv a través de vectores biológicos y/o mecánicos como maxilópodos copépodos, uno de ellos *Lepeophtheirus salmonis*, ha sido demostrada por Nylund (Nylund *et al.*, 1994). El hecho que la carga de *Caligus* es, según

los resultados de ésta memoria de título, un factor indicativo de brote, sugiere que una alta carga parasitaria es de alguna forma responsable de la complicada situación sanitaria vivida por la salmonicultura nacional durante la realización de este estudio. Sin embargo, lesiones producidas al tegumento por la acción de copépodos no son necesariamente la ruta de entrada del virus ISA al organismo, tal como lo plantea Nylund (Nylund *et al.*, 1994). Sino más bien es probable que una alta carga parasitaria cause un estado de estrés al pez lo que llevaría a un aumento de los niveles de cortisol sanguíneo, debilitando su sistema inmunitario, haciéndolo así más susceptible de contraer el virus o de producir un recrudescimiento de la enfermedad. Sin embargo, estudios realizados por la empresa de investigación EWOS Innovation en Chile, como parte de una tesis doctoral de la U. Católica de Valparaíso, han demostrado que el virus ISA es capaz de sobrevivir en *Caligus rogercresseyi* adultos hasta 48 horas fuera del huésped (Javier González, comunicación personal).

Los resultados de este estudio son contradictorios en cuanto al rol de los tratamientos contra el piojo de mar. Por una parte, el análisis univariado no arroja una diferencia significativa entre los tratamientos recibidos por ambos grupos, mientras que el análisis multivariado establece una cierta tendencia a que los tratamientos realizados con baños tienen incidencia en la presentación de un brote. Si bien un mayor control del *Caligus* debería llevar a una menor incidencia de brotes de anemia infecciosa, ya que se estaría eliminando un factor de estrés para los peces (McClure *et al.*, 2005), éste argumento parece ser válido únicamente para los tratamientos orales, pero no necesariamente para los tratamientos antiparasitarios externos. Esto, debido a que éste tipo de tratamientos implican generalmente un manejo estresante para los peces.

6.4 Otros factores

Tras el análisis de los datos se aprecia la importancia de la presión de predación recibida por los distintos grupos. Tal como lo plantea Gustafson, *et al.* (2007), mayores niveles de predación están asociados con presentaciones más tempranas de brotes.

En el caso de la salmonicultura chilena, la predación está asociada principalmente a la acción de lobos marinos y aves. Es importante considerar que la predación sobre las jaulas no es homogénea, encontrándose generalmente algunas jaulas más afectadas por este mal que otras. Este fenómeno también es notado por Gustafson, *et al.* (2007), quien asocia este hecho anecdótico a la distancia de las jaulas al área de actividad diaria de los humanos en los centros de cultivo, como también al estado de salud de los peces, existencia y calidad de barreras físicas a la predación, conformación y exposición a corrientes marinas de las jaulas. Cualesquiera sea el factor asociado, las mortalidades atribuidas a la predación pueden reflejar el nivel de estrés recibido por los peces. Este hecho puede influenciar la susceptibilidad de los peces a infecciones por ISA virus ó a la recrudescencia de una enfermedad latente con el subsecuente aumento en la liberación de partículas virales al ambiente.

En vista de éste estudio, la predación está relacionada con los días de ayuno. Una explicación para este fenómeno sería que la gran mayoría de los intervalos de no alimentación ocurren por malas condiciones climáticas, en las que la autoridad marítima declara “cierre de puerto”, con la consiguiente paralización de la faena productiva. Estos períodos pueden extenderse por días, durante los cuales no hay ningún control directo sobre los predadores, solamente el que existe por barreras físicas (redes loberas y mallas pajareras).

Por otro lado, es posible que la no ingesta de alimento durante repetidas ocasiones cause un estrés *per-se* a los peces, como también es posible que la voracidad y competencia de los peces al momento de la realimentación sea otro factor desencadenante de estrés, con el consiguiente aumento en la susceptibilidad de los peces a desarrollar un brote de anemia infecciosa del salmón. Ambos factores, además del mencionado anteriormente, lamentablemente no se encuentran documentados en la literatura científica especializada en relación a la anemia infecciosa, por lo que se requiere mayor investigación en el tema.

Aparentemente, existe una relación entre la generación de peces sembrada en mar y el riesgo en presentar un brote. Siendo la presentación de la enfermedad un evento multifactorial, sería difícil afirmar que la presentación de la enfermedad estaría asociada exclusivamente a una cualidad intrínseca del año de producción. La producción en mar de

ésta empresa en particular, se compone de peces provenientes de cuatro compañías diferentes productoras de “smolts”, por lo que es muy difícil hacer una aseveración generalista al respecto. Lo que podría explicar la diferencia existente entre las generaciones en relación a un brote es la carga viral que existe en el ambiente al momento de sembrar los peces. En Noruega, el tiempo promedio en la presentación de la enfermedad es de 12,2 meses luego del traslado a mar (Hammel y Dohoo, 2005b). Este promedio es muy similar al que presentaron las generaciones 2005 y 2006 sembradas en Chile, mientras que se aprecia un significativo acortamiento en el lapso de siembra-brote para la generación 2007. Considerando que la generación 2005 fue sembrada por completo antes del primer brote de anemia infecciosa en *Salmo salar* en Chile y que tan solo un 53% de la generación 2006 fuera sembrada posteriormente a aquel evento, no es de extrañar que la totalidad de la generación 2007 fuera sembrada durante las presentaciones de brotes de anemia infecciosa, particularmente durante las primeras etapas de la puesta en marcha del plan de contingencia contra este agente; plan que demostró ser insuficiente para controlar el contagio de ISA virus en Chile.

En cuanto a los orígenes de los peces como un factor de riesgo, no es posible hacer una afirmación concluyente al respecto. Si bien algunos autores, basándose en contundentes hallazgos filogenéticos, defienden la postura de la transmisión vertical como un importante mecanismo en la transmisión del virus (Nylund *et al.*, 2003, Vike *et al.*, 2008) el tema es aún muy debatido. En esta memoria, se plantea la posibilidad de tal suceso, ya que la empresa proveedora de ovas número 14, de origen extranjero, estaría relacionada con una mayor posibilidad de brote. A pesar de esto, el país de origen 9, que corresponde a peces importados, sería un factor protector en cuanto a la posibilidad de brote de anemia infecciosa. Esto contrastaría con el estudio realizado por Jarpe y Karlsen (1997), quien encontró una relación positiva entre los brotes de anemia infecciosa y “smolts” comprados a compañías extranjeras, si bien en Chile no se importan “smolts” del extranjero, sino ovas embrionadas. Sin embargo, al igual que Jarpe y Karlsen (1997), se encontró un mayor riesgo de brote asociado a encontrar simultáneamente en un sitio de cultivo “smolts” provenientes de diversas compañías, práctica frecuente en la industria nacional.

Cabe destacar que, independientemente del origen de los peces, existe la posibilidad que los peces se hayan contagiado horizontalmente durante el traslado o durante la fase de

“smoltificación”. En el caso del sitio de “smoltificación”, destaca el sitio número tres como el más importante en cuanto a riesgo de brote, ya que se trata de “smoltificación” en estuario, a diferencia de los otros sitios, los cuales son en su mayoría lagos. Si bien es inapropiado sacar conclusiones categóricas en base al análisis multivariado de esta memoria de título, sería prudente realizar estudios que determinen el riesgo relativo de brote en relación a si la “smoltificación” se llevó a cabo en lagos, estuarios o pisciculturas.

Finalmente, se podría sugerir retrospectivamente que la variante europea del virus ISA ha estado presente en Chile desde un período anterior a su diagnóstico en *Salmo salar* a mediados del año 2007. Sin embargo, la duración de este período es una incógnita. Asimismo, se debería considerar la relevancia de las generaciones de peces estudiadas en esta memoria de título, vale decir, los peces pertenecientes a las generaciones 2005 a 2007, para entender los factores de riesgo de la enfermedad. Esto, debido a la ausencia de medidas de control específicas para este virus durante el primer período del brote en Chile. Debido a la abundancia de centros de cultivo, la extrema cercanía entre ellos y a la relativa protección de fuertes corrientes marinas, el área más afectada por la epizootia, es decir, la vertiente oriental de la isla grande de Chiloé, ha sido identificada como un área idónea para una potencial exposición a virus ISA. Sin embargo, el potencial de exposición a este agente en otras áreas es aún discutido, principalmente debido a lo poco que se sabe sobre factores de riesgo que influyen sobre la presentación de esta enfermedad en Chile. Lo anterior no ha impedido que el virus se encuentre actualmente distribuido desde la décima hasta la duodécima región de Chile.

CONCLUSIONES

La evaluación de potenciales factores de riesgo en la ocurrencia de enfermedades que afectan a la empresa salmonera en cuestión es difícil, particularmente debido a la ausencia de una estandarización en el registro de muchas variables productivas y medio ambientales. La obtención de gran parte de la información recopilada para esta memoria de título requirió de un escrutinio minucioso de registros individuales, los cuales se encontraban dispersos en una red de información, producida tanto por personal de centros de cultivo, funcionarios administrativos y veterinarios.

La existencia de un método estandarizado y extenso de registros de información productiva y medio ambiental, facilitaría la recolección detallada de datos. Se obtendría así valiosa información para futuros estudios de factores de riesgo de brotes de enfermedades en acuicultura.

Para realizar a futuro un estudio epidemiológico con resultados sólidos, es necesaria la colaboración de varias empresas salmoneras del país. El principal problema que se encontró al realizar el análisis de los datos de esta memoria de título fue precisamente la escasa cantidad de sitios de cultivo con los que se contaba. Esto, a pesar que se trabajó con la información proveniente de una de las empresas salmoneras más grandes del país. Considerando que a pesar de este obstáculo se lograron extraer ciertas conclusiones, el beneficio de una base de datos más extendida es indiscutible.

En cuanto a los factores de riesgo, podemos concluir que la mayoría de ellos están relacionados con condiciones medio ambientales (oxígeno, carga de *Caligus*, estación del año, predación) y buenas prácticas productivas (condición corporal y sanitaria de peces a la siembra, ayuno). De esta forma, a partir de los resultados de esta memoria de título, se sugiere una lista de medidas para prevenir un posible brote de anemia infecciosa:

- Para prevenir problemas relacionados con la oxigenación del agua, es necesario ubicar los centros de cultivo en áreas expuestas a las corrientes marinas y evitar áreas de surgimientos de aguas bentónicas desoxigenadas. Además, es recomendable administrar oxígeno adicional a las jaulas a través de difusores,

apenas las mediciones diarias de oxígeno registren niveles menores a 6,5 ppm de oxígeno disuelto.

- Es necesario evaluar constantemente las tendencias de los patrones de mortalidad de los centros de cultivo, buscando evidencias que sugieran la posible presentación de un brote. En el caso de esta memoria de título, el uso de la técnica de diagnóstico por RT-PCR muestra ser una herramienta útil de detección temprana del virus en los centros de producción.
- Se necesita mantener un control eficiente sobre la carga de *Caligus rogercresseyi*. Para lograr éste propósito es recomendable evitar el uso excesivo de antiparasitarios externos como herramienta de control. Idealmente se debería privilegiar el uso y rotación de antiparasitarios orales, además de establecer una estricta coordinación de los tratamientos por zona geográfica.
- Debido a la dificultad en el control de predadores, es imperativo mantener las barreras físicas para la prevención de la predación en un óptimo estado. Las inspecciones rutinarias de los buzos para evaluar la integridad de las mallas loberas debería ser parte integral de la mantención de un centro de cultivo, como también cuidar del estado de las redes pajareras.
- Para asegurar el éxito en la fase de engorda, se requiere comenzar el ciclo con las mejores condiciones productivas y sanitarias posibles. Un factor muy importante a considerar es evitar a toda costa el traslado de peces a mar con una “smoltificación” incompleta, debido a que este factor está fuertemente relacionado con la posibilidad de brote a futuro.
- En cuanto a los ayunos, es altamente recomendable que aquéllos sitios más propensos a los embates climáticos cuenten con sistemas de alimentación automáticos controlados remotamente, para así evitar que el clima interrumpa la rutina de alimentación.
- Se recomienda intensificar las medidas señaladas anteriormente durante la estación primavera-verano, debido al aumento en la incidencia de brotes durante este período.

- La detección precoz del agente a través de pruebas rutinarias (RT-PCR) es una poderosa herramienta que permite establecer medidas preventivas para los grupos afectados sin la necesidad de eliminar peces.
- Se recomienda establecer protocolos de “screening” obligatorios para ISAv tanto a reproductores, al momento del ingreso de las ovas a las pisciculturas, como también antes del traslado de los peces a mar.
- Eventualmente, se recomienda eliminar las importaciones de ovas embrionadas desde el extranjero, evitando así la posibilidad de una reintroducción del virus o la llegada de otros agentes patógenos al medio ambiente nacional.

Debido al gran movimiento de los peces entre pisciculturas y centros de “smoltificación”, ha sido imposible determinar fehacientemente si existe alguna relación entre los brotes y el origen de los peces. Sería conveniente realizar un estudio epidemiológico futuro con el apoyo de herramientas filogenéticas para así tratar de establecer alguna relación entre centros de engorda, centros de “smoltificación”, pisciculturas y grupo de reproductores.

BIBLIOGRAFÍA

ASPEHAUG, V., MIKALSEN, A., SNOW, M., BIERING, E., VILLOING, S. 2005.

Characterization of the infectious salmon anemia virus fusion protein. Journal of Virology 79(19): 12544-12553.

BOUCHARD, D., BROCKWAY, C., KELEHER, W., MERRIL, P. 2001.

First report of infectious salmon anemia (ISA) in the United States. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 21: 86-88

CRAMPTON, V., BERGHAIM, A., GAUSEN, M, NÆSS, A., HOLLAND P. 2003.

Effects of low oxygen on fish performance. Oxygen levels in commercial salmon farming conditions. EWOS Perspective UK Edition 2: 8-13.

ELIASSEN, T., FROYSTD, M., DENNEVIG, B., JANKOWSKA, M., BRECH, A.,

FALK, K., ROMEREN, K., GJOEN, T. 2000. Initial events in infectious salmon anemia infection: evidence of the requirement of a low-pH step. Journal of Virology 74(1): 218-227.

DUNTEMAN, G. Principal components analysis. Newbury Park, Sage Publications, Inc.,

1989. 96p.

FARSTAD, W., BØE, E., ARMENO, J., BRAASTAD, B., FOSSUM, K., HJELTNES,

B., HÅSTEIN, T., JUELL, J., VALLE OG RUNE WAAGBØ, P. 2007. Opinion of the panel on animal health and welfare of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety. Norwegian Scientific Committee for Food Safety 06/804.

FALK, K., NAMORK, E., RIMSTAD, E., MJAALAND, S., DANNEVIG, B. 1997.

Characterization of infectious salmon anemia virus, an orthomyxo-like virus isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Journal of Virology 71(12): 9016-9023.

- FALK, K., ASPEHAUG, V., VLASAK, R., ENDRESEN, C.** 2004. Identification and characterization of viral structural proteins of infectious salmon anemia virus. *Journal of Virology* 78(6): 3063-3071.
- FUICA N., ROJAS X., CLÉMENT A., BITTNER V., SILVA M., URIBE C.** 2007. Ocurrencia e impacto de las FANs en la salmonicultura en el sur de Chile: análisis del programa de monitoreo de INTESAL de SalmonChile. *Salmociencia* 2: 61-71
- GODOY, M., KIBENGE, F., AEDO, A., KIBENGE, M., GROMAN, D., GROTHUSEN, H., LISPERGUER, A., CALBUCURA, M., AVENDANO, F., IMILAN, M., JARPA, M.** 2007. First detection, isolation and molecular characterization of ISA-V in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Chile. *Salmociencia* 2: 47-55.
- GUSTAFSON, L., ELLIS, S., BARLETT, C.** 2005 Using expert opinion to identify risk factors important to infectious salmon-anemia (ISA) outbreaks on salmon farms in Maine, USA and New Brunswick, Canada. *Preventive Veterinary Medicine* 20: 17-28.
- GUSTAVSON, L., ELLIS, S., ROBINSON T., MARENGHI F., HAWKINS L., WAGNER B.** 2007 Spatial and non-spatial risk factors associated with cage-level distribution of infectious salmon anemia at three Atlantic salmon, *Salmo salar* L., farms in Main, USA. *Journal of Fish Diseases* 30: 101-109.
- HAMMELL, K., DOHOO, I.** 2005a Mortality patterns in infectious salmon anemia virus outbreaks in New Brunswick, Canada. *Journal of Fish Diseases* 28: 639-650.
- HAMMELL, K., DOHOO, I.** 2005b Risk factors associated with mortalities attributed to infectious salmon anemia virus in New Brunswick, Canada. *Journal of Fish Diseases* 28: 651-661.

- JARP, J., KARLSEN, E.** 1997. Infectious salmon anemia (ISA) risk factors in sea-cultures Atlantic salmon *Salmo salar*. Diseases of Aquatic Organisms 28: 79-86
- KIBENGE, F., GARATE, O., JOHNSON, G., ARRIAGADA, R., KIBENGE, M., WADOWSKA, D.** 2001. Isolation and identification of infectious salmon anemia virus (ISAV) from Coho salmon in Chile. Diseases of Aquatic Organisms 45: 9-18.
- LYNGSTAD, T., JANSEN, P., SINDRE, H., JONASSEN, C., HJORTAAS, M., JOHNSEN, S., BRUN, E.** 2007. Epidemiological investigation of infectious salmon anemia (ISA) outbreaks in Norway 2004-2005. Preventive Veterinary Medicine 84: 213-227.
- NORMAN, G. y STREINER, D.,** Biostatistics: the bare essentials. 3^a ed. Shelton, Peoples medical publishing house, 2008. 393p.
- MCCLURE, C., HAMMEL, K., DOHOO, I.** 2005. Risk factors for outbreaks of infectious salmon anemia in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. Preventive veterinary medicine 72: 263-280.
- MJAALAND, S., RIMSTAD, E., FALK, K., DANNEVIG, B.** 1997. Genomic characterization of the virus causing infectious salmon anemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): an orthomyxo-like virus in teleost. Journal of Virology 71(10): 7681-7686.
- MJAALAND, S., HUNGNES, O., TIEG, A., DANNEVIG, B., THOURD, K., RIMSTAD, E.** 2002. Polymorphism in the infectious salmon anemia virus hemagglutinin gene: Importance and possible implications for evolution and ecology of infectious salmon anemia disease. Virology 304: 379-391

- MULLINS, J., GROMAN, D., WADOWSKA, D.** 1998. Infectious salmon anemia in salt water Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in New Brunswick, Canada. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 18(4): 110-114.
- NYLUND A., HOVLAN, T., HODNELAND K., NIELSEN F. & LØVIK P.** 1994. Mechanisms for transmission of infectious salmon anaemia (ISA). Diseases of Aquatic Organisms 19: 95-100.
- NYLUND, A., DEVOLD, M., PLARRE, H., ISDAL, E., AARSETH., M.** 2003. Emergence and maintenance of infectious salmon anemia virus (ISAV) in Europe: a new hypothesis. Diseases of Aquatic Organisms 56: 11-24.
- NYLUND, A., PLARRE, H., KARLSEN, M., FRIDELL, F., OTTEM, K., BRATLAND, A AND SAETHER, P.** 2007. Transmission of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in farmed populations of Atlantic salmon (*Salmo salar*) Archives of Virology. 152: 151-179.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (OIE)** 2006. Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos, 5a edición, Paris, versión on-line. <http://www.oie.int>.
- QUINN G., KEOUGH M.** Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge, Cambridge University press, 2002. 539p.
- RODGER, H., TURNBULL, T., MUIR, F., MILLAR, S., RICHARDS, R.** 1998. Infectious salmon anemia (ISA) in the United Kingdom. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 18: 115-116.
- ROLLAND, J., WINTON, J.** 2003. Relative resistance of pacific salmon to infectious salmon anemia virus. Journal of Fish Diseases 26: 511-520.

- SALMONCHILE, DEPARTAMENTO DE ESTUDIOS** 2009. Summary of the Chilean salmon industry 2009. Ficha industria del salmón N° 12/2008
- STEAD, S., LAIRD, L.** Handbook of salmon farming. Chichester, Springer-Praxis Books, 2001. 505p.
- SVOBODOVÁ, Z., LLOYD, R., MÁCHOVÁ, J., VYKUSOVÁ, B.** 1993. Water quality and fish health. EIFAC Technical Paper FAO 54.
- THORUD, K., DJUPVIK, H.** 1988. Infectious anemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 8: 109-111.
- VIKE, S., NYLUND S., NYLUND, A.** 2008. ISA virus in Chile, evidence of vertical transmission. Archive of Virology 2009 154(1): 1-8.
- WILHELM, J., PINGOUD, A.** 2003. Real-Time Polymerase Chain Reaction. ChemBioChem 4: 1120-1128.