



# **UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS**

**ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO**

**COMPARACIÓN DE LA PROBABILIDAD DE  
SUPERVIVENCIA ENTRE DISTINTAS FAMILIAS DE  
SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*) DESAFIADAS CON  
*Piscirickettsia salmonis***

**GIANCARLO ANTONIO MANNESCHI GALLARDO**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO  
DE MAGÍSTER EN  
CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS  
Mención en Patología Animal y al  
Título Profesional de Médico Veterinario**

**Santiago, Chile  
2013**



# **UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO**

**COMPARACIÓN DE LA PROBABILIDAD DE  
SUPERVIVENCIA ENTRE DISTINTAS FAMILIAS DE  
SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*) DESAFIADAS CON  
*Piscirickettsia salmonis***

**GIANCARLO ANTONIO MANNESCHI GALLARDO**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO  
DE MAGÍSTER EN  
CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS  
Mención en Patología Animal y al  
Título Profesional de Médico Veterinario**

**DIRECTOR TESIS:**

**DR. PEDRO SMITH SCHUSTER**

**INNOVA N° 05CT6PPT-10  
FONDECYT N° 1080692**

**Santiago, Chile  
2013**



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

## COMPARACIÓN DE LA PROBABILIDAD DE SUPERVIVENCIA ENTRE DISTINTAS FAMILIAS DE SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*) DESAFIADAS CON *Piscirickettsia salmonis*

**GIANCARLO ANTONIO MANNESCHI GALLARDO**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO  
DE MAGÍSTER EN  
CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS  
Mención en Patología Animal y al  
Título Profesional de Médico Veterinario

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : PEDRO SMITH S.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: CONSUELO BORIE P.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: PEDRO ABALOS P.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: JULIO LARENAS H.	.....	.....

Santiago, Chile  
2013

A Raffaella Manneschi Ahumada

## Agradecimientos

A Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos.

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de vida, por su incondicional apoyo en cada momento.

A mi madre Ana Gallardo.

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi padre Armando Manneschi.

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por enseñarme el valor de la lucha constante, por darme el valor para salir adelante y por su eterno amor.

A mi hermano Claudio Manneschi.

Por siempre poder contar contigo, ser un ejemplo de hermano y de superación los que me inspiraron a seguir creciendo y aprendiendo tanto en lo académico como en la vida. Gracias a su apoyo puedo decir misión cumplida.

A Raquel Paredes.

Simplemente por ser tu, por criarnos con tanto amor, por tus mimos y por enseñarnos a ser hombres de bien.

A mi hija Rafaella por su inmenso amor que me da fuerzas cada día, por regalarme la paz de uno de sus abrazos y enseñarme a disfrutar la vida. A Graciela por su apoyo y paciencia, y por darme el mejor regalo de la vida, mi hija Rafa.

A todas mis tíos y primos que me daban ánimos para seguir adelante, Gloria Vargas, Walther Manneschi, Mariangela Manneschi.

A mi profesor guía Pedro Smith S., por su gran motivación y confianza indispensables en este proyecto, por compartir de forma tan humana su conocimiento, por su orientación, comprensión y amistad. A María Estela Rojas y Soraya Díaz por su invaluable ayuda, su excelente disposición y alegría. A Miguel Valdés por su gran amistad, por guiarme al laboratorio, su ayuda, consejos y eternas conversaciones, que junto a Camila Corbalán fueron un gran apoyo, quien nos aguantó en tan largo proceso.

A Pamela Palma, Daniel Carrasco y Álvaro Guajardo por acogerme en Chiloé y hacerme sentir uno más de la familia, por sus enseñanzas y por todos los momentos que recuerdo con mucho cariño.

A mis compañeros de universidad por todos esos momentos memorables de estudio, fiestas y bulling, que nos fueron formando como personas, profesionales y que hoy nos hacen grandes amigos. A María Olga Bargsted, Gonzalo Muñoz, Daniela Siel, Rafael Sevilla, Raúl Alegría, Mario Caruffo, Pablo Galdames, Paulina Avendaño, Natalia Pau y a toda la generación.

A mis compañeros de magister, Catalina Pardo y a su marido Felipe por compartir la alegría y tranquilidad de Colombia, junto con el café y la amistad. Y a Giovanna Cáceres y Pablo Salah junto con Catalina por hacer del magister una de las instancias más enriquecedoras que he vivido.

## Biografía

Nací el 31 de Agosto de 1983, en la ciudad de Santiago. Mis padres Ana Gallardo Vargas y Armando Manneschi Bozzi ambos profesores de Química de la Universidad de Chile comenzaron la mayor aventura de sus vidas, criarnos a mi hermano y a mí. Si bien apenas había llegado al mundo, ya contaba con un gran guía mi hermano mayor Claudio Manneschi Gallardo nacido en Septiembre de 1980 quién me ha acompañado en todo momento y ha sido mi gran ejemplo.

Mi educación comienza a los 4 años cuando acompañaba a mi hermano al jardín infantil “BETELGEUSE”, en la comuna de Ñuñoa. Institución donde todas las mañanas acompañados y bajo el cuidado de Raquel Paredes, que más que una ama de llaves, es hasta el día de hoy nuestra segunda madre, caminábamos jugando hasta llegar a casa.

Mi educación básica comenzó en el colegio Universitario el Salvador donde cursé hasta tercer año de enseñanza básica. Posteriormente continué mis estudios en el Instituto de Humanidades Luis Campino donde egresé de cuarto año medio el año 2001.

Luego de rendir la prueba de aptitud ingresé a la escuela de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile el año 2003. En la escuela logré formarme como profesional y persona, conociendo a grandes profesores que marcaron mi educación enseñándome la pasión por tan noble carrera. Junto con el estudio también nacieron grandes amistades que espero lleguen a estar presentes durante toda mi vida.

En el año 2008 llegué al laboratorio de Patología de peces donde rápidamente se dio inicio a mi proyecto de tesis de pregrado, gracias al contacto de quién hoy es un gran amigo, Miguel Valdés. Ya en el laboratorio conocí al resto del equipo, el doctor Pedro Smith, María Estela Rojas, Soraya Díaz, Damaris Vega, Teresa Heredia, Víctor Jiménez personas de gran corazón que fueron decisivas en mi desarrollo profesional y de las cuales estoy eternamente agradecido. Al poco tiempo de ingresar al laboratorio bajo la tutela del doctor Pedro Smith, fui trasladado a la ciudad de Castro, Chiloé. Una vez instalado en el Centro de Estudios Acuícolas de la Universidad de Chile, a cargo del Médico Veterinario Álvaro Guajardo, quién me recibió en su casa junto con Pamela Palma y Daniel Carrasco. Hoy grandes amigos, que me abrieron las puertas de su hogar y se convirtieron al poco tiempo en mi segunda familia.

La estadía en Chiloé duró alrededor de 6 meses, tiempo durante el cual el arduo trabajo me enseñó mucho tanto profesionalmente, como en mi crecimiento personal, transformándose en una maravillosa experiencia de vida.

En el año 2010 estando a punto de titularme, se me ofrece la oportunidad de iniciar el programa de Magister en la misma Universidad. Esta instancia me permitió profundizar conocimientos y prepararme de mejor forma al mundo laboral. Fue a todas luces un acierto más en mi vida. El mismo año, en abril, fallece mi Padre, un duro golpe para mí y mi familia que nos enseñó lo frágil que es la vida, la fuerza y la unión.

El año 2011 ocurre el suceso más importante, aquel que me cambio la vida y me hizo verla de un modo completamente distinto, el nacimiento de mi hija Rafaella la bendición más grandes que llevo a nuestras vidas junto con Graciela Ahumada.

En lo laboral, después de trabajar alrededor de 5 años en diversas clínicas de animales menores, el año 2012 comienzo a trabajar en la empresa Centrovét donde, se me brinda la posibilidad de realizar investigación en salmones, oportunidad de la cual estoy profundamente agradecido y de la cual pretendo disfrutar de los frutos de mi trabajo.

Finalmente el año 2013 se lleva a cabo mi titulación de Médico Veterinario de la Universidad de Chile y Magister en Medicina Veterinaria con Mención en Patología Animal.

Así han pasado 29 años en los cuales he podido alcanzar mis metas, muy agradecido por todo lo sucedido, lo bueno y lo malo, y por todas las personas que han aparecido en mi camino. De esta forma espero seguir avanzando, conociendo, experimentando y disfrutando de la que hoy es mi vida.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	
<b>SUMMARY</b>	
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	2
<b>3. OBJETIVOS</b>	19
<b>3.1. Objetivo general</b>	19
<b>3.2. Objetivos específicos</b>	19
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	20
<b>4.1. Peces</b>	20
<b>4.2. Inóculo</b>	21
<b>4.3. Instalación</b>	21
<b>4.4. Esquema desafío</b>	22

<b>4.5. Registro de datos y obtención de muestras</b>	24
4.5.1. Parámetros de calidad de agua	24
4.5.2. Registros y muestras desde los peces durante el ensayo	24
<b>4.6. Análisis estadístico</b>	25
<b>5. RESULTADOS</b>	26
<b>5.1. Temperatura del agua</b>	26
<b>5.2. Oxígeno disuelto en agua</b>	27
<b>5.3. Mortalidades</b>	28
5.3.1. Peces inoculados	28
5.3.2. Peces controles	35
<b>5.4. Análisis de supervivencia (Método Kaplan-Meier)</b>	36
<b>5.5. Peso y talla de los peces</b>	40
<b>6. DISCUSIÓN</b>	41
<b>7. CONCLUSIONES</b>	51
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	52



## RESUMEN

Se realizó un desafío experimental con el objeto de dilucidar si existe variación en la susceptibilidad/resistencia frente a piscirickettsiosis entre familias de la especie salmón del Atlántico (*Salmo salar*).

Para este fin, se emplearon 4.955 salmones del Atlántico, de edad aproximada 10 meses, en estadio de “pre-smolt” pertenecientes a 29 familias, cada una compuesta por propios hermanos. El número de peces inoculados por familia varió desde un mínimo de 80 hasta un máximo de 87 ejemplares. Los animales fueron infectados con *Piscirickettsia salmonis* mediante inyección intraperitoneal ( $0,2 \times 10^{3,8}$  DICT<sub>50</sub>/pez). A su vez, otros 86 individuos de cada familia fueron utilizados como control, siendo inyectados por la misma vía y en volumen equivalente, con solución “buffer” fosfato salino (PBS) pH 7,2 estéril. Los peces inoculados se mantuvieron cohabitando con los controles en dos estanques de 2,5 m<sup>3</sup> de modo de tener una réplica experimental.

El ensayo tuvo una duración de 52 días post-inoculación. Durante este período, se efectuaron registros diarios de mortalidad. Mediante el método estadístico de Kaplan-Meier, se obtuvieron los valores de supervivencia de cada familia y posteriormente estos datos fueron comparados usando la prueba de Log-rank.

Hubo mortalidades atribuibles a la enfermedad en todas las familias inoculadas con la bacteria y los porcentajes finales de mortalidad acumulada, ordenados por familia, variaron entre 10,5% y 70%. Las probabilidades de supervivencia fueron significativamente diferentes entre las distintas familias ( $p \leq 0,05$ ). Los resultados muestran que hay variaciones en la susceptibilidad/resistencia a piscirickettsiosis entre familias de salmón del Atlántico y que estos rasgos dependen, al menos en parte, de las características genóticas de estos peces.

## ***SUMMARY***

In this work, susceptibility to piscirickettsiosis among some Atlantic salmon (*Salmo salar*) families was compared by challenging them with *Piscirickettsia salmonis*. Juvenile fish belonging to 29 different full sibling families were used. Per family, a minimum of 80 and a maximum of 87 fish were infected by intraperitoneal injection with a *P. salmonis* suspension ( $0.2 \times 10^{3.8}$  TCID<sub>50</sub>/fish) and 86 individuals were sham-inoculated with sterile PBS. Fish were held in two identical tanks supplied with fresh water. They were pit-tagged and allotted in such a way that every family had half of its inoculated (n~43) and half of its sham- inoculated fish (n=43) cohabiting in each tank. Trial lasted 52 days after the inoculation time. Final cumulative mortalities ranged from 10.5 to 70%. Kaplan-Meier analysis and Log-rank comparison tests showed that survival likeliness was different among all the families ( $p \leq 0.05$ ). Same comparison between specific pairs of families exhibited survival differences in a high number of them too. Results show that there are significant variations in the degree of susceptibility/resistance to *P. salmonis* among families of Atlantic salmon and strongly suggest that this outcome is in its turn associated with differences in fish genotypes.

# 1. INTRODUCCIÓN

La salmonicultura en Chile despegó en la década de los ochenta y se ha desarrollado con tal rapidez que actualmente nuestro país es el segundo productor del mundo de salmónidos de cultivo después de Noruega (Buschmann *et al.*, 2009). Esta industria es considerada económicamente consolidada, está concentrada principalmente en las regiones de Los Lagos y de Aysén (X y XI), aún cuando ha logrado expandirse a otras regiones aledañas. El progreso de esta actividad se ha debido a la presencia de ventajas comparativas importantes que posee Chile frente a otros países productores. Entre éstas se encuentran la disponibilidad de extensas zonas costeras, lacustres y fluviales con ambientes adecuados para el desarrollo de especies salmonídeas, la producción de alimentos de alta calidad y la existencia de capital humano capacitado (Anónimo, 2001; Olson y Criddle, 2008; Buschmann *et al.*, 2009).

No obstante la excelente condición ictiosanitaria que caracterizaba a nuestro país, ésta se deterioró notoriamente a partir del año 1989 con el surgimiento de brotes epidémicos de piscirickettsiosis, enfermedad causada por *Piscirickettsia salmonis* (Fryer *et al.*, 1990; Fryer *et al.*, 1992). Esta condición ha tenido un gran impacto económico para la producción salmonera de nuestro país, llegando a generar pérdidas de hasta 100 millones de dólares anuales (Bravo y Midtlyng, 2007).

Una de las estrategias de control que pudiese usarse en el futuro contra la piscirickettsiosis podría basarse en el uso de familias de peces con mayor resistencia genética contra esta enfermedad. Como un paso para avanzar en tal sentido, en esta investigación se pretende develar si existe diferencia en la susceptibilidad/resistencia a contraer la piscirickettsiosis por parte de diferentes familias de la especie salmón del Atlántico (*Salmo salar*).

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Antes del advenimiento de la anemia infecciosa del salmón, cuya primera detección ocurrió el mes de Junio del año 2007 (Godoy *et al.*, 2008), la pisciricketisiosis, en fase de engorda, era la principal causa de mortalidades entre los salmónidos de cultivo en Chile (Larenas, 2005; Bravo y Midtlyng, 2007; Leal y Woywood, 2007). Se estima que las mermas económicas originadas por esta enfermedad bacteriana para la economía de nuestro país superan los 100 millones de dólares anuales (Anónimo, 2007; Bravo y Midtlyng, 2007).

Los primeros brotes de piscirickettsiosis se presentaron en Chile en el año 1989 (Bravo y Campos, 1989; Cvitanich *et al.*, 1990), en la zona de Calbuco, X Región (Alvarado *et al.*, 1990; Cubillos *et al.*, 1990). Posteriormente, esta condición se extendió a los centros costeros ubicados en las áreas de Puerto Montt y de Chiloé insular y continental (Bravo y Campos, 1989; Alvarado *et al.*, 1990).

Esta enfermedad se describió originalmente sólo en el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) (Bravo y Campos, 1989; Cubillos *et al.*, 1990; Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991; Cvitanich *et al.*, 1991) por lo que fue denominada “síndrome del salmón coho” (Bravo y Campos, 1989; Cubillos *et al.*, 1990). Sin embargo, en los años que siguieron afectó a todas las especies de salmónidos producidas en nuestro país, describiéndose en salmón del Atlántico (*Salmo salar*), salmón chinook (*O. tshawytscha*) y trucha arco iris (*O. mykiss*) (Alvarado *et al.*, 1990; Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1991; Garcés *et al.*, 1991; Fryer *et al.*, 1992; Fryer y Mauel, 1997). Por la mayor amplitud de hospederos, entre otras razones, se propuso el nombre de “septicemia rickettsial salmonídea” (SRS, por su sigla en inglés) para designar a esta afección (Cvitanich *et al.*, 1991). Finalmente, esta enfermedad fue denominada como “piscirickettsiosis” en concordancia con la nomenclatura científica de su agente causal (Fryer *et al.*, 1992; Fryer y Mauel, 1997).

El primer aislamiento de *P. salmonis* se realizó desde un salmón coho con signos clínicos de la enfermedad en cultivos celulares de la línea CHSE-214 (Fryer *et al.*, 1990). Este microorganismo fue denominado con la sigla LF-89 y corresponde a la cepa tipo de *P. salmonis* (Fryer *et al.*, 1992). Esta cepa es la que se encuentra mejor caracterizada (Mauel y Miller, 2002) y está depositada en la “American Type Culture Collection” como ATCC VR 1361 (Fryer *et al.*, 1992; Lannan y Fryer, 1993).

El rango de temperatura óptimo para el crecimiento de *P. salmonis* está entre los 15 y 18 °C, disminuyendo significativamente su replicación bajo los 10 °C y sobre los 20 °C y no visualizándose sobre los 25 °C (Fryer *et al.*, 1992). Los cultivos de células CHSE-214 que presentan ECP completo alcanzan títulos del orden de  $10^6$  a  $10^7$  dosis infectantes de cultivo de tejidos 50% por mL (DICT<sub>50</sub>/mL) (Fryer *et al.*, 1990). Esta multiplicación bacteriana se evidencia por la presentación gradual de un ECP típico, que comienza entre los días 5 a 6 post-infección (*p.i.*) y que se caracteriza por la aparición de grupos de células globosas que aumentan en número, hasta que la monocapa celular es destruida completamente a los 14 días *p.i.* (Fryer *et al.*, 1990; Garcés *et al.*, 1991).

Los peces afectados con esta enfermedad presentan signos inespecíficos tales como un nado cerca de la superficie, errático, incoordinado, lento, y a veces en tirabuzón, lo que refleja alteraciones de tipo nervioso en los peces (Cvitanich *et al.*, 1991; Larenas *et al.*, 1995; Larenas *et al.*, 2000). Además, se ha descrito letargia, anorexia, choque contra las mallas de las balsas-jaulas y orillamiento (Alvarado *et al.*, 1990; Cubillos *et al.*, 1990; Schäfer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1991; Olsen *et al.*, 1997; Larenas *et al.*, 2000).

Las alteraciones macroscópicas externas más relevantes incluyen oscurecimiento y descamación de la piel (Cvitanich *et al.*, 1991; Larenas *et al.*, 1995, Monasterio, 2008), además de lesiones en este tejido que comprenden desde pequeñas áreas de solevantamiento hasta úlceras hemorrágicas (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991). También se describe la presencia de hemorragias petequiales y equimóticas en la piel de la base de las aletas, del vientre y en la zona perianal y en algunos casos, hemorragias perioculares, que generalmente son bilaterales (Alvarado *et al.*, 1990; Cubillos *et al.*, 1990). Otro hallazgo importante es la aparición de palidez branquial, lo que refleja una anemia severa, corroborada por los bajos niveles de hematocrito los que varían entre 2 a 27% (Bravo y Campos, 1989; Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991; Cvitanich *et al.*, 1991). Además, se ha observado neutrofilia, con niveles 10 a 20 veces más altos que los rangos normales (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991).

Al examen anatómo-patológico de órganos internos, se aprecia que la mayoría de los peces afectados presenta diferentes grados de ascitis y de peritonitis (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991). En relación al primer hallazgo, Larenas *et al.* (1995) señalan que la ascitis sólo se observa en peces moribundos y por lo tanto, sugieren que podría considerarse más bien

como una alteración de tipo terminal. Por otra parte, se aprecian frecuentemente hemorragias petequiales en estómago, intestino, ciegos pilóricos, vejiga natatoria, grasa visceral (Cvitanich *et al.*, 1991), musculatura abdominal (Larenas *et al.*, 1995) y peritoneo (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991). Conjuntamente, se describe la presencia de hepatomegalia (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991); el hígado además puede mostrar un aspecto “moteado”, debido a que se aprecian pequeños nódulos subcapsulares blanquecinos a amarillentos distribuidos difusamente en toda su superficie (Bravo y Campos, 1989; Alvarado *et al.*, 1990; Cubillos *et al.*, 1990; Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1991; Larenas *et al.*, 1995; Olsen *et al.*, 1997). Al respecto, se señala que la presencia de estos nódulos puede ser señal de un grado más avanzado de cronicidad del cuadro clínico (Almendras *et al.*, 2000). Ocasionalmente, este órgano se ve pálido y hemorrágico (Cvitanich *et al.*, 1991). La vesícula biliar está generalmente pletórica (Alvarado *et al.*, 1990; Cubillos *et al.*, 1990), evidenciando que los peces no han comido por un tiempo prolongado (Alvarado *et al.*, 1990). En tanto, el riñón exhibe pérdida de su apariencia brillante, tornándose café-grisáceo opaco (Alvarado *et al.*, 1990) y aumento de su tamaño (Fryer *et al.*, 1990; Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991). A nivel del bazo, se presenta esplenomegalia en diferentes grados, observándose en reiteradas ocasiones, las mismas lesiones blanquecinas descritas en el hígado (Alvarado *et al.*, 1990; Cubillos *et al.*, 1990; Fryer *et al.*, 1990). En el estómago, se encuentra un líquido transparente seromucoso (Alvarado *et al.*, 1990; Schäfer *et al.*, 1990), lo cual confiere la impresión de que el pez ha tragado agua (Alvarado *et al.*, 1990). El intestino generalmente no posee alimento (Alvarado *et al.*, 1990; Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991), evidenciándose enteritis en el tercio distal (Alvarado *et al.*, 1990); adicionalmente, este órgano se observa lleno, con un contenido mucoso amarillento (Schäfer *et al.*, 1990). El corazón, en ocasiones, también presenta focos necróticos y hemorragias petequiales de tipo difuso (Cubillos *et al.*, 1990) y en un 2% de los peces moribundos se observa la presencia de una pseudomembrana que lo cubre, sugiriendo pericarditis (Cvitanich *et al.*, 1991). Además, se aprecia un aumento en el volumen del líquido cefalorraquídeo, acompañado en muchos casos de congestión de las meninges (Larenas *et al.*, 1995).

La naturaleza sistémica de esta enfermedad es evidente (Fryer y Hedrick, 2003) y las alteraciones histológicas se aprecian principalmente en hígado, bazo, intestino y tejido hematopoyético del riñón (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991; Cvitanich *et al.*, 1991);

también pueden observarse cambios en cerebro, corazón, ovarios y branquias (Cvitanich *et al.*, 1991). Al respecto, Larenas *et al.* (1995) han descrito la escasa especificidad de este agente patógeno por diferentes tipos celulares, ya que éste ha sido encontrado en el citoplasma de células presentes en el hígado, riñón anterior y posterior, bazo, branquias, encéfalo, corazón, intestino y ciegos pilóricos. Sin embargo, independiente del tipo celular afectado, esta bacteria se localiza generalmente en vacuolas intracitoplasmáticas de macrófagos asociados a las células de hígado, de riñón, bazo y sangre periférica (Cubillos *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1990; Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991; Cvitanich *et al.*, 1991; Fryer y Hedrick, 2003). La capacidad de sobrevivir y multiplicarse en el citoplasma de macrófagos de peces salmonídeos ha sido demostrada también en condiciones *in vitro* (McCarthy *et al.*, 2008).

Las lesiones histológicas más relevantes de esta enfermedad son necrosis, proliferación del tejido conectivo y alteraciones vasculares. Estas últimas se caracterizan por hemorragias, congestión y formación de trombos. También se observan fenómenos inflamatorios, aunque se distinguen por ser leves y con predominio linfocitario, los cuales son concomitantes a una proliferación de tejido conectivo en diferentes grados (Larenas *et al.*, 1995; Monasterio, 2008). Específicamente, en hígado se describe necrosis multifocal de los hepatocitos (Larenas *et al.*, 1995; Olsen *et al.*, 1997; Fryer y Hedrick, 2003), perivascular y endotelial (Larenas *et al.*, 1995) y coagulación intravascular, producto de la formación de trombos en vasos mayores (Cvitanich *et al.*, 1991; Larenas *et al.*, 1995; Fryer y Hedrick, 2003); en riñón, se observa glomerulonefritis (Monasterio, 2008), necrosis glomerular (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991; Larenas *et al.*, 1995), tubular (Cvitanich *et al.*, 1991; Larenas *et al.*, 1995; Olsen *et al.*, 1997), endotelial y del tejido hematopoyético (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991; Larenas *et al.*, 1995; Olsen *et al.*, 1997), además de la presencia de trombos en este órgano (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991; Cvitanich *et al.*, 1991; Larenas *et al.*, 1995) y dilatación de vasos linfáticos (Monasterio, 2008). En el bazo, se aprecia necrosis perivascular y del tejido hematopoyético (Larenas *et al.*, 1995), así como trombosis multifocal (Monasterio, 2008).

Las lesiones de la piel consisten en áreas extensas de necrosis de la epidermis y de la dermis con algún grado de degeneración de la musculatura sub-dérmica (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991). Además, a nivel histológico, en lesiones macroscópicas de apariencia nodular se evidencia infiltración de leucocitos y proliferación de tejido conectivo (Smith *et al.*, 1999b). Las branquias usualmente muestran una hiperplasia epitelial multifocal (Monasterio,

2008), algunas bastante severas con consolidación de las laminillas secundarias. Además, ciertas veces se evidencia necrosis dentro de este tejido hiperplásico (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991). Otra alteración es la fusión laminillar, la que se considera una lesión de tipo crónica (Larenas *et al.*, 1995). En el corazón, se describe pericarditis y endocarditis (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991; Cvitanich *et al.*, 1991) y necrosis focal del miocardio (Cvitanich *et al.*, 1991). La severidad de lesiones miocárdicas sugieren que la muerte de los peces por esta enfermedad es de base cardiogénica (Rojas *et al.*, 2009).

En el intestino, se observa inflamación difusa en la lámina propia (Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991; Cvitanich *et al.*, 1991), necrosis focal del estrato compacto e incremento del número de células granulares del estrato granuloso (Cvitanich *et al.*, 1991). Con respecto al sistema nervioso central, se evidencia necrosis del endotelio vascular encefálico y meníngeo que está asociada a una infiltración leve de tipo linfocitaria (Larenas *et al.*, 1995). Congruentemente, se ha descrito la presencia de una alta carga de *P. salmonis* en tejido encefálico de salmón coho, lo que explicaría la signología nerviosa de la enfermedad (Skarmeta *et al.*, 2000).

La transmisión de *P. salmonis* es fundamentalmente de tipo horizontal (Fryer y Hedrick, 2003). Resultados de diferentes ensayos han demostrado que esta vía de contagio se presenta tanto en agua dulce (Cvitanich *et al.*, 1991; Almendras *et al.*, 1997; Salinas *et al.*, 1997) como salada (Cvitanich *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1999a).

Ensayos *in vitro* han demostrado que la capacidad de supervivencia extracelular de *P. salmonis* en el ambiente marino es de alrededor de 14 días, resultado que contrasta con lo que ocurre en agua dulce donde la bacteria es rápidamente inactivada, lo que explicaría el escaso número de brotes de piscirickettsiosis que se han descrito en agua dulce (Lannan y Fryer, 1994).

Con respecto a la transmisión vertical, ésta se ha demostrado experimentalmente en truchas arco iris, detectándose la presencia de *P. salmonis*, tanto en ovas al “estado de ojo” (Larenas *et al.*, 1996b), como en alevines (Larenas *et al.*, 2002; Larenas *et al.*, 2003), obtenidos de la progenie de machos y/o hembras infectados previamente mediante inyección intraperitoneal (IP).

Respecto del diagnóstico de esta enfermedad, en terreno se hace en forma presuntiva mediante los signos clínicos y las alteraciones macroscópicas que exhiben los peces enfermos,

esta bacteria (Marshall *et al.*, 1998; Heath *et al.*, 2000; Corbeil *et al.*, 2003; Karatas *et al.*, 2008).

En cuanto a las medidas de control, diferentes antibióticos administrados vía oral o por inyección IP (Almendras y Fuentealba, 1997; Groff y LaPatra, 2000; Larenas *et al.*, 2000) son usados en el tratamiento *in vivo* de piscirickettsiosis; no obstante, en la práctica, la terapia con estas drogas no ha tenido un éxito efectivo en el control de esta enfermedad (Smith *et al.*, 1995; OIE, 2000). Se ha sugerido que la localización intracelular de esta bacteria puede hacer posible que un número considerable de microorganismos esté fuera del alcance de las concentraciones bactericidas y de esta manera la infección puede persistir (Lannan y Fryer, 1993). Más aún, las pérdidas debido a este agente patógeno se han incrementado progresivamente y aparentemente se debe a la resistencia de las cepas actuantes a los antibióticos (Smith *et al.*, 1996b). Antibióticos como oxitetraciclina, ácido oxolínico y flumequina, han sido utilizados ampliamente por varios años en Chile para el tratamiento de piscirickettsiosis y por lo tanto, una selección genética de cepas resistentes puede ser la razón de la pérdida de la susceptibilidad de *P. salmonis* a estas drogas. Por otro lado, debido a las marcadas variaciones en los patrones de sensibilidad de los diferentes aislados de *P. salmonis* estudiados, no se recomienda el uso de un régimen único para el tratamiento de todos los brotes (Smith *et al.*, 1996b).

Debido a las limitaciones existentes en la eficacia y en el uso excesivo de los antibióticos, varios grupos de investigación han dirigido sus esfuerzos en el desarrollo de una vacuna efectiva contra piscirickettsiosis (OIE, 2000; House y Fryer, 2002; Bravo y Midtlyng, 2007; Olson y Criddle, 2008). En el caso de varias enfermedades, la vacunación ha demostrado ser una herramienta eficiente para ayudar a prevenir la presentación de brotes infecciosos en peces (Bravo y Midtlyng, 2007; Gjedrem y Baranski, 2009) y además, es considerada la principal causa de la notoria reducción en el uso de drogas bactericidas que ha experimentado la salmonicultura (Bravo y Midtlyng, 2007). Ensayos iniciales que utilizaron bacterinas producidas con la bacteria completa mostraron resultados variables e inconsistentes (Smith *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1997; Fryer y Hedrick, 2003). Posteriormente, en un ensayo efectuado en salmones coho, se incrementó el porcentaje de supervivencia relativa de éstos al ser inyectados con bacterinas acompañadas con adyuvantes acuosos u oleosos (Kuzyk *et al.*, 2001a).

Por otro lado, se han realizado varios estudios de la caracterización antigénica de *P. salmonis* (Kuzyk *et al.*, 1996; Barnes *et al.*, 1998; House y Fryer, 2002; Henríquez *et al.*, 2003; Yuksel *et al.*, 2006b), lo cual podría permitir eventualmente el desarrollo de una vacuna recombinante contra *P. salmonis* (Kuzyk *et al.*, 1996).

En los últimos años, el desarrollo de nuevos productos vaccinales se ha basado en la tecnología del DNA (Miquel *et al.*, 2003) y de las proteínas recombinantes (Kuzyk *et al.*, 2001a; Kuzyk *et al.*, 2001b; Sommerset *et al.*, 2005; Wilhelm *et al.*, 2006). Este nuevo enfoque puede ofrecer una solución para prevenir enfermedades, para las cuales el efecto de las bacterinas ha sido ineficiente, aunque el rendimiento a largo plazo de estas nuevas vacunas aún no está bien documentado (Sommerset *et al.*, 2005). Por otra parte, se describe que la vacuna desarrollada para prevenir la enfermedad bacteriana del riñón (BKD, por su sigla en inglés), compuesta por células vivas de una bacteria no patógena de peces llamada *Arthrobacter davidanieli*, es efectiva para reducir las mortalidades en salmones coho desafiados experimentalmente con *P. salmonis*, tanto en condiciones de laboratorio como de campo. En terreno, los brotes de BKD frecuentemente son seguidos por los de piscirickettsiosis (Salonius *et al.*, 2005). Esta vacuna ha sido autorizada para su uso en salmónidos cultivados en Norteamérica y Chile (Sommerset *et al.*, 2005), no obstante, ha tenido una aceptación limitada en el mercado chileno (Bravo y Midtlyng, 2007).

Además de la vacunación, es importante implementar prácticas de manejo para disminuir la incidencia de esta enfermedad (OIE, 2000; Yuksel *et al.*, 2006a; Olson y Criddle, 2008). En este sentido, se recomienda realizar “screening”, eliminando las ovas fertilizadas de reproductores positivos (Cassigoli, 1994; Fryer y Hedrick, 2003; Toranzo *et al.*, 2005). Al respecto, Larenas *et al.* (2003) proponen, además de tomar muestras de tejido renal de los reproductores, extraer muestras de sus fluidos seminal u ovárico para descartar con mayor seguridad la infección en éstos, puesto que se describe que un mismo individuo puede resultar negativo a la presencia de *P. salmonis* en el análisis de su tejido renal y positivo al de sus fluidos. Conjuntamente, se aconseja un conjunto de medidas tales como: desinfectar la superficie de las ovas con yodóforos (Groff y LaPatra 2000; OIE, 2000; Fryer y Hedrick, 2003), seleccionar “stocks” o familias de peces que hayan demostrado mayor resistencia a brotes y menor mortalidad (Cassigoli, 1994), disminuir los manejos (vacunaciones, cambios de redes, tratamientos inyectables, etc), para así aminorar el estrés (Bravo y Campos, 1989;

Bravo y Gutiérrez, 1991; Larenas *et al.*, 2000; Leal y Woywood, 2007), evitar altas densidades de biomasa por jaula, centro y por área geográfica (Cassigoli, 1994; Olson y Criddle, 2008), ingresar los peces a los centros marinos a número final (el número de individuos que se destina a una jaula se mantiene hasta la cosecha), trasladando los “smolts” directamente desde agua dulce a salada, sin pasar por estuarios (Leal y Woywood, 2007), extraer rápidamente los peces enfermos y muertos desde las balsas-jaulas (Cassigoli, 1994; Almendras *et al.*, 1997; Larenas, 1999), realizar pruebas diagnósticas para detectar la presencia temprana de la bacteria (Marshall *et al.*, 1998), evitar que la sangre de las cosechas llegue al mar (Cassigoli, 1994), fomentar el descanso sanitario de los centros previo al ingreso de nuevos peces (Cassigoli, 1994; Fryer y Hedrick, 2003), evitar la presentación de factores primarios que produzcan lesiones de la piel (erosiones y úlceras), ya sea de origen traumático (ej: redes) (Larenas *et al.*, 2000) o por ectoparásitos (Smith *et al.*, 1999b; Larenas *et al.*, 2000; Fryer y Hedrick, 2003). También, se aconseja limpiar las redes de las balsas-jaulas, retirando algas y “fouling”, para facilitar el recambio de agua (Olson y Criddle, 2008). Además, se sugiere regular las tasas de alimentación o trabajar al 80% de la saciedad alimenticia a objeto de minimizar el estrés fisiológico que se produce durante la alimentación, lo cual afectaría especialmente a los peces más dominantes (Garcías *et al.*, 2005).

Considerando los costos y dificultades de implementar las prácticas de prevención y de control de enfermedades acuáticas, se estima que el método más efectivo en el largo plazo para contrarrestar el efecto detrimental de las enfermedades puede ser el mejoramiento genético de la resistencia natural de los peces a éstas (Fjalestad *et al.*, 1993; Kettunen y Fjalestad, 2006; Storset *et al.*, 2007). Numerosos estudios han mostrado la existencia de variación significativa de esta característica, en términos genéticos, en diferentes salmónidos, lo cual abre la posibilidad de lograr un incremento de la resistencia a enfermar mediante cruzamiento selectivo (Chevassus y Dorson, 1990; Midtlyng *et al.*, 2002; Røed *et al.*, 2002).

Aunque la acuicultura como sistema de producción biológica tiene una larga historia, los programas de reproducción sistemáticos y eficientes para mejorar características económicamente importantes en especies cultivadas son de utilización reciente (Gjedrem, 2000; Gjedrem, 2005). En salmónidos y tilapias, por ejemplo, éstos comenzaron a principios de las décadas de 1970 y 1990, respectivamente (Gjedrem y Baranski, 2009). Esto significa

que la mayor parte de la producción acuícola está basada en “stocks” no mejorados genéticamente (Gjedrem, 2005).

Los programas de selección genética tienen como meta principal la producción de animales biológicamente eficientes (Gjedrem y Baranski, 2009). Los objetivos de éstos deben ser definidos para cada especie y para cada población. Idealmente, todas las características económicas importantes deberían ser incluidas en dicho objetivo y cada una de ellas debe ser exactamente definida con respecto a su medición. Algunas de las características que normalmente se consideran son tasa de crecimiento, resistencia a enfermedades, calidad de la carne y edad de maduración sexual (Gjedrem, 2000).

En especies con alta fecundidad existe la ventaja que se puede practicar una intensidad de selección alta (Fjalestad *et al.*, 2003; Gjedrem y Baranski, 2009), una estrategia que resulta en una elevada respuesta al proceso de selección. Existen varios métodos de selección que pueden ser aplicados para mejorar la productividad de los animales (Gjedrem y Baranski, 2009). En especies acuáticas, las estrategias usadas más comúnmente son las selecciones basadas en individuos y en familias (Gjedrem, 2000; Gjedrem y Baranski, 2009). En el segundo tipo de selección, las familias son ordenadas de acuerdo a un rendimiento promedio de cada familia y familias enteras son conservadas o descartadas. Los individuos de cada familia son mantenidos como reproductores para la generación siguiente y corresponden a todos los individuos de la familia seleccionada o bien a individuos escogidos al azar obtenidos equitativamente desde las familias seleccionadas. Debido a que la selección es entre familias completas, la selección es una función de diferencias entre familias y no entre individuos. Los valores individuales no son usados, excepto en la medida que ellos determinen el promedio de la familia (Fjalestad, 2005). Las familias pueden ser de hermanos completos (todos los animales que componen la familia tienen el mismo padre y la misma madre) o de medios hermanos ya sea por parte de madre o padre (Fjalestad, 2005; Gjedrem y Baranski, 2009). En acuicultura de peces, la producción de familias de hermanos completos o de medios hermanos es relativamente fácil gracias a la fecundidad alta y a la fertilización externa, condiciones que son favorables para un programa de selección genética. Cada tipo de familia puede ser repartido en subgrupos para probar distintas características bajo condiciones ambientales diferentes. Otra ventaja que tienen los peces para estos procedimientos es que los gametos pueden ser transportados fácilmente y además son factibles de ser desinfectados contra la

mayoría de los patógenos que se encuentran en la superficie de las ovas (Fjalestad *et al.*, 1993).

Inicialmente la resistencia a enfermedades se evaluaba usando el nivel de supervivencia de los animales acuáticos bajo condiciones productivas, y con ese método se obtenían bajas variabilidades y heredabilidades genéticas, debido al fuerte componente ambiental que incide en esta medición (Gjedrem, 2000; Gjedrem y Baranski, 2009). Sin embargo, cuando posteriormente la supervivencia se empezó a medir usando pruebas de desafío, en familias infectadas con patógenos específicos, se encontraron heredabilidades relativamente altas (Fjalestad *et al.*, 1993; Gjedrem, 2000). Un gran avance, entonces, en la aplicación de reproducción selectiva para resistencia de enfermedades fue el desarrollo de estas pruebas, bajo condiciones controladas y estandarizadas, para estudiar y registrar la variación genética en resistencia en las enfermedades más graves. Varios estudios han encontrado niveles relativamente altos de variación genética en resistencia a algunas enfermedades por la aplicación de tales pruebas de desafío (Gjedrem y Baranski, 2009). En este escenario, la heredabilidad de cada enfermedad registrada en una prueba de desafío es relativamente alta, indicando que el mejoramiento por selección es posible (Fjalestad *et al.*, 1993; Gjedrem y Baranski, 2009).

Las pruebas de desafío deben ser llevadas a cabo en instalaciones cerradas sin riesgo de infección para el “stock” de reproducción, las piscifactorías comerciales aledañas o las poblaciones silvestres. Para reducir los costos, tales pruebas normalmente son efectuadas con peces pequeños y en un período de tiempo corto (Fjalestad *et al.*, 1993).

En la medida que los animales empiezan a morir, éstos son removidos, identificados y la data de su muerte se registra. En algunos casos, las pruebas de desafío finalizan cuando la mortalidad acumulada alcanza 50%, mientras que en otras, las mortalidades son registradas hasta que éstas cesan. Los resultados obtenidos son usados para ordenar las familias, de acuerdo a su resistencia a las enfermedades (Gjedrem y Baranski, 2009).

En la última década, varios grupos de investigación han realizado estudios con el propósito de determinar la variación en resistencia genética en familias de salmón del Atlántico contra diferentes patógenos bacterianos, virales y parasitarios, concentrándose en los agentes infecciosos que afectan la salmonicultura en el hemisferio norte como la bacteria *Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida*, los virus de la necrosis pancreática infecciosa, de

la enfermedad del páncreas y de la anemia infecciosa del salmón y el ectoparásito *Lepeophtheirus salmonis* (Gjøen y Bentsen, 1997; Gjedrem, 2000; Midtlyng *et al.*, 2002; Kolstad *et al.*, 2005; McLoughlin *et al.*, 2006; Storset *et al.*, 2007; Wetten *et al.*, 2007; Kjøglum *et al.*, 2008). En esta tesis, se desafiaron un conjunto de familias de salmón del Atlántico con *P. salmonis* con el propósito de establecer si existen diferencias en cuanto a la susceptibilidad a piscirickettsiosis, generando información que puede ser útil para obtener finalmente peces con una mayor resistencia genética para usarlos como una herramienta de control de esta enfermedad en el sistema productivo nacional.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar experimentalmente si existen diferencias en la susceptibilidad / resistencia frente a la infección con *P. salmonis* entre distintas familias (factor genético) de salmón del Atlántico (*Salmo salar*).

### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar las curvas de supervivencia de 29 familias de la especie *Salmo salar* desafiadas experimentalmente con *P. salmonis*.
- Comparar las curvas de supervivencia de las familias desafiadas.

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1. Peces.**

### **4.2. Inóculo.**

Para la infección de los peces, se utilizó un aislado de *P. salmonis*, el cual había probado ser virulento en ensayos previos. El inóculo fue preparado en la Unidad de Patología de Animales Acuáticos del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. La bacteria fue multiplicada en cultivos celulares de la línea CHSE-214 (ATCC CRL 1681), de acuerdo al método descrito por Fryer *et al.* (1990). Para mantener las células, se utilizó medio esencial mínimo (MEM) de Eagle con sales de Earle, en ausencia de antimicrobianos, y suplementado con 10% de suero fetal bovino (MEM-10), L-glutamina y bicarbonato de sodio (7,5% p/v) para conservar un pH entre 7,3 y 7,4. Las botellas fueron incubadas a 17 °C. Una vez alcanzado un 90% de ECP en la monocapa celular, se utilizó el sobrenadante como inóculo, el cual fue titulado en microplacas y posteriormente diluido hasta obtener una concentración de  $0,2 \times 10^{4,8}$  DICT<sub>50</sub>/mL.

### **4.3. Instalación.**

El ensayo fue llevado a cabo en la piscicultura experimental antes mencionada en una sala habilitada para dicho fin. Esta dependencia estaba acondicionada con dos estanques iguales de fibra de vidrio con 2,5 m<sup>3</sup> de capacidad total cada uno. Éstos fueron usados con 2 m<sup>3</sup> y abastecidos permanentemente con agua de vertiente. A lo largo del experimento se mantuvo un flujo de agua, en paralelo, de aproximadamente 12,5 L/min/estanque.

El ingreso a la sala experimental era restringido y se dispuso un pediluvio con solución yodada desinfectante (yodigen ® 30 y -plus, Veterquímica) para cuya preparación se siguieron las instrucciones del fabricante para su dilución (1:300). El agua de salida de los estanques fue tratada mediante irradiación con luz ultravioleta (Biolight, Santiago, Chile).

#### **4.4. Esquema de desafío.**

El número de peces inoculados de cada familia varió desde un mínimo de 80 hasta un máximo de 87 ejemplares, según se detalla en la Tabla N°1. Los animales fueron infectados mediante inyección IP (0,1 mL/pez). A su vez, otros 86 individuos de cada familia fueron utilizados como control, siendo inyectados por la misma vía y en volumen equivalente, con solución “buffer” fosfato salino (PBS) pH 7,2 estéril.

Los individuos inoculados y controles de cada familia fueron distribuidos lo más equitativamente posible (en cuanto al número de peces) en los dos estanques antes mencionados, los que se denominaron A y B, según se especifica en la Tabla N°1. De esta manera, los peces inoculados y controles se mantuvieron cohabitando en los dos estanques ya señalados.

**Tabla N°1: Distribución de peces por estanque.**

<b>Identificación Familias</b>	<b>N° de peces inoculados</b>	<b>Estanque A</b>	<b>Estanque B</b>	<b>N° peces controles</b>	<b>Estanque A</b>	<b>Estanque B</b>
<i>A</i>	85	43	42	86	43	43
<i>B</i>	82	41	41	86	43	43
<i>C</i>	86	43	43	86	43	43
<i>CH</i>	84	42	42	86	43	43
<i>D</i>	86	43	43	86	43	43
<i>E</i>	80	40	40	86	43	43
<i>F</i>	87	44	43	86	43	43
<i>G</i>	82	41	41	86	43	43
<i>H</i>	84	42	42	86	43	43
<i>I</i>	84	42	42	86	43	43
<i>J</i>	85	43	42	86	43	43
<i>K</i>	86	43	43	86	43	43
<i>L</i>	86	43	43	86	43	43
<i>LL</i>	85	42	43	86	43	43
<i>M</i>	86	43	43	86	43	43
<i>N</i>	84	42	42	86	43	43
<i>Ñ</i>	86	43	43	86	43	43
<i>O</i>	85	43	42	86	43	43
<i>P</i>	85	42	43	86	43	43
<i>Q</i>	86	43	43	86	43	43
<i>R</i>	84	42	42	86	43	43
<i>S</i>	85	43	42	86	43	43
<i>T</i>	86	43	43	86	43	43
<i>U</i>	86	43	43	86	43	43
<i>V</i>	84	42	42	86	43	43
<i>W</i>	84	42	42	86	43	43
<i>X</i>	86	43	43	86	43	43
<i>Y</i>	86	43	43	86	43	43
<i>Z</i>	86	43	43	86	43	43
<b>Totales</b>	<b>2461</b>	<b>1232</b>	<b>1229</b>	<b>2494</b>	<b>1247</b>	<b>1247</b>

Con el objeto de poder identificar a los peces inoculados de las distintas familias colocados en un mismo estanque, éstos fueron marcados en forma individual. Para ese fin, siete semanas antes del inicio del ensayo, se les incorporó vía IP un dispositivo de identificación electrónica llamado “pit-tag” (passive integrated transponder tag). Tanto el marcaje como la inoculación de los peces se efectuó bajo sedación con etil p-aminobenzoato (BZ20®, Veterquímica, Chile). Los animales estuvieron en ayunas por 24 horas antes de estos eventos.

Las mortalidades se registraron hasta 52 días post-inoculación.

## **4.5. Registro de datos y toma de muestras.**

### **4.5.1. Parámetros de calidad de agua:**

Se registraron, tres veces al día, los valores de temperatura y de concentración de oxígeno disuelto del agua de cada estanque.

### **4.5.2. Registros y muestras desde los peces durante el ensayo:**

Al momento de la inoculación, se obtuvo una medición individual de peso y longitud de horquilla (“fork length”) de cada individuo. Durante el ensayo, se llevó un registro diario de los signos clínicos y de las mortalidades en los peces. Asimismo, a cada pez muerto se le realizó un examen de necropsia y se obtuvo un frotis desde riñón anterior. Cada frotis fue debidamente identificado (fecha y código del “pit-tag”), fijado en metanol absoluto, mediante inmersión por 5 min y preservado a temperatura de congelación (-20°C). Estas muestras fueron analizadas por medio de inmunofluorescencia indirecta contra *P. salmonis*, de acuerdo a lo descrito por Lannan y Fryer (1991).

Todos los peces que resultaron sobrevivientes al finalizar el experimento, fueron sacrificados con una sobredosis con el anestésico antes mencionado y también fueron analizados mediante examen de necropsia.

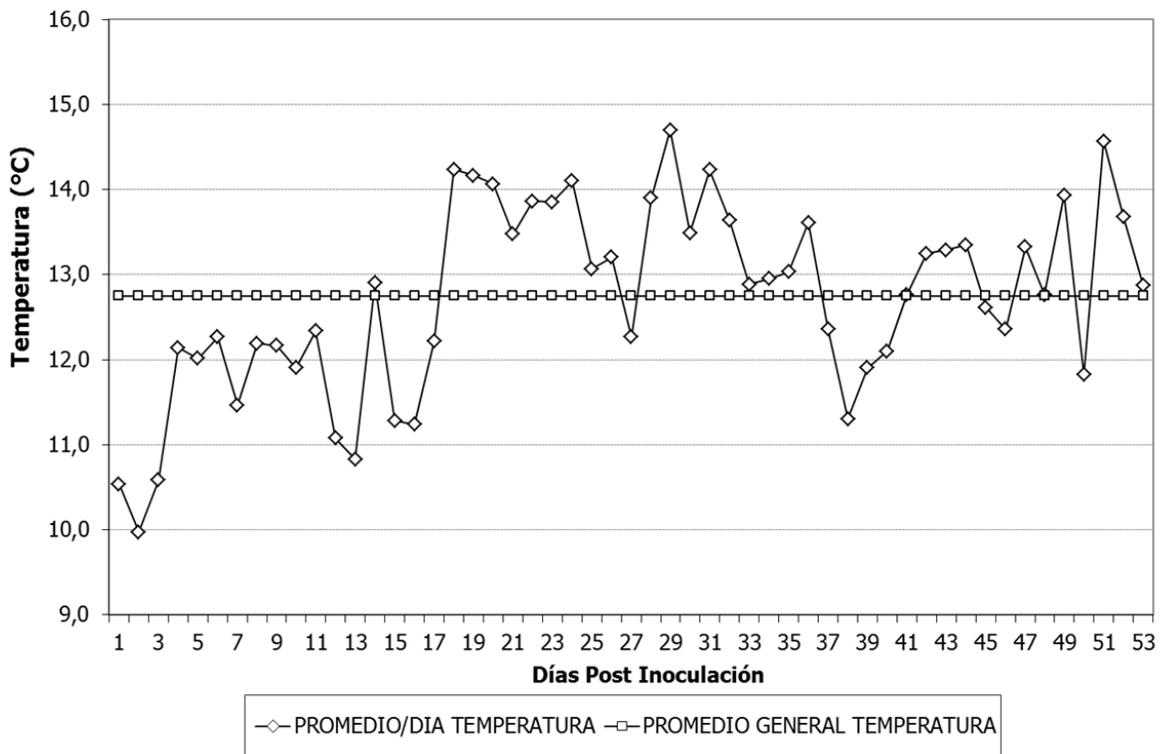
#### **4.6. Análisis estadístico.**

A partir de los registros diarios de mortalidad, se obtuvieron los valores de supervivencia de cada familia, mediante el método estadístico de Kaplan-Meier y posteriormente estos datos fueron sometidos a la prueba de Log-rank (Carrasco, 1986), discriminando si las diferencias entre las mortalidades de cada familia fueron estadísticamente significativas. Los promedios de pesos y tallas de los peces de cada familia fueron comparados usando análisis de varianza y luego entre pares mediante la prueba de Tukey (Wayne, 2002). El análisis de correlación entre estas variables y la mortalidad acumulada se realizó usando el método de Pearson (Infostat, 2004).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Temperatura del agua.

La temperatura promedio diaria del agua de los estanques se muestra en la Figura N°1. Los valores de este parámetro en ambos estanques fueron iguales a lo largo de toda la experiencia, por lo cual se enseña una sola curva.



**Figura N°1: Temperatura promedio diaria del agua de los estanques de todo el experimento.**

## 5.2. Oxígeno disuelto en agua.

El promedio diario de las mediciones de oxígeno disuelto en el agua se muestra en la Figura N°2.

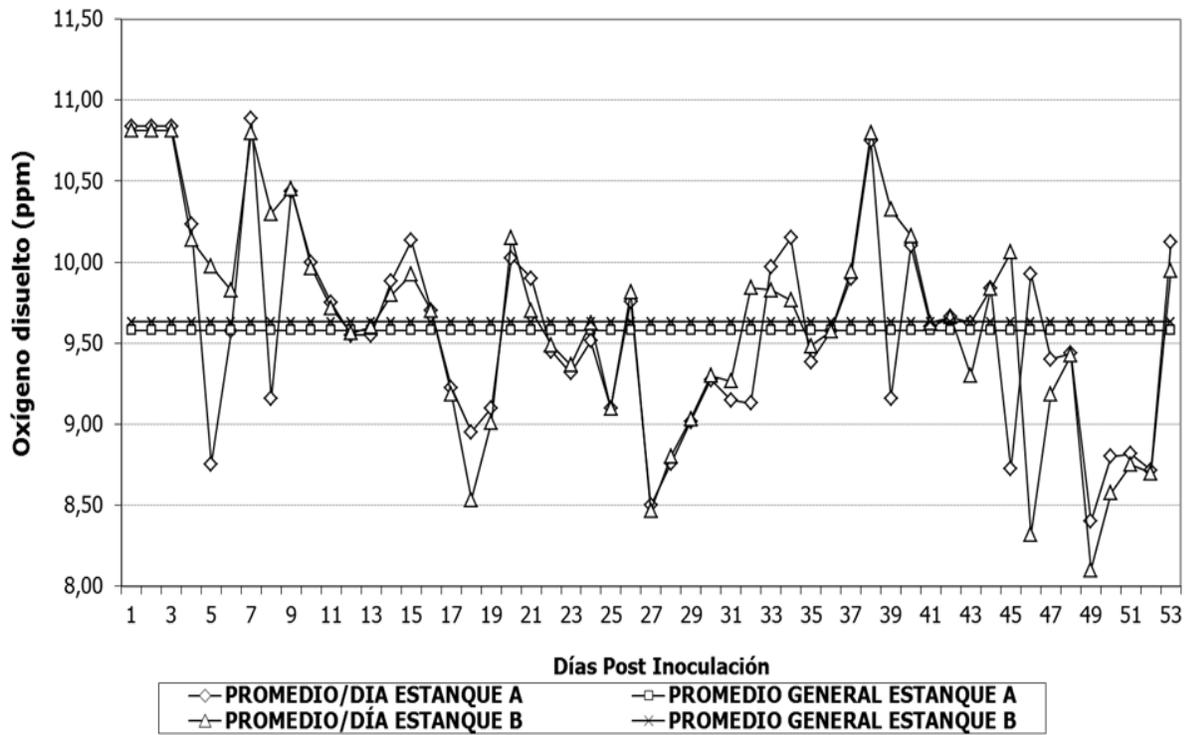


Figura N°2: Promedio diario de oxígeno disuelto (ppm) en el agua de cada estanque.

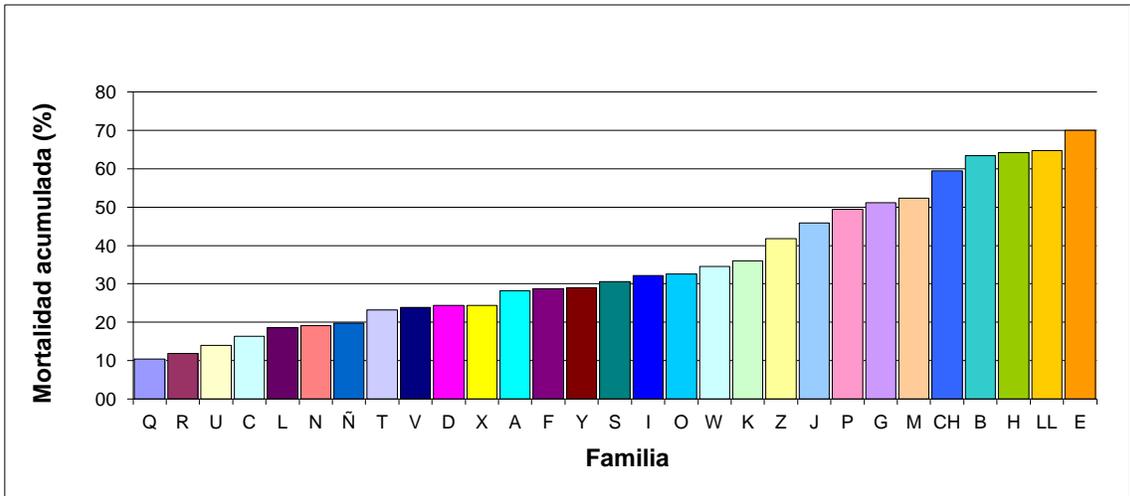
### 5.3. Mortalidades.

#### 5.3.1. Peces inoculados:

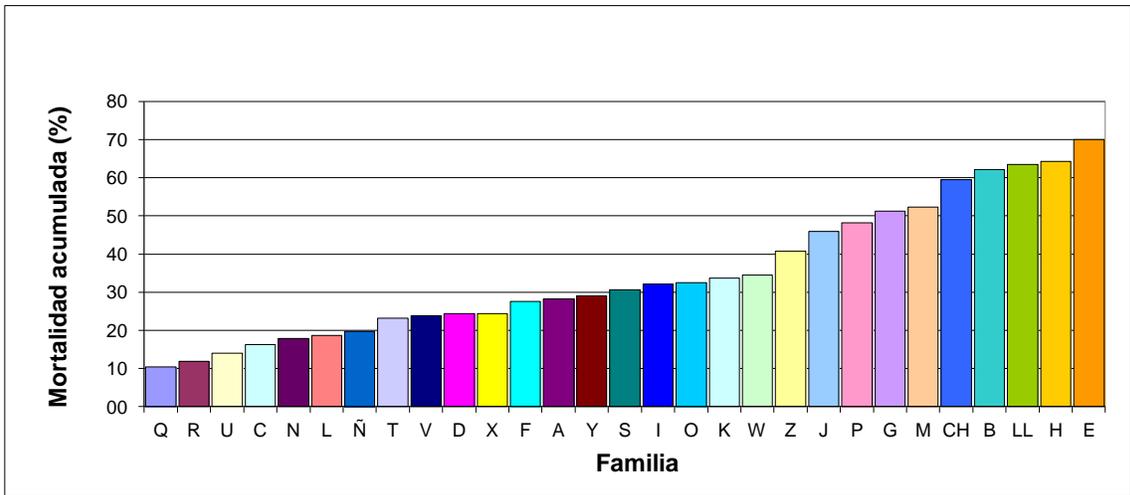
Entre los peces inoculados con *P. salmonis* (n=2.461) se registró una mortalidad acumulada total de 862 individuos al finalizar el experimento, equivalente al 35% de éstos. A su vez, las mortalidades atribuibles a piscirickettsiosis en estos animales, que se presentaron desde el día 14 post-inoculación, corresponden a 854 ejemplares lo que corresponde al 34,7%. Anteriormente al día 14 post-inoculación murieron ocho individuos por causas inespecíficas asociadas al proceso de inyección. Estas muertes ocurrieron los días 0 (familia *LL*), 1 (familia *K*), 3 (familia *P*), 4 (murieron dos peces este día; uno de la familia *K* y otro de la *N*), 5 (murieron dos peces este día; uno de la familia *B* y otro de la familia *Z*) y 6 (familia *F*) post-inoculación.

Desde el día 14 post-inoculación en adelante, los peces antes de morir presentaron signos clínicos y lesiones características de la enfermedad tales como anorexia, letargia marcada, oscurecimiento de la piel, nado errático cerca de la superficie en los bordes de los estanques. A la necropsia, la mayoría evidenció pérdida de escamas, zonas de petequias en la piel del área ventral, branquias pálidas y distensión abdominal. Internamente, se presentaron zonas hemorrágicas a lo largo de toda la mucosa del sistema digestivo con un contenido seromucoso, esplenomegalia, reno y hepatomegalia y nódulos subcapsulares blanquecinos en hígado.

Los porcentajes de mortalidad acumulada finales atribuibles a la enfermedad, ordenados por familia fluctuaron desde 10,5% al 70%, mostrando una gran variabilidad en la susceptibilidad entre éstas. El registro de mortalidades acumuladas finales atribuibles a la enfermedad indica que las familias más susceptibles al desafío con *P. salmonis* corresponderían a la *E*, *LL* y *H*, las cuales presentaron un porcentaje de mortalidad de 70%, 64,7% y 64,3%, respectivamente. Por el contrario, las familias más resistentes al desafío fueron la *Q* que registró un 10,5%, la *R* con un 11,9% y la *U* con un 15,1% de mortalidad acumulada atribuible a la enfermedad. Los valores finales (%) para cada familia se muestran en las Figuras N°3, N°4 y en la Tabla N°2.

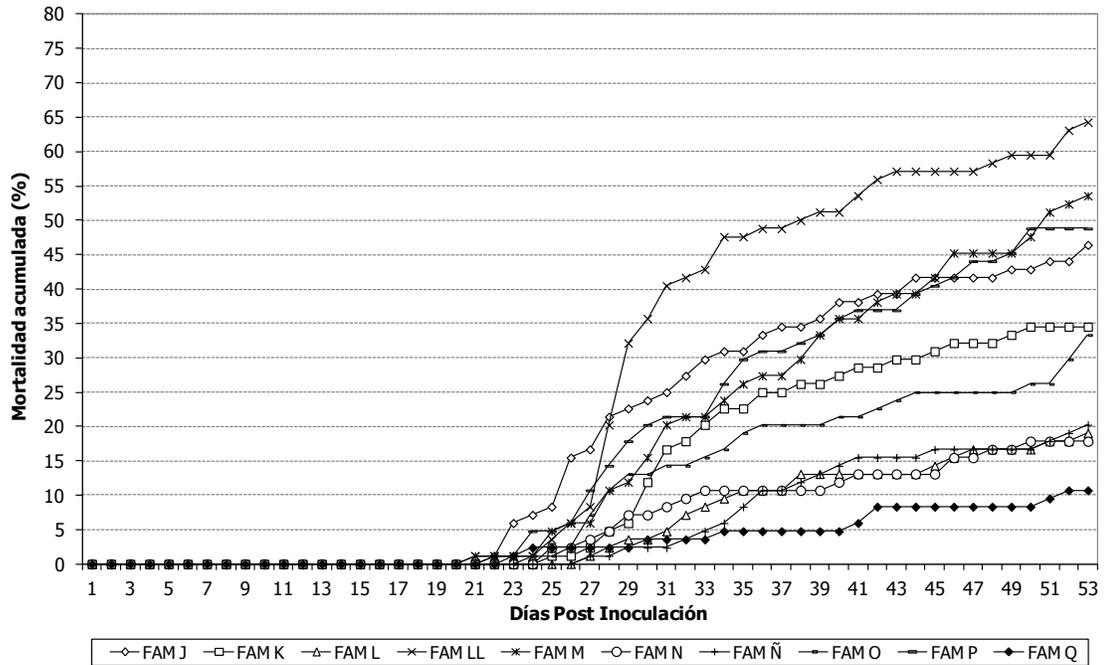


**Figura N°3: Mortalidad acumulada total (%), por familia, en *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.**

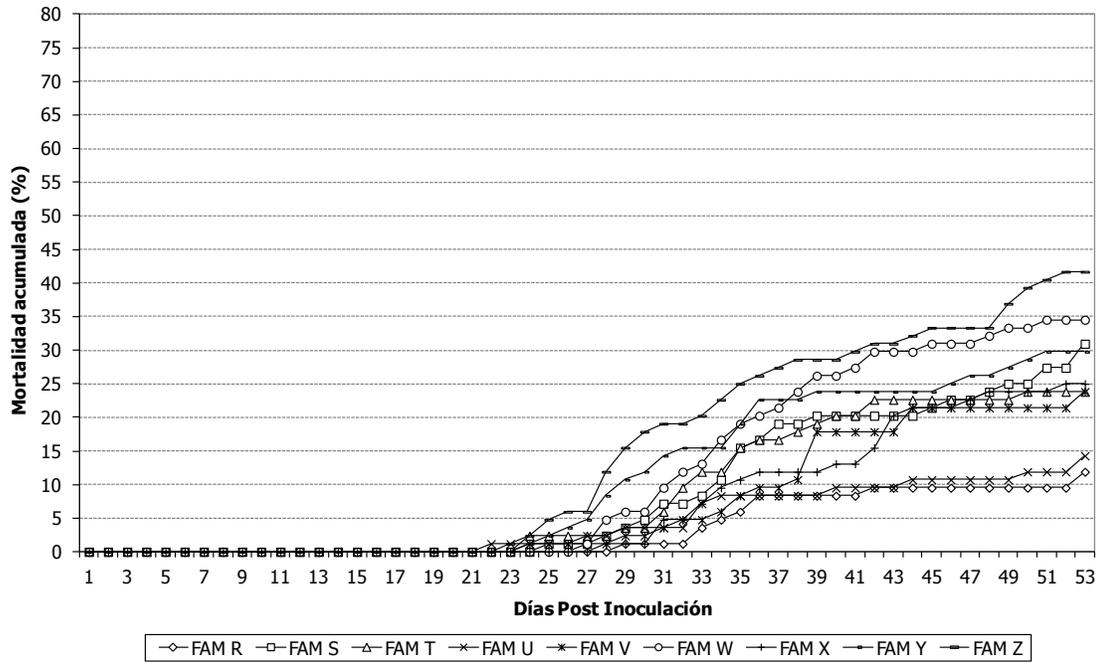


**Figura N°4: Mortalidad acumulada final (%), por familia, atribuible a piscirickettsiosis en *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis***

**Figura N°5: Mortalidad acumulada (%) atribuible a piscirickettsiosis en *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis* en las familias A a I.**

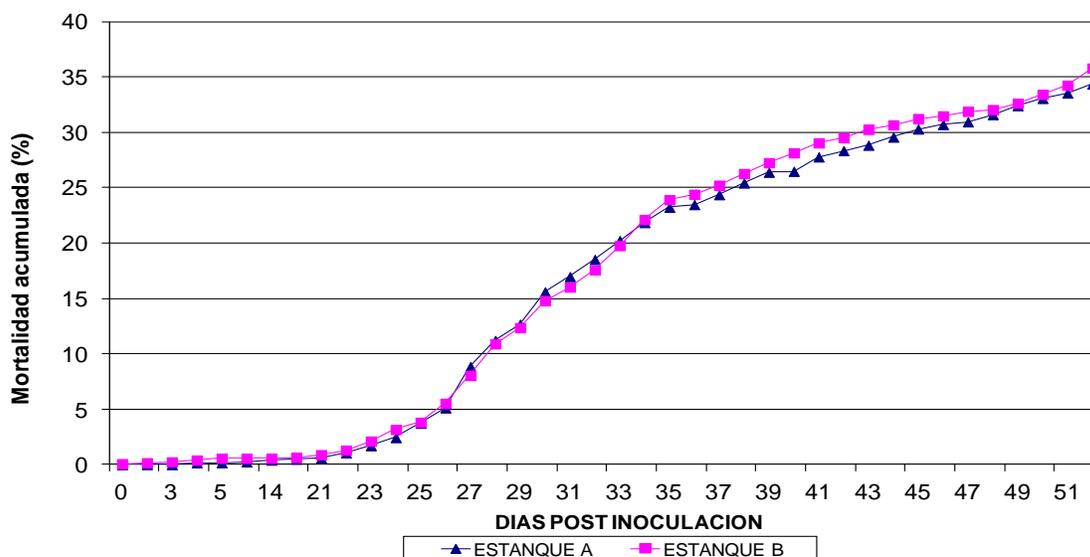


**Figura N°6: Mortalidad acumulada (%) atribuible a piscirickettsiosis en *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis* en las familias J a Q.**

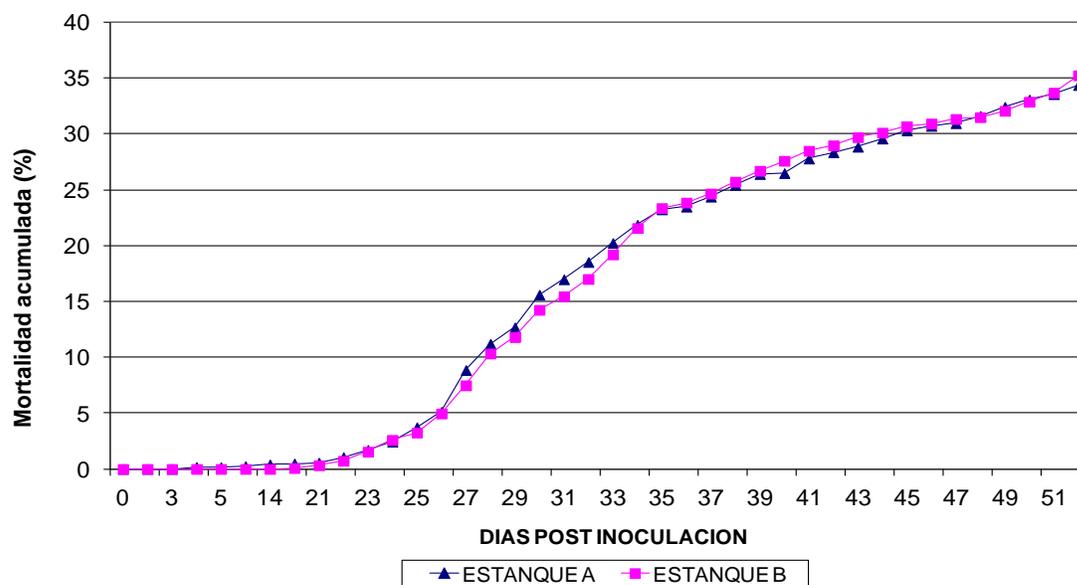


**Figura N°7: Mortalidad acumulada (%) atribuible a piscirickettsiosis en *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis* en las familias R a Z.**

Finalmente se observó que la dinámica general de mortalidades se presentó en forma homóloga entre ambos estanques (Figuras N°8a, N° 8b y Tabla N°2).



**Figura N°8a:** Mortalidad acumulada total (%) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis* por estanque.



**Figura N°8b:** Mortalidad acumulada (%) atribuible a piscirickettsiosis en *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis* por estanque.

### 5.3.2. Peces Controles.

La enfermedad se transmitió a los peces controles que cohabitaban, observándose comportamientos, signos clínicos y peces muertos con lesiones compatibles con

piscirickettsiosis desde el día 27 post-inoculación en adelante. Dicho fenómeno se evidenció en ambos estanques en forma muy similar, en cuanto al tiempo de presentación de la enfermedad, como en el número de individuos muertos. La mortalidad acumulada total de los peces controles alcanzó aproximadamente 4,1% (Figura N°9).

#### 5.4. Análisis de supervivencia (Kaplan-Meier).

Los análisis de supervivencia y sus comparaciones (Prueba de Log-rank) demostraron que hubo diferencias significativas, tanto en la comparación múltiple entre todas familias en su conjunto como entre pares de ellas, las que en número importante presentan diferencias significativas entre sí (Figuras N°10 a 94 y Tablas N°3 y 4). La Figura N°10 enseña las curvas de supervivencia de todas las familias en conjunto. Desde la Figura N°11 a la 39 se ilustran las curvas de supervivencia individuales de cada familia, y, desde la N°40 a la 94 se muestran las comparaciones de la curvas de supervivencia entre pares de familias. Las Figuras desde la N°11 hasta la 94 se encuentran en el Anexo 2.

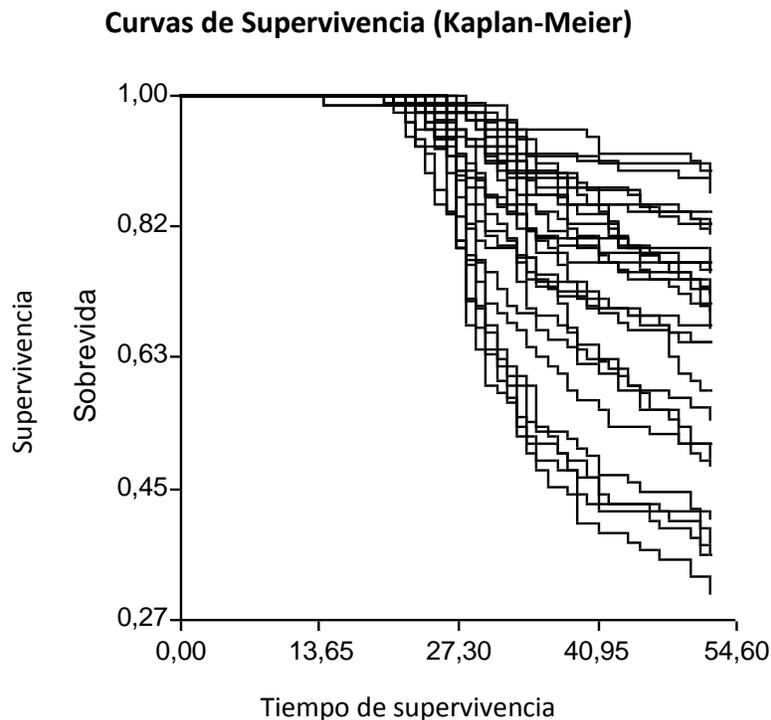


Figura N°10: Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de todas las familias (n=29) de *Salmo salar* inoculadas con *Piscirickettsia salmonis*. Las Tablas N°3 y 4 muestran las comparaciones

de supervivencia entre las familias con menor y mayor supervivencia, es decir la N°6 y la N°20, respectivamente, con las demás familias desafiadas.

**Tabla N°3: Comparación de probabilidad de supervivencia entre pares de familias (Prueba de Log-rank).**

<b>Comparación entre familias</b>	<b>Interpretación de las diferencias</b>
<i>E-A</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-B</i>	NO SIGNIFICATIVO
<i>E-C</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-CH</i>	NO SIGNIFICATIVO
<i>E-D</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-F</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-G</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-H</i>	NO SIGNIFICATIVO
<i>E-I</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-J</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-K</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-L</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-LL</i>	NO SIGNIFICATIVO
<i>E-M</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-N</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-Ñ</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-O</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-P</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-Q</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-R</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-S</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-T</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-U</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-V</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-W</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-X</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-Y</i>	SIGNIFICATIVO
<i>E-Z</i>	SIGNIFICATIVO

NO SIGNIFICATIVO: No existe diferencias estadísticas significativas entre las curvas de mortalidad ( $p > 0,05$ ).

SIGNIFICATIVO: Existe diferencia estadísticamente significativa  $p \leq 0,05$ .

**Tabla N°4: Comparación de probabilidad de supervivencia entre pares de familias (Prueba de Log-rank).**

<b>Comparación entre familias</b>	<b>Interpretación de las diferencias</b>
<i>Q-A</i>	SIGNIFICATIVO
<i>Q-B</i>	SIGNIFICATIVO
<i>Q-C</i>	NO SIGNIFICATIVO
<i>Q-CH</i>	SIGNIFICATIVO
<i>Q-D</i>	SIGNIFICATIVO
<i>Q-E</i>	SIGNIFICATIVO
<i>Q-F</i>	SIGNIFICATIVO
<i>Q-G</i>	SIGNIFICATIVO
<i>Q-H</i>	SIGNIFICATIVO
<i>Q-I</i>	SIGNIFICATIVO
<i>Q-J</i>	SIGNIFICATIVO
<i>Q-K</i>	SIGNIFICATIVO
<i>Q-L</i>	NO SIGNIFICATIVO
<i>Q-LL</i>	SIGNIFICATIVO
<i>Q-M</i>	SIGNIFICATIVO
<i>Q-N</i>	NO SIGNIFICATIVO
<i>Q-Ñ</i>	NO SIGNIFICATIVO
<i>Q-O</i>	SIGNIFICATIVO
<i>Q-P</i>	SIGNIFICATIVO
<i>Q-R</i>	NO SIGNIFICATIVO
<i>Q-S</i>	SIGNIFICATIVO
<i>Q-T</i>	SIGNIFICATIVO
<i>Q-U</i>	NO SIGNIFICATIVO
<i>Q-V</i>	SIGNIFICATIVO
<i>Q-W</i>	SIGNIFICATIVO
<i>Q-X</i>	SIGNIFICATIVO
<i>Q-Y</i>	SIGNIFICATIVO
<i>Q-Z</i>	SIGNIFICATIVO

NO SIGNIFICATIVO: No existe diferencias estadísticas significativas entre las curvas de mortalidad ( $p > 0,05$ ).

SIGNIFICATIVO: Existe diferencia estadísticamente significativa  $p \leq 0,05$ .

### **5.5. Peso y talla de los peces.**

Los datos estadísticos de estas tres variables se muestran a partir de la Tabla N°5 hasta la N°11, las que se encuentran en el ítem denominado Anexo 3 de Resultados.

## 6. DISCUSIÓN

Las condiciones generales en que se mantuvieron los peces durante el experimento fueron adecuadas para cumplir los requerimientos fisiológicos de la especie en estudio. Así, la temperatura promedio diaria del agua fluctuó entre un mínimo de 9,97 °C y un máximo de 14,7 °C. Por otra parte, los niveles de oxígeno disuelto en el agua tuvieron un rango entre 8,1 y 10,9 mg/L. Ambos parámetros se consideran en valores apropiados para el salmón del Atlántico durante la etapa fisiológica que se usó para este ensayo (Klontz, 1993). En este mismo contexto, la frecuencia de recambio de agua empleado, que fue de aproximadamente 9 veces por día, supera ampliamente los requerimientos mínimos y permite la adecuada eliminación de productos nitrogenados de desecho, tanto de proteínas, como de ácidos nucleicos (Laird y Kennedy, 2002). La densidad de la biomasa fue bastante alta, ya que al momento de iniciarse el ensayo alcanzó los 54,3 kg/m<sup>3</sup> de agua, lo cual excede lo recomendado para una explotación comercial (Pillay, 1993). No obstante lo anterior, y probablemente por la elevada tasa de recambio de agua, los niveles de oxígeno disuelto se mantuvieron en niveles suficientes, por lo cual esta alta densidad no habría tenido efectos directos sobre los peces experimentales. Sin embargo, se debe mencionar que una densidad alta de biomasa puede actuar como estresor y además, incrementar la tasa de contacto y por tanto, favorecer la transmisión de patógenos entre los peces (Salinas *et al.*, 1997). Un elemento favorable es que el agua que abasteció los estanques proviene de una vertiente; esto es importante en cuanto a que provee una alta seguridad de no estar contaminada con patógenos de peces (Roberts, 2001) que podrían interferir en los resultados del experimento.

Las experiencias realizadas por Cvitanich *et al.* (1991), Almendras *et al.* (1997) y Salinas *et al.* (1997) han demostrado la existencia de transmisión horizontal en condiciones de agua dulce, la cual se ve favorecida por el contacto entre los peces (Almendras *et al.*, 1997) y por el aumento de la densidad poblacional (Salinas *et al.*, 1997). La infección se transmite a pesar de que se ha demostrado en forma *in vitro* una viabilidad baja de *P. salmonis* en agua dulce (Lannan y Fryer, 1994). Experimentalmente, se ha observado que el agente es eliminado mediante heces, orina y bilis, que podrían constituir las vías de diseminación de este patógeno en el ambiente acuático (Salinas *et al.*, 1997).

De acuerdo a Salinas *et al.* (1997), la magnitud de la transmisión horizontal de piscirickettsiosis en condiciones de agua dulce depende directamente de la densidad poblacional. En sus investigaciones, lograron mortalidades acumuladas de un 4% con una densidad de 20 kg /m<sup>3</sup> y 14% con 40 kg/m<sup>3</sup>, en truchas arco iris mantenidas en cohabitación con otras inoculadas con *P. salmonis* vía IP. Estos resultados son congruentes con los obtenidos por Garcés *et al.* (1991), quienes demostraron que *P. salmonis* no se transmite entre salmones coho mantenidos en cohabitación cuando la densidad poblacional es muy baja (3 kg/m<sup>3</sup>) en agua dulce. Como se mencionó anteriormente, en la presente tesis se usó una densidad aproximada de 54 kg/m<sup>3</sup> lo cual probablemente favoreció la transmisión horizontal entre los peces inoculados y los controles. En todo caso, esta densidad fue disminuyendo en el tiempo a medida que las mortalidades acumuladas de los peces de las diferentes familias fueron aumentando. Cabe señalar que no hubo mortalidades en los peces controles por causas distintas a piscirickettsiosis, lo cual contribuye a dar robustez a los resultados obtenidos.

En cualquier caso, el uso de “pit tags” fue de gran utilidad en esta investigación, ya que al tener la capacidad de identificar a cada ejemplar inoculado permitió mantener cohabitando peces de distintas familias en un mismo estanque y por lo tanto, en un mismo ambiente. Cabe

señalar que la eliminación del denominado “efecto estanque” es importante, puesto que puede ser un factor de variación en este tipo de ensayos confundiendo la interpretación de resultados.

El uso de “pit tags” se inició a mediados de la década de 1980 como una nueva estrategia para la identificación de animales y se ha convertido en una poderosa herramienta para desarrollar investigaciones que requieran marcar grandes cantidades de individuos (Gibbons y Andrews, 2004). En el caso de peces, el empleo de “pit tags” ha tenido gran importancia en diferentes tipos de estudios como los de monitoreo del uso del hábitat, de movimientos espaciales y de comportamientos migratorios de estos animales acuáticos (Gheorghiu *et al.*, 2010). Este método tiene la ventaja sobre otras técnicas de identificación en cuanto a que provee millones de códigos alfanuméricos únicos en pequeñas cápsulas de vidrio biocompatibles que pueden ser implantadas en tejidos o en cavidades orgánicas (Acolas *et al.*, 2007).

Aún cuando el salmón coho es la especie más susceptible a *P. salmonis* (Smith *et al.*, 1996a), en este estudio se trabajó con salmón del Atlántico debido a que el impacto económico de la enfermedad es mayor en esta última especie. Esto es en razón a que de todos modos el salmón del Atlántico cursa con elevadas tasas de mortalidad (Mauel y Miller, 2002) y su volumen de producción históricamente ha sido el más grande entre las especies salmonídeas producidas en Chile.

En pruebas de desafío en peces, la exposición a agentes patógenos generalmente se realiza, ya sea directamente mediante inyección IP o por cohabitación con animales infectados previamente. El primer método garantiza la entrega de una dosis infectante homogénea, pero no tiene en cuenta el papel de las barreras mucosas epiteliales (piel, branquias y el intestino) en los mecanismos de defensa. El segundo método, en cambio, se asemeja mucho más a una infección natural, pero la exposición al patógeno puede ser muy variable en los animales

desafiados (Antonello *et al.*, 2009). En el caso de este ensayo, el desafío con *P. salmonis* se hizo por vía IP debido a que, a pesar de las desventajas que podría tener, es el único método disponible que permite reproducir esta enfermedad específica en forma consistente.

El desafío experimental resultó apropiado por tres razones. En primer término, la enfermedad se reprodujo exitosamente; en segundo lugar, los resultados en ambos estanques fueron similares mostrando consistencia entre réplicas (Fig. N°8b) y finalmente, el promedio de mortalidad acumulada general fue moderado (Tabla N°2), permitiendo diferenciar la susceptibilidad entre las diferentes familias a la piscirickettsiosis (Figs. N°5, 6 y 7), que era el fenómeno que se pretendía caracterizar en esta investigación. Por lo anteriormente expuesto, la dosis y vía de exposición usadas resultaron adecuadas y en consonancia con lo esperado para este ensayo.

En este estudio, la mortalidad acumulada atribuible a piscirickettsiosis alcanzó un promedio general de 34,7%. Esto es concordante con informes de terreno que señalan que las mortalidades ocasionadas por *P. salmonis* alcanzan valores que fluctúan entre 20 a 50% (Bravo y Campos, 1989), incluso llegando al 90% en algunos centros de cultivo (Fryer *et al.* 1990).

Las mortalidades se presentaron en todas las familias inoculadas con la bacteria, pero los porcentajes de mortalidad acumulada finales atribuibles a la enfermedad, ordenados por familia, fluctuaron desde 10,5% a 70%, mostrando una gran variabilidad en la susceptibilidad entre éstas. Las lesiones macroscópicas de los peces inoculados con *P. salmonis*, moribundos o muertos, fueron similares a las descritas previamente para esta enfermedad tanto en su presentación en condiciones de campo (Bravo y Campos, 1989; Branson y Nieto Díaz-Muñoz, 1991; Cvitanich *et al.*, 1991; Larenas *et al.*, 1995) como inducida en forma experimental (Smith *et al.*, 1996a; Monasterio, 2008).

Consistentemente con la gran variación en las mortalidades acumuladas entre las familias inoculadas, se presentó una diferencia estadística de la probabilidad de supervivencia entre ellas (Fig. N°10; Tablas N°3 y 4), lo que sugiere que el nivel de resistencia a la piscirickettsiosis depende, al menos en parte, del genotipo de los peces de las distintas familias.

Cabe señalar que la metodología aquí usada para evidenciar resistencia a enfermedades ha sido empleada en numerosas ocasiones anteriores para otras afecciones y se expresa como tasa de supervivencia durante la vida o supervivencia después de la infección con un patógeno específico en una prueba de desafío (Gjedrem, 2000; Kettunen y Fjalestad, 2006). Tal supervivencia es consecuencia de una baja susceptibilidad al agente patógeno o una alta tolerancia a éste (Kettunen y Fjalestad, 2006).

Es necesario hacer notar que las familias no eran estadísticamente homogéneas en las variables peso y talla (Anexo 3: Tablas N°5, 6, 7, 8 y 9), siendo particularmente el peso la característica con mayor variación (Anexo 3: Tabla N°7). En este sentido, la familia *E* que tuvo la menor supervivencia coincidentemente también tiene un bajo peso, lo que sugiere que esta variable pudo haber influido en el resultado de las mortalidades en este caso en particular. Sin embargo, en el resto de las familias se observa una asociación aleatoria entre estas variables (peso y talla) respecto a los valores de supervivencia. Así, como se ilustra en la Tabla N°11 del Anexo 3, no existió correlación (coeficiente de correlación de Pearson) entre las medias de pesos y de talla respecto de la mortalidad acumulada obtenida con cada familia. Estos análisis estadísticos sugieren que la variación en la resistencia a la enfermedad en este ensayo estuvo dada principalmente por el efecto genético y no por otras variables entre las familias, al menos en la mayoría de los casos, indicando una base genética de la resistencia a *P. salmonis*.

El uso de métodos de desafío experimental en condiciones controladas, como el realizado en el presente estudio, ha sido una herramienta de gran importancia para establecer las bases de programas recientes de mejoramiento genético en acuicultura. En numerosos casos, se ha observado que hay diferencia en relación a la resistencia genética entre familias o cepas de peces frente a diferentes patógenos. En este contexto, el repertorio de agentes infecciosos que se han usado para desafiar peces es bastante amplio, incluyendo bacterias, virus y parásitos. Las respuestas a patógenos bacterianos han sido las más estudiadas e incluyen *A. salmonicida* (Gjøen *et al.*, 1997; Cipriano *et al.*, 2002; Midtlyng *et al.*, 2002; Glover *et al.*, 2006; Kettunen y Fjalestad, 2006; Ødegard *et al.*, 2007; Kjøglum *et al.*, 2008), *Vibrio anguillarum* (Kettunen y Fjalestad, 2006), *V. salmonicida* (Gjedrem y Gjøen, 1995), *Yersinia ruckeri* (Midtlyng *et al.*, 2002; Henryon *et al.*, 2005), *Flavobacterium psychrophilum* (Henryon *et al.*, 2005; Leeds *et al.*, 2010), *A. hydrophila* (Ødegard *et al.*, 2010) y *Renibacterium salmoninarum* (Gjedrem y Gjøen, 1995). En cuanto a agentes virales, se han descrito investigaciones con los virus causantes de la necrosis pancreática infecciosa (Midtlyng *et al.*, 2002; Rønneseth *et al.*, 2007; Storset *et al.*, 2007; Wetten *et al.*, 2007), de la anemia infecciosa del salmón (Midtlyng *et al.*, 2002; Ødegard *et al.*, 2007), de la septicemia hemorrágica viral (Kaastrup *et al.*, 1991; Slierendrecht *et al.*, 2001; Midtlyng *et al.*, 2002) y de la enfermedad del páncreas (McLoughlin *et al.*, 2006). Finalmente respecto de parásitos, la literatura registra estudios con dos tipos de ectoparásitos, uno de ellos correspondiente al copépodo *L. salmonis* (Kolstad *et al.*, 2005) y el otro al protozoo *Neoparamoeba perurans* (Taylor *et al.*, 2009), aunque en este último caso los peces se desafiaron en condiciones naturales.

Este tipo de desafíos experimentales usados para evaluar el potencial de un programa de mejoramiento genético de resistencia a enfermedades se ha realizado en distintas especies

de peces (Midtlyng *et al.*, 2002; Gjedrem y Baranski, 2009); la mayoría ha sido efectuado en miembros de la subfamilia *Salmoninae* y dentro de éstos, el salmón del Atlántico es la especie que se ha estudiado con mayor amplitud (Gjedrem y Gjølén, 1995; Gjølén *et al.*, 1997; Kolstad *et al.*, 2005; Glover *et al.*, 2006; Ødegard *et al.*, 2007; Rønneseth *et al.*, 2007; Storset *et al.*, 2007; Wetten *et al.*, 2007; Kjølglum *et al.*, 2008).

La diferencia observada en este estudio entre familias, en cuanto a las mortalidades acumuladas y a las probabilidades de supervivencia, se ha descrito con otros patógenos usados para desafiar peces cultivados. Así por ejemplo, en el caso del virus de la anemia infecciosa del salmón, al desafiar 50 familias de salmón del Atlántico, se obtuvo un rango de mortalidad según familia que varió desde 5,6% a 96,4% (Grimholt *et al.*, 2003). En el mismo sentido, en un ensayo de desafío para investigar la resistencia a *V. anguillarum* de 20 familias de bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) se obtuvieron porcentajes de sobrevivencia que variaron desde un 9,5 a un 86,1% (Kettunen y Fjalestad, 2006), mostrando diferencias estadísticas significativas entre ellas al usar las mismas pruebas (Kaplan-Meier y Log-rank) empleadas en la presente tesis.

Hay que considerar que la selección genética dirigida a mejorar la resistencia para una enfermedad en peces puede tener efectos contraproducentes, puesto que se puede correlacionar negativamente con otras enfermedades u otros rasgos deseables para la producción de estos animales (Gjedrem y Baranski, 2009).

La resistencia genética a enfermedades promete ser una herramienta de importancia en el manejo sanitario de peces cultivados. Si bien es un proceso de mediano o largo plazo, y que requiere una inversión económica importante, tiene la ventaja que sus características son aditivas y que permanecen en el tiempo. En el caso de piscirickettsiosis, donde otros métodos de control de la enfermedad, como los terapéuticos y las vacunas, no han tenido el resultado

esperado, la selección para mejorar la resistencia frente a esta enfermedad surge como una alternativa interesante y los resultados de este trabajo que muestran la variabilidad entre familias entregan el primer paso para este objetivo.

## 7. CONCLUSIONES

El desafío experimental resultó exitoso en cuanto a que la enfermedad se reprodujo en los peces inoculados.

Las mortalidades atribuibles a piscirickettsiosis presentaron un amplio rango de variación entre las familias inoculadas, fluctuando entre un 10,5 a un 70%.

Hubo diferencias estadísticas altamente significativas entre la supervivencia de las familias al analizarlas en su conjunto ( $p < 0,00001$ ), así como al comparar entre varios pares de ellas. Estos resultados indican que habría diferencias en la resistencia/susceptibilidad a *P. salmonis*, sobre la base de la constitución genotípica de los individuos que conforman las distintas familias desafiadas.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

**ACOLAS, M.L.; ROUSSEL, J.M.; LEBEL, J.M.; BAGLINIÈRE, J.L.** 2007. Laboratory experiment on survival, growth and tag retention following PIT injection into the body cavity of juvenile brown trout (*Salmo trutta*). Fish. Res. 86:280-284.

**ALMENDRAS, F.E.; FUENTEALBA, I.C.** 1997. Salmonid rickettsial septicemia caused by *Piscirickettsia salmonis*: a review. Dis. Aquat. Org. 29:137-144.

**ALMENDRAS, F.E.; FUENTEALBA, I.C.; JONES, S.R.M.; MARKHAM, F.; SPANGLER, E.** 1997. Experimental infection and horizontal transmission of *Piscirickettsia salmonis* in freshwater-raised Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J. Fish Dis. 20:409-418.

**ALMENDRAS, F.E.; FUENTEALBA, I.C.; MARKHAM, R.F.F.; SPEARE, D.J.** 2000. Pathogenesis of liver lesions caused by experimental infection with *Piscirickettsia salmonis* in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J. Vet. Diagn. Invest. 12:552-557.

**ALVARADO, V.; SCHÄFER, W.; ENRÍQUEZ, R.; MONRÁS, M.; CUBILLOS, V.; FARÍAS, C.; ALBERDI, A.** 1990. Síndrome del salmón coho (S.S.C.), nueva enfermedad de salmónidos cultivados en fase de agua de mar en Chile. Situación actual. Patol. Animal 4:10-13.

**ANÓNIMO.** 2001. Análisis de la Acuicultura y la Pesca en Chile. **In:** Acuicultura y Pesca, Compendio y Directorio Chile 2001. Antártica Quebecor. Santiago, Chile. pp. 19-32.

**ANÓNIMO.** 2007. Vacuna para salmónidos reduciría pérdidas económicas del sector. [en línea]. <<http://www.aqua.cl/noticias/index.php?doc=20550>> [consulta: 10-01-2012].

**ANTONELLO, J.; MASSAULT, C.; FRANCH, R.; HALEY, C.; PELLIZZARI, C.; BOVO, G.; PATARNELLO, T.; DE KONING, D.; BARGELLONI, L.** 2009. Estimates of heritability and genetic correlation for body length and resistance to fish pasteurellosis in the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Aquaculture 298:29-35.

**BARNES, M.N.; LANDOLT, M.L.; POWELL, D.B.; WINTON, J.R.** 1998. Purification of *Piscirickettsia salmonis* and partial characterization of antigens. Dis. Aquat. Org. 33:33-41.

**BIRKBECK, T.H.; GRIFFEN, A.A.; REID, H.I.; LAIDLER, L.A.; WADSWORTH, S.** 2004. Growth of *Piscirickettsia salmonis* to high titers in insect tissue culture cells. Infect. Immun. 72:3693-3694.

**BIRRELL, J.; MITCHELL, S.; BRUNO, D.W.** 2003. *Piscirickettsia salmonis* in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* in Scotland. Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol. 23:213-218.

**BRANSON, E.J.; NIETO DÍAZ-MUÑOZ, D.** 1991. Description for a new disease condition occurring in farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), in South America. J. Fish Dis. 14:147-156.

**BRAVO, S.; CAMPOS, M.** 1989. Síndrome del salmón coho. Chile Pesquero 54:47-48.

**BRAVO, S.; GUTIÉRREZ, S.** 1991. Avances en el estudio del síndrome del salmón coho. Chile Pesquero 64:39-42.

**BRAVO, S.** 1994. Piscirickettsiosis in freshwater. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 14:137-138.

**TITBALL, R.W.; JOHANSSON, A.; FORSMAN, M.** 2003. Will the enigma of *Francisella tularensis* virulence soon be solved?. Trends Microbiol. 11:118-123.

**TORANZO, A.E.; MAGARIÑOS, B.; ROMALDE, J.L.** 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture 246:37-61.

**WAYNE, D.** 2002. Análisis de Varianza. **In:** Bioestadística: Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. Cuarta Edición. Limusa S.A. Ciudad de México, México. pp.322-334.

**WETTEN, M.; AASMUNDSTAD, T.; KJOGLUM, S.; STORSET, A.** 2007. Genetic analysis of resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture. 272:111-117.

**WILHELM, V.; MIQUEL, A.; BURZIO, L.O.; ROSEMBLATT, M.; ENGEL, E.; VALENZUELA, S.; PARADA, G.; VALENZUELA, P.D.T.** 2006. A vaccine against the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* based on recombinants proteins. Vaccine 24:5083-5091.

**YÁÑEZ, J.M.; SMITH, P.A.; MANNESCHI, G.; GUAJARDO, A.; ROJAS, M.E.; LARENAS, J.; DÍAZ, S.; VALDÉS, M.; MARTÍNEZ, V.** 2010. Unravelling genetic co-variation for resistance and tolerance against *Piscirickettsia salmonis* infection in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **In:** IX World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Leipzig, Germany. August 1-6. PP4-125.

**YUKSEL, S.A.; THOMPSON, K.D.; ADAMS, A.** 2006a. Rickettsial infections of fish. Turk. J. Fish. Aquat. Sci. 6:63-78.

**YUKSEL, S.A.; THOMPSON, K.D.; ELLIS, A.E.; ADAMS, A.** 2006b. Improved purification of *Piscirickettsia salmonis* using Percoll gradients. J. Microbiol. Meth. 66:251-262.

# **ANEXO 1**



Santiago, 11 de octubre de 2011

## CERTIFICADO

En relación con los procedimientos utilizados en peces experimentales, tenida a la vista la metodología utilizada de la Memoria de Título denominada “**Desafío experimental con *Piscirickettsia salmonis* en familias de salmón del atlántico (*Salmo salar*)**”, cuyo profesor guía es el Dr. **Pedro Smith** y el estudiante es el Sr. Giancarlo Manneschi, el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile certifica que éste satisface lo estipulado en las recomendaciones de la OIE y en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigación biomédica, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas, adecuada y adoptada por este Comité, y no contraviene la legislación chilena vigente sobre la materia.

Dr. José Luis Arias B.  
Director  
Comité de Bioética Animal

Dr. Santiago Urcelay V.  
Decano

# **ANEXO 2**

Para efectos de esta tesis los números originales asignados para la identificación de cada una de las familias fueron reemplazados por letras en mayúscula itálica del alfabeto español y agregando los dígrafos *CH* y *LL* como indica en la siguiente tabla.

IDENTIFICACIÓN ORIGINAL DE LAS FAMILIAS	LETRA DE REEMPLAZO
3	<i>A</i>
4	<i>B</i>
5	<i>C</i>
8	<i>CH</i>
10	<i>D</i>
11	<i>E</i>
12	<i>F</i>
13	<i>G</i>
14	<i>H</i>
17	<i>I</i>
21	<i>J</i>
23	<i>K</i>
26	<i>L</i>
30	<i>LL</i>
31	<i>M</i>
32	<i>N</i>
34	<i>Ñ</i>
35	<i>O</i>
36	<i>P</i>
39	<i>Q</i>
40	<i>R</i>
46	<i>S</i>
50	<i>T</i>
51	<i>U</i>
52	<i>V</i>
56	<i>W</i>
57	<i>X</i>
59	<i>Y</i>
61	<i>Z</i>

## ANEXO 1

Curvas de supervivencia individuales y comparadas entre familias desafiadas.

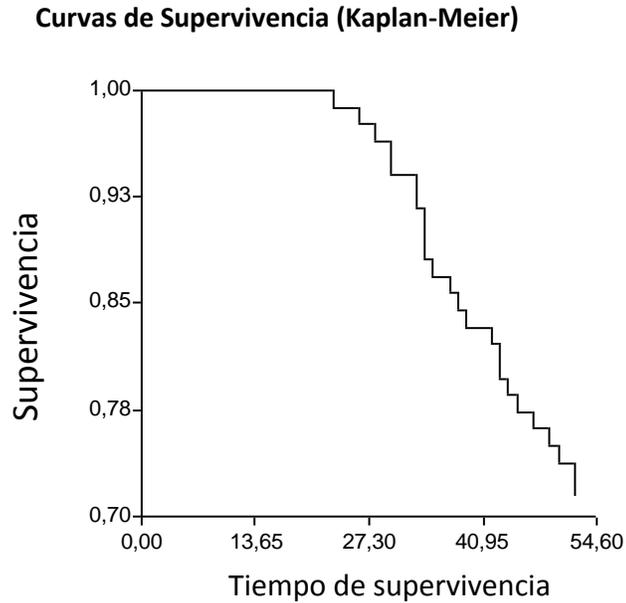


Figura N° 11: Familia A. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

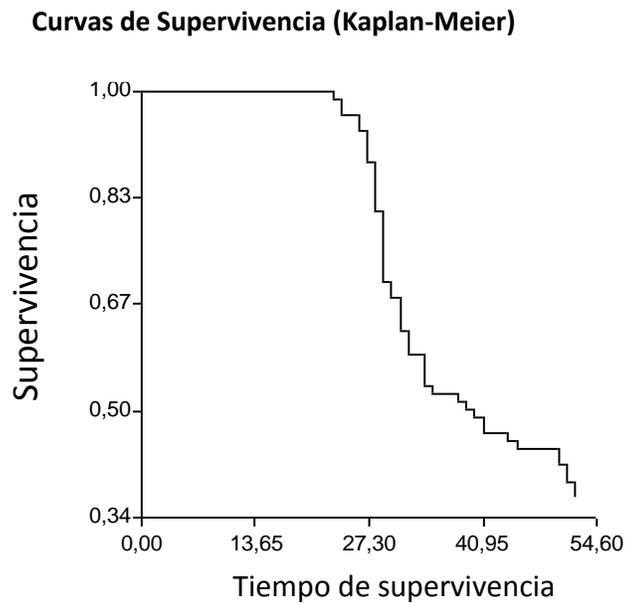


Figura N° 12: Familia B. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)

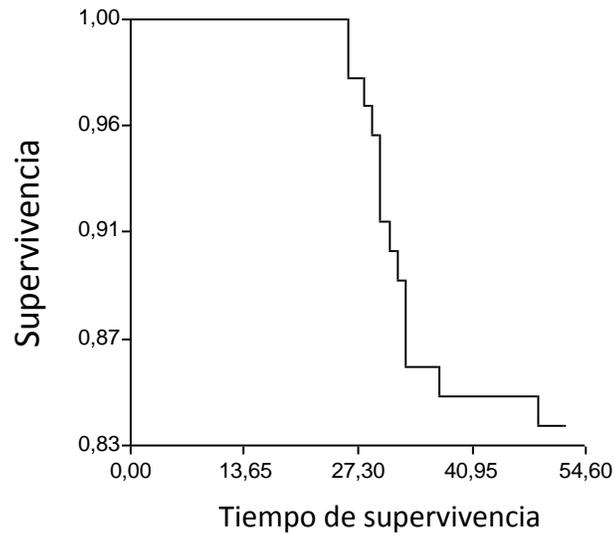


Figura N° 13: Familia C. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)

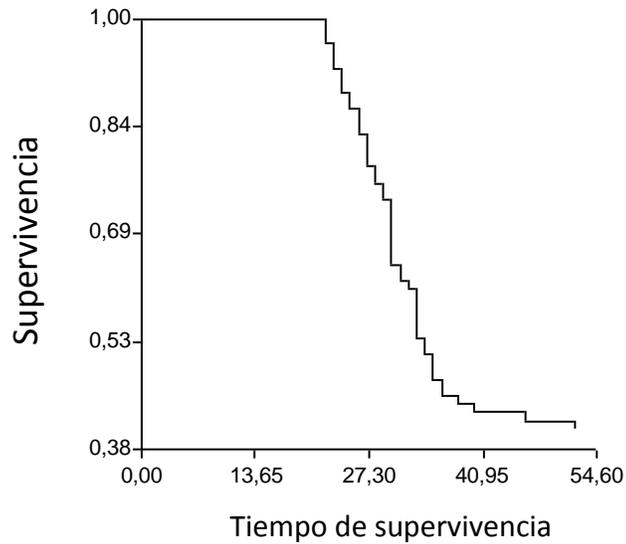


Figura N° 14: Familia CH. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)

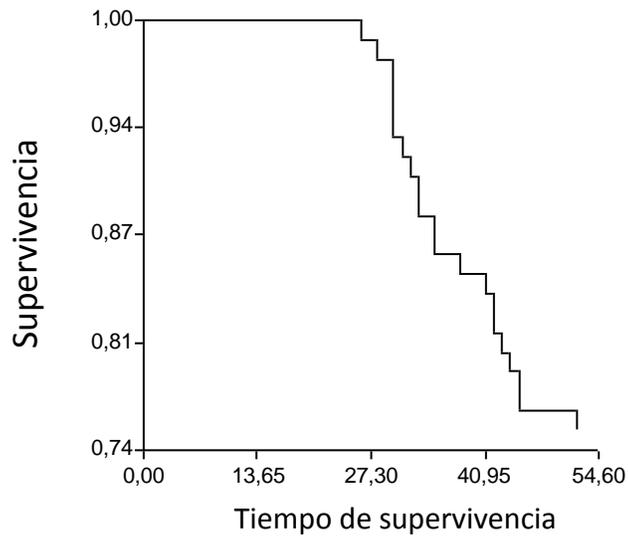


Figura N° 15: Familia D. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)

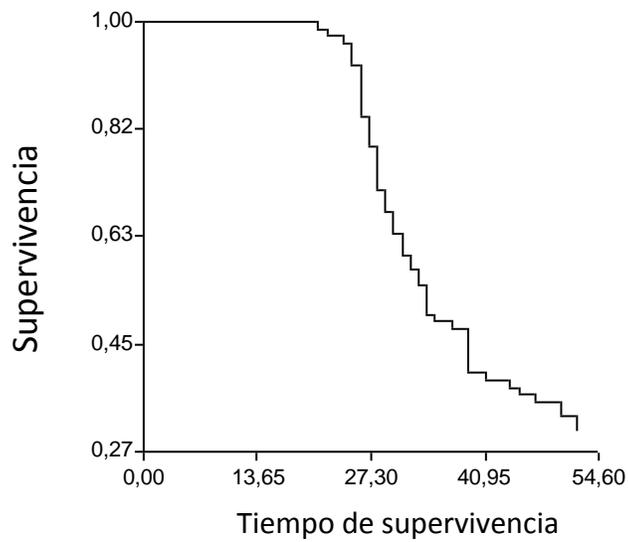


Figura N° 16: Familia E. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)

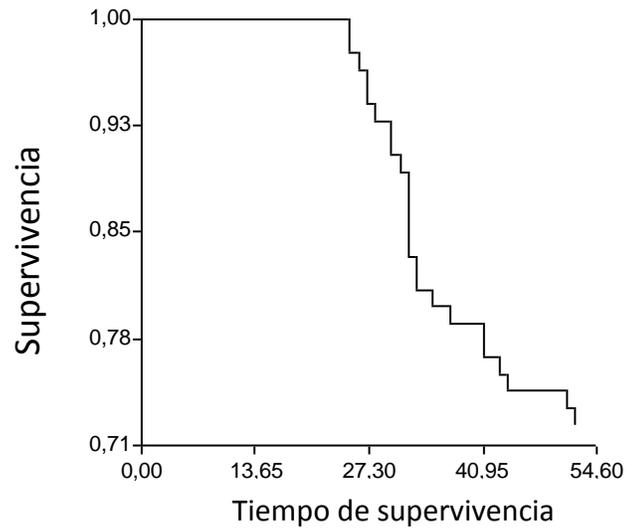


Figura N° 17: Familia F. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)

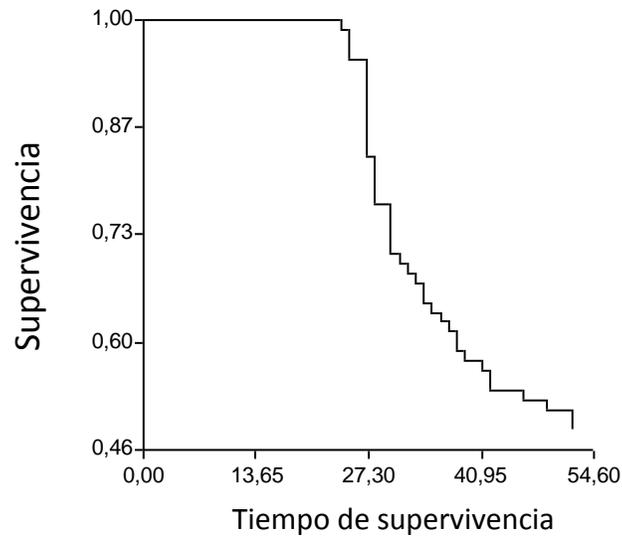


Figura N° 18: Familia G. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)

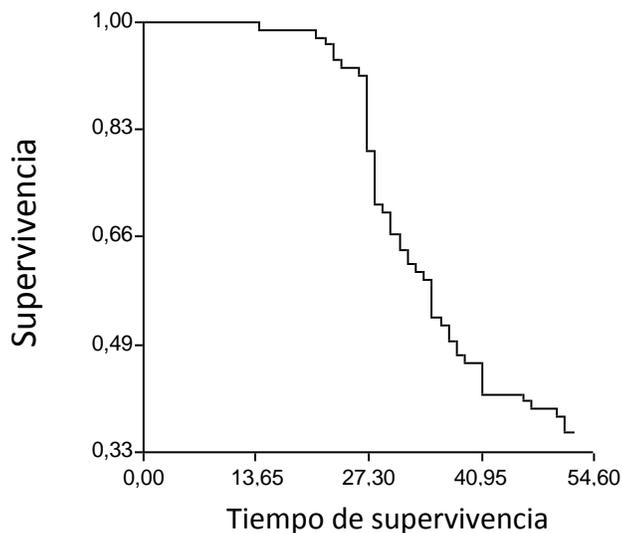


Figura N° 19: Familia H. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)

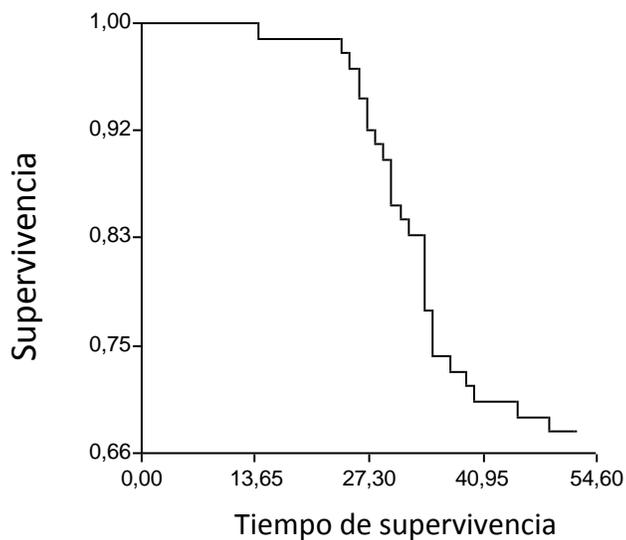


Figura N° 20: Familia I. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

**Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)**

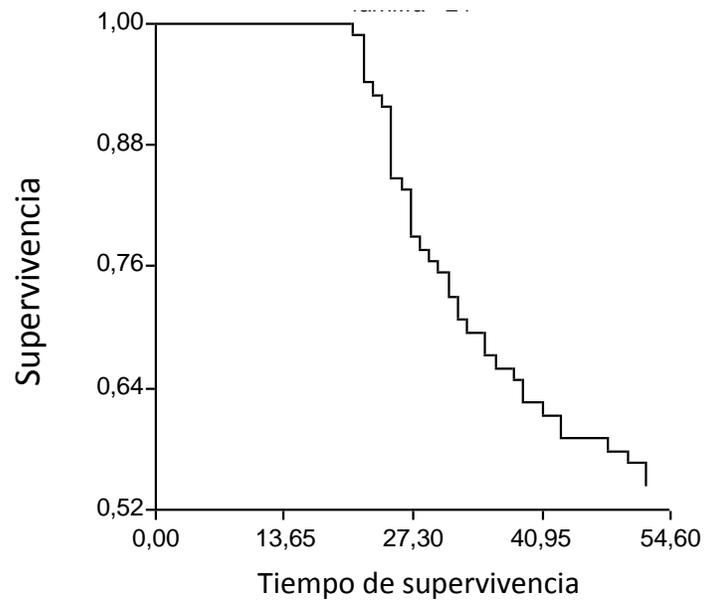


Figura N° 21: Familia J. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

**Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)**

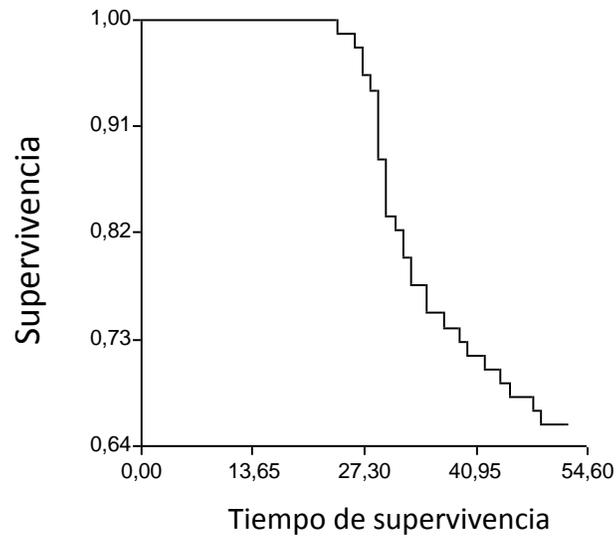


Figura N° 22: Familia K. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)

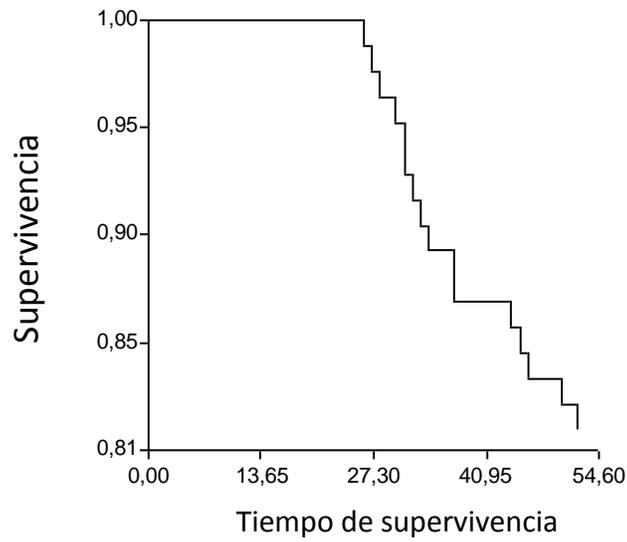


Figura N° 23: Familia L. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)

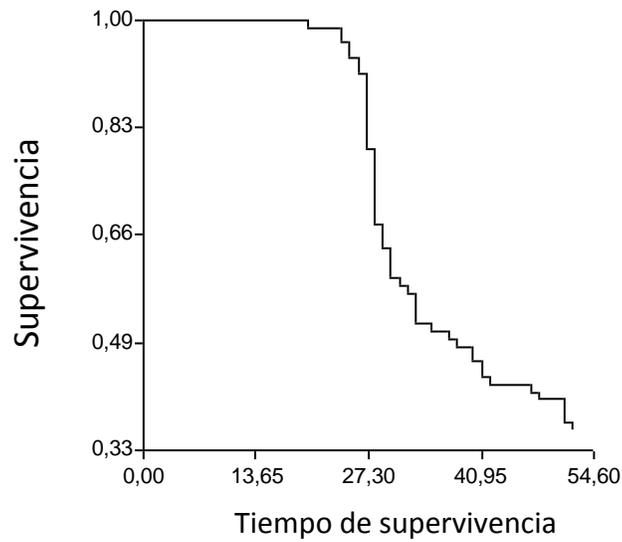


Figura N° 24: Familia LL. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

**Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)**

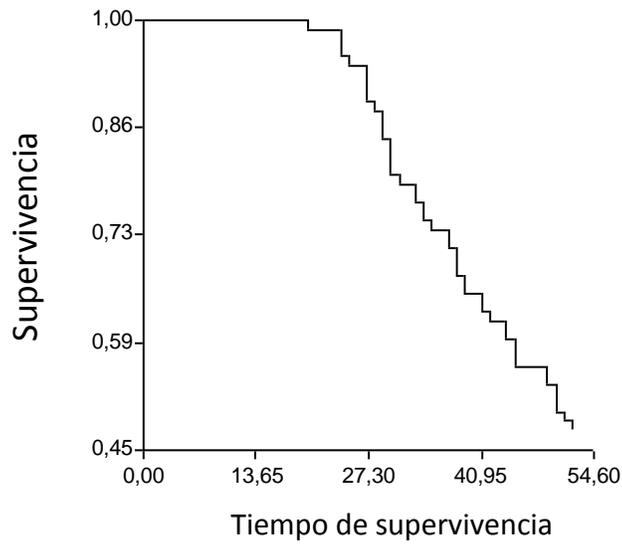


Figura N° 25: Familia M. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

**Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)**

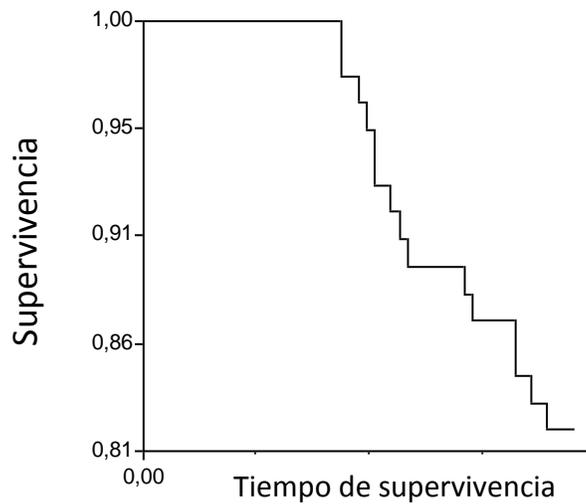


Figura N° 26: Familia N. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)

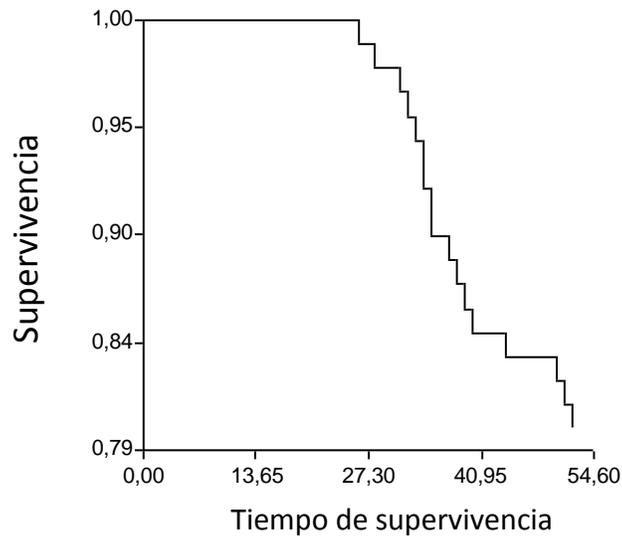


Figura N° 27: Familia  $\tilde{N}$ . Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)

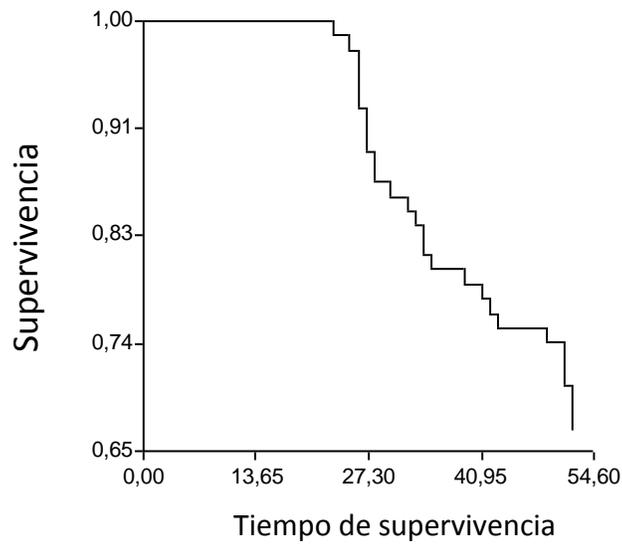


Figura N° 28: Familia  $O$ . Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

**Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)**

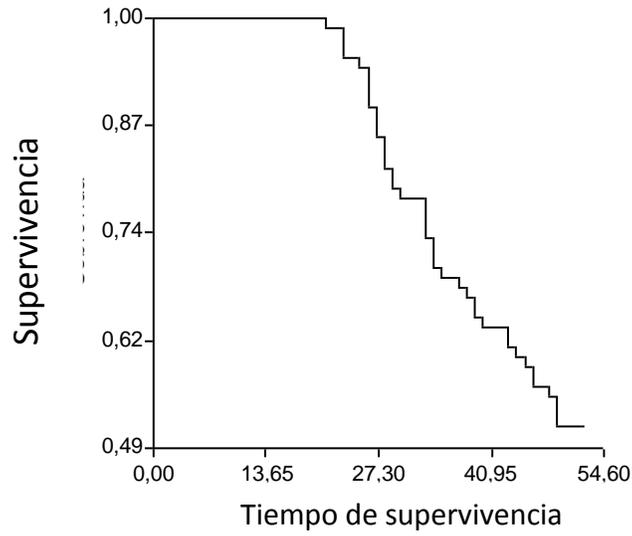


Figura N° 29: Familia P. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

**Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)**

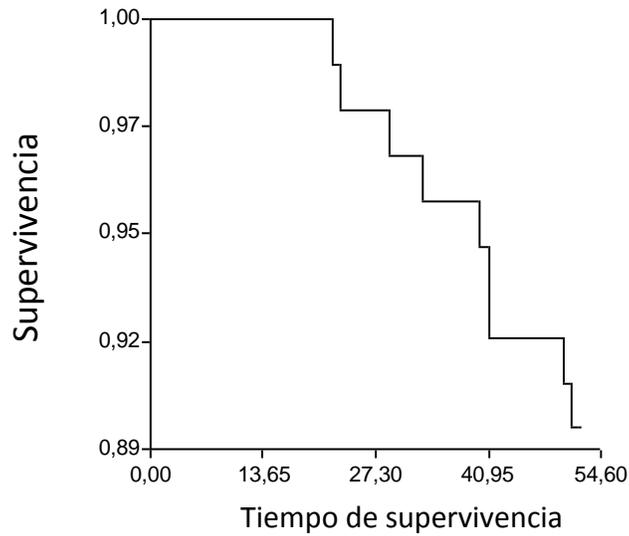


Figura N° 30: Familia Q. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)

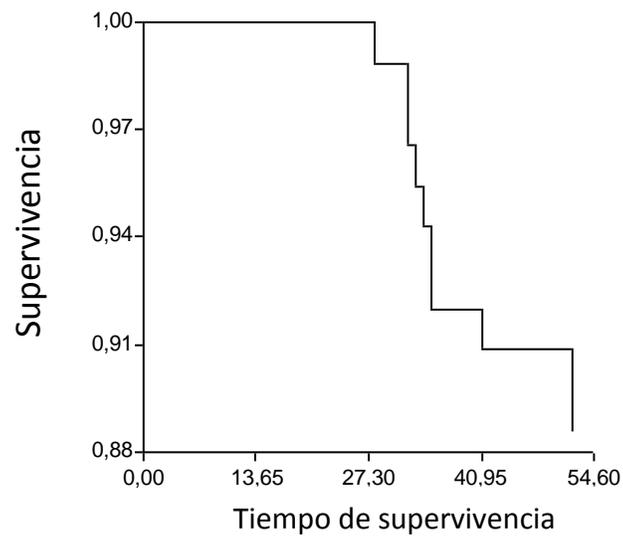


Figura N° 31: Familia R. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)

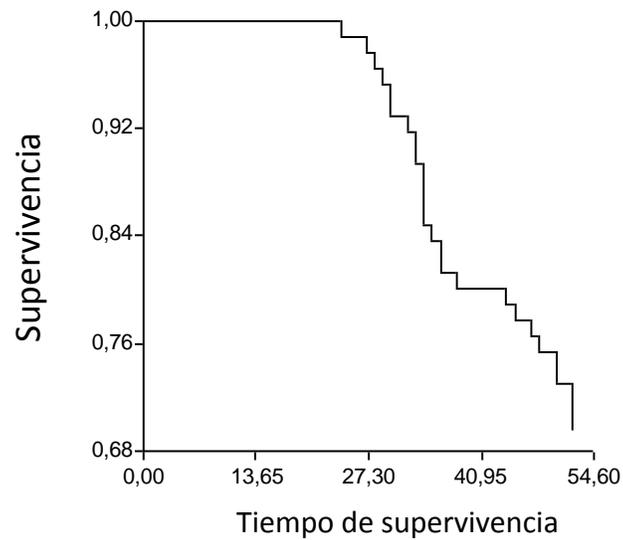


Figura N° 32: Familia S. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

**Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)**

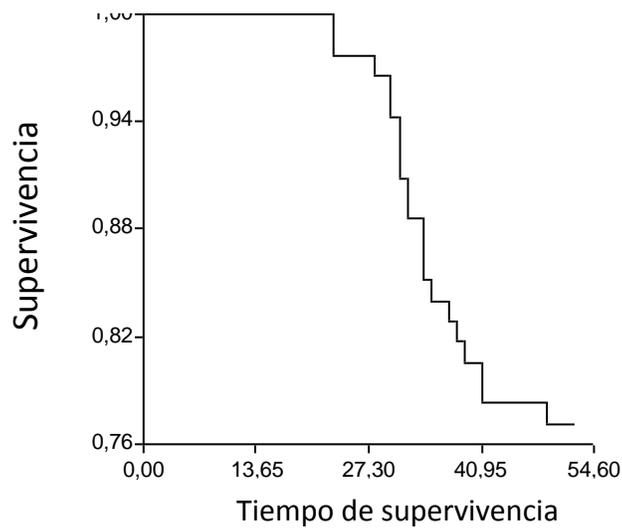


Figura N° 33: Familia T. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

**Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)**

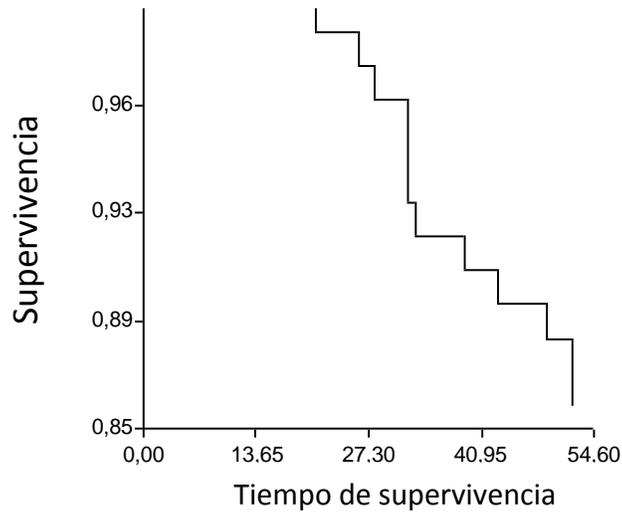


Figura N° 34: Familia U. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

**Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)**

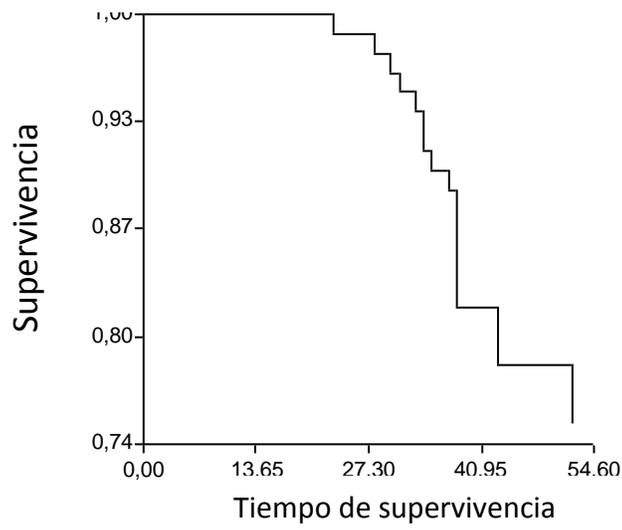


Figura N° 35: Familia V. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

**Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)**

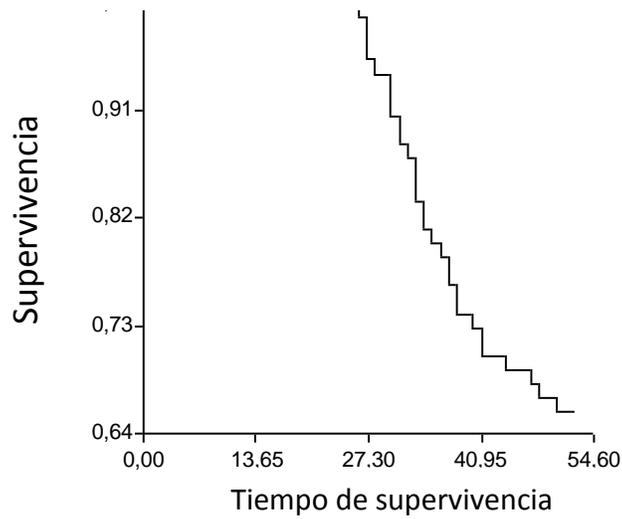


Figura N° 36: Familia W. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

**Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)**

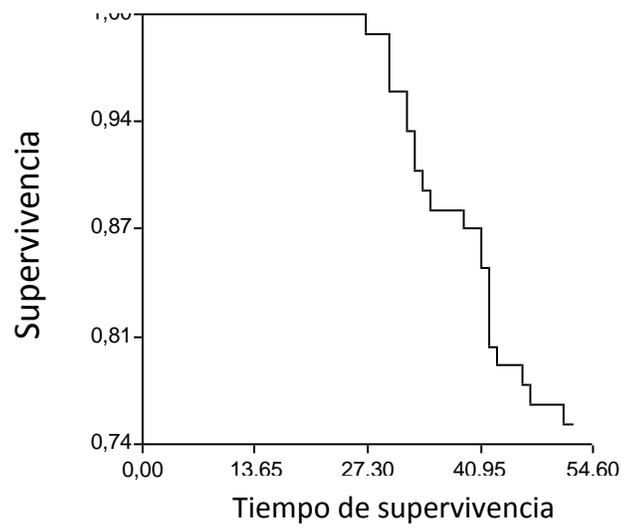


Figura N° 37: Familia X. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

**Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)**

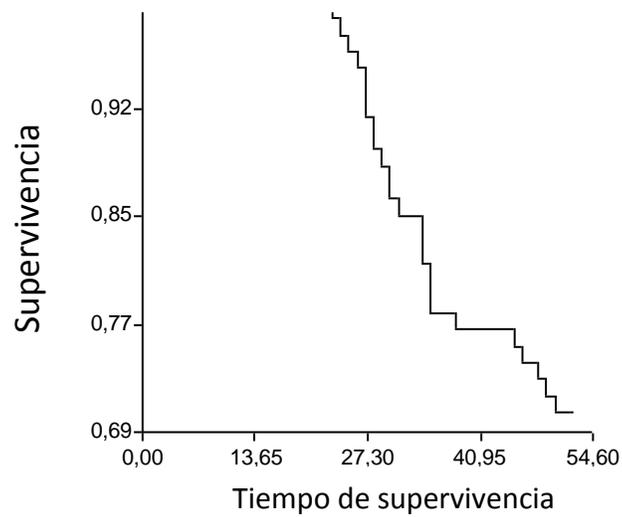


Figura N° 38: Familia Y. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)

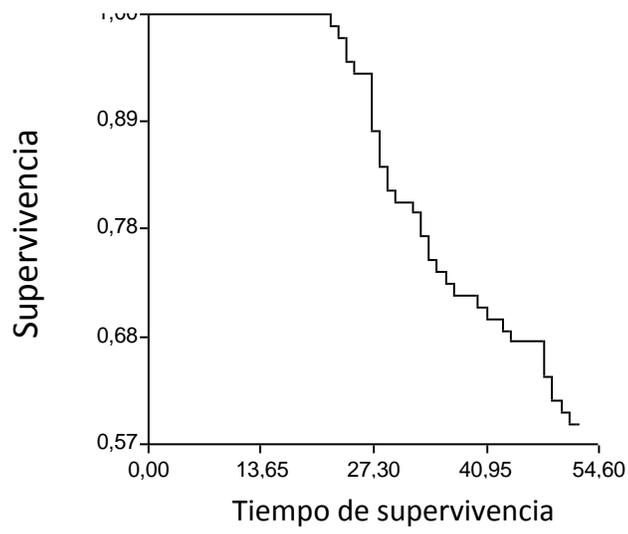
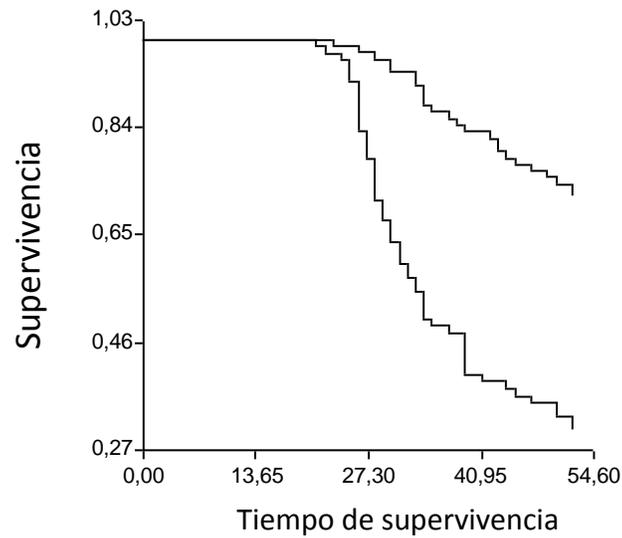


Figura N° 39: Familia Z. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

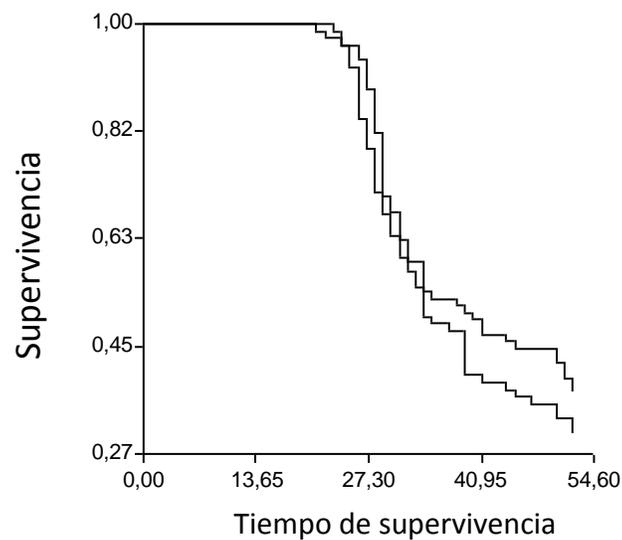
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=33,999 p=0,000000

Figura N° 40: Familias 1 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

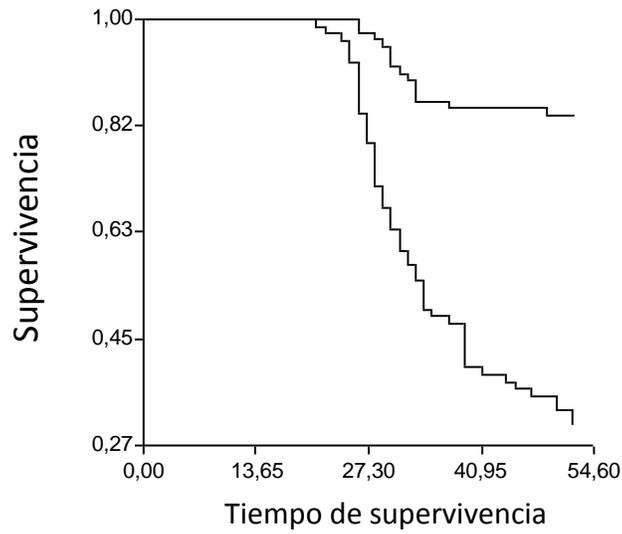
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=1,169 p=0,279547

Figura N° 41: Familias 2 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

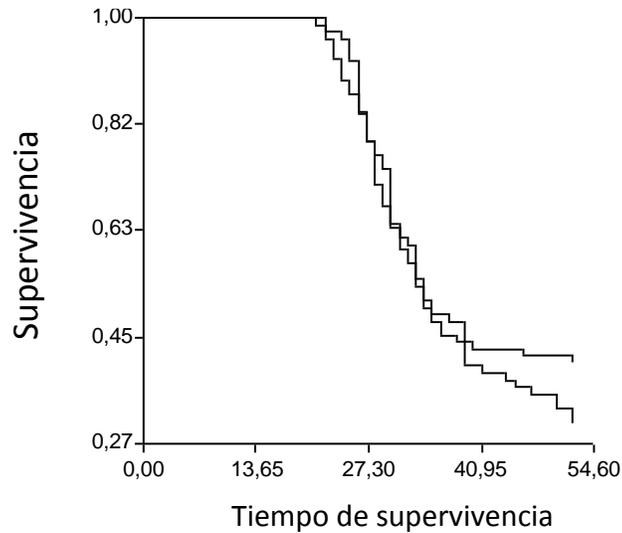
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=47,748 p=0,000000

Figura N° 42: Familias 3 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

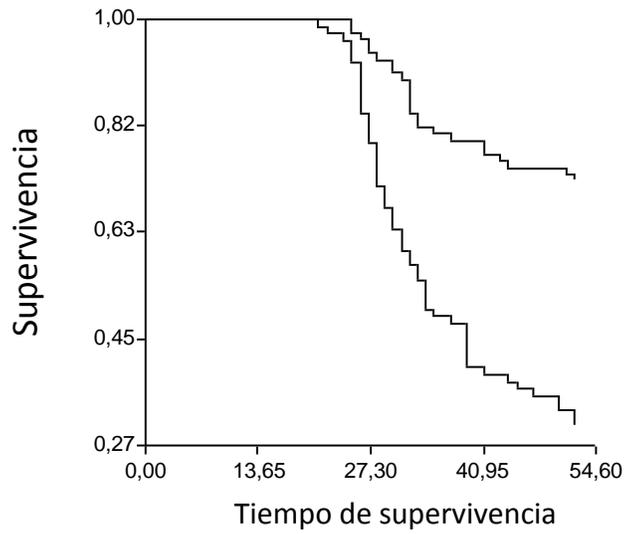
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=0,845 p=0,357841

Figura N° 43: Familias 4 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

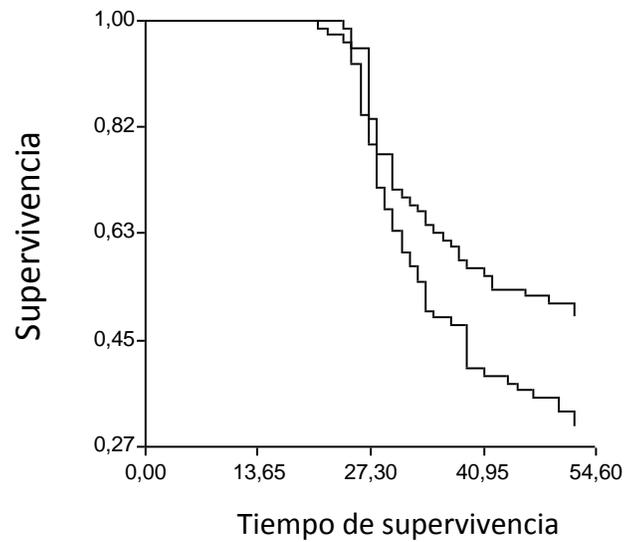
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=30,412 p=0,000000

Figura N° 44: Familias 7 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

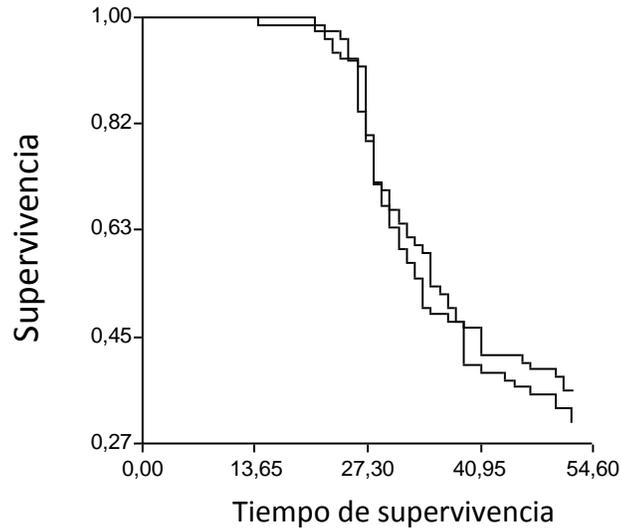
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=5,443 p=0,019641

Figura N° 45: Familias 8 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

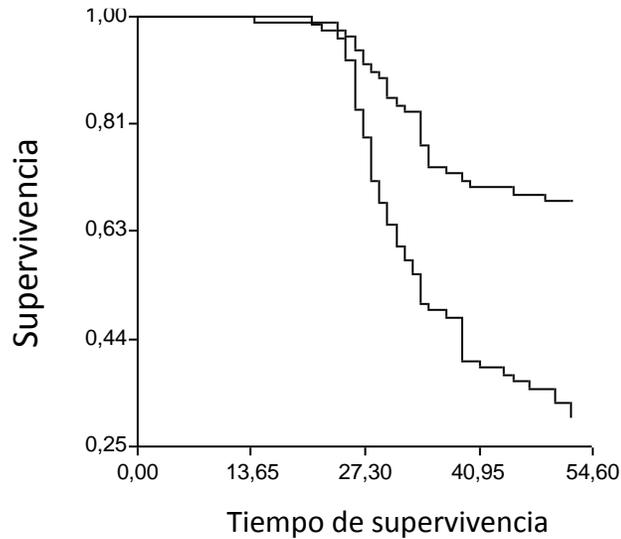
**Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)**



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=0,557 p=0,455443

Figura N° 46: Familias 9 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

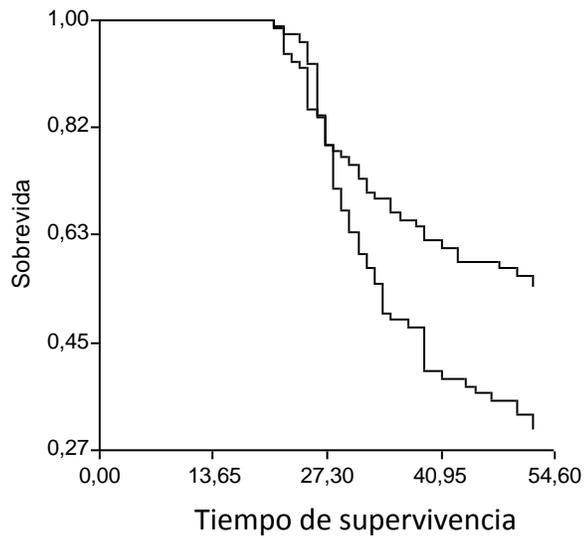
**Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)**



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=22,746 p=0,000002

Figura N° 47: Familias 10 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

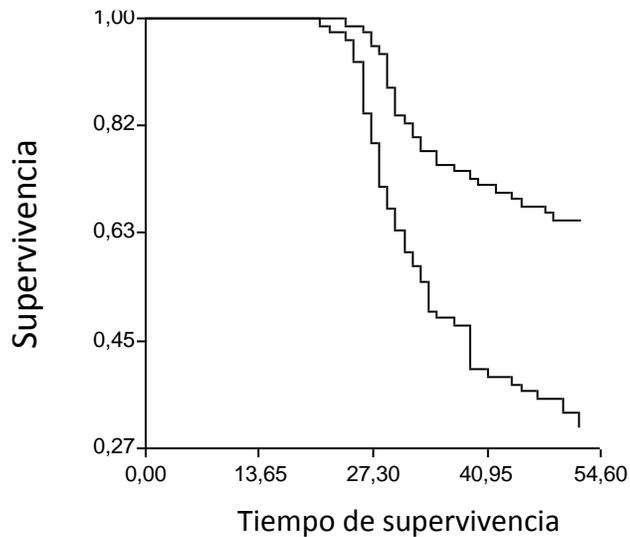
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=7,752 p=0,005366

Figura N° 48: Familias 11 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

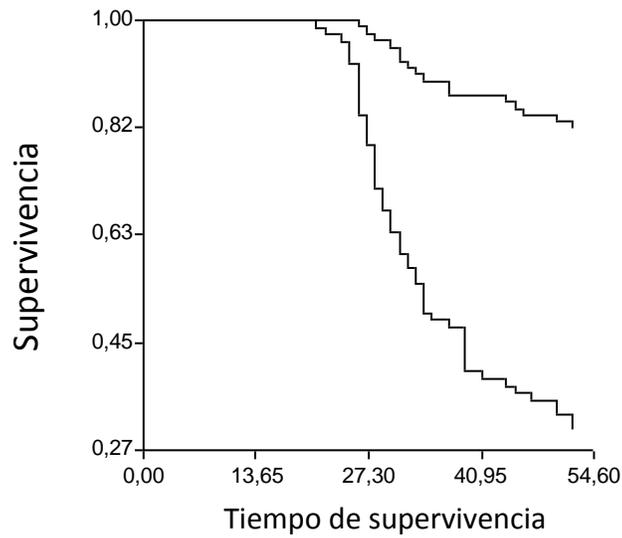
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=21,209 p=0,000004

Figura N° 49: Familias 12 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

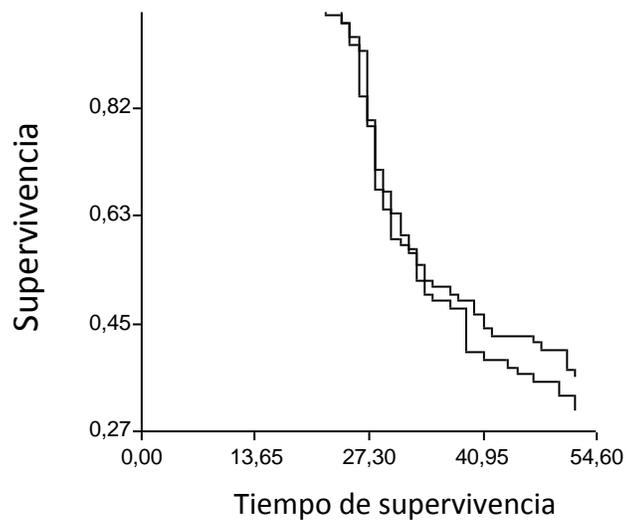
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=47,590 p=0,000000

Figura N° 50: Familias 13 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

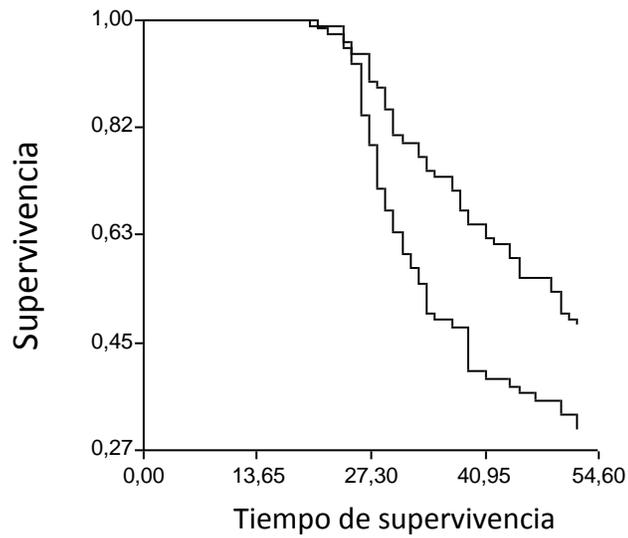
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=0,398 p=0,527873

Figura N° 51: Familias 14 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

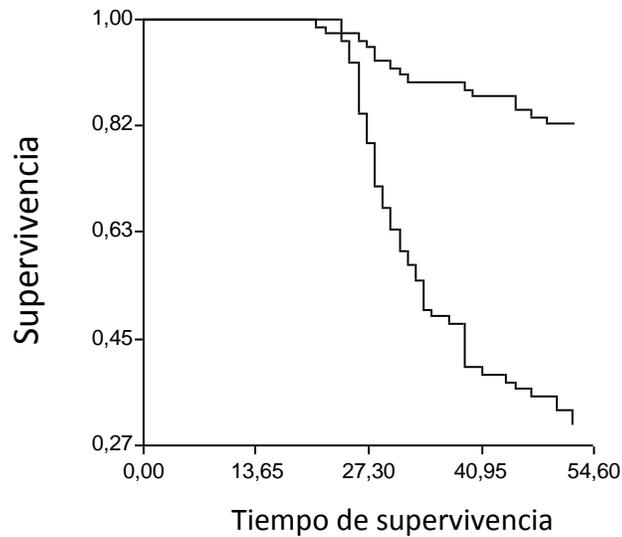
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=7,622 p=0,005765

Figura N° 52: Familias 15 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

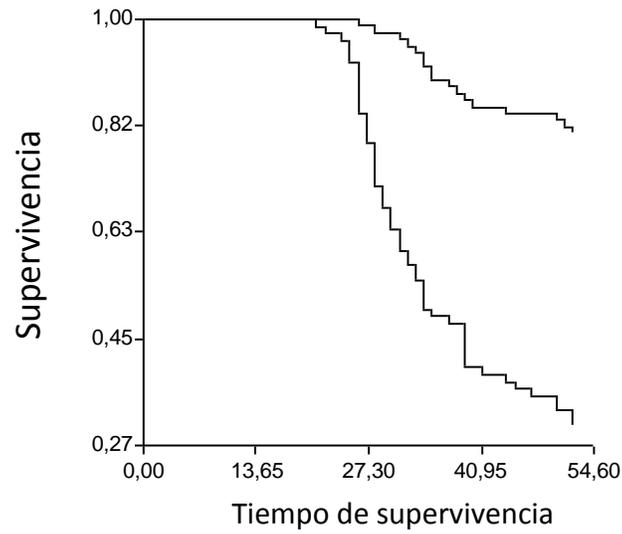
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=44,782 p=0,000000

Figura N° 53: Familias 16 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

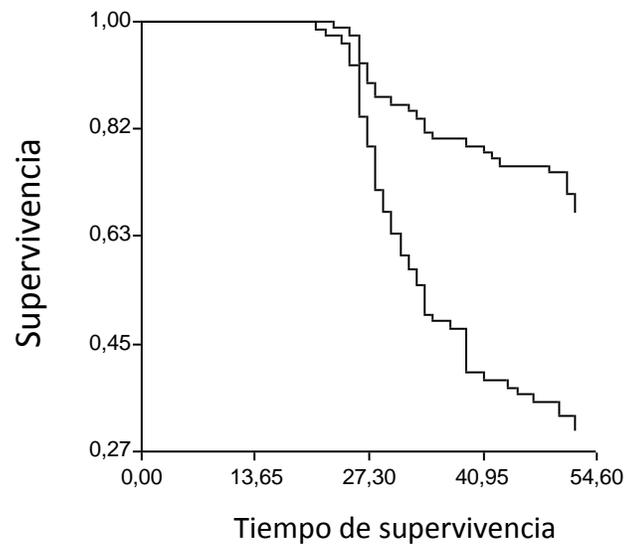
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=47,163 p=0,000000

Figura N° 54: Familias 17 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

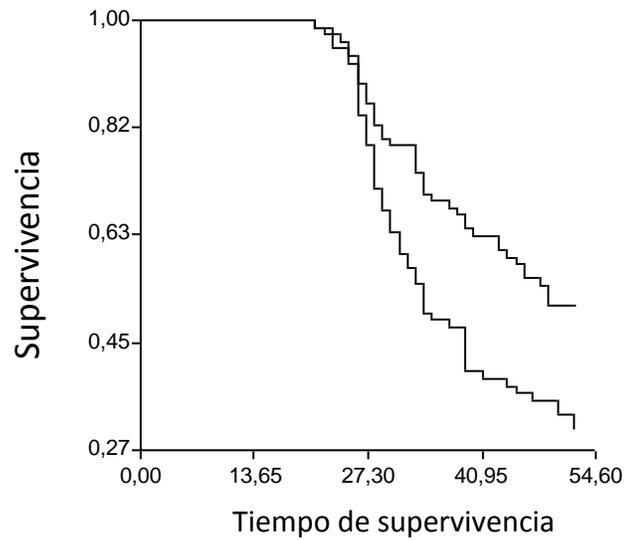
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=24,141 p=0,000001

Figura N° 55: Familias 18 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

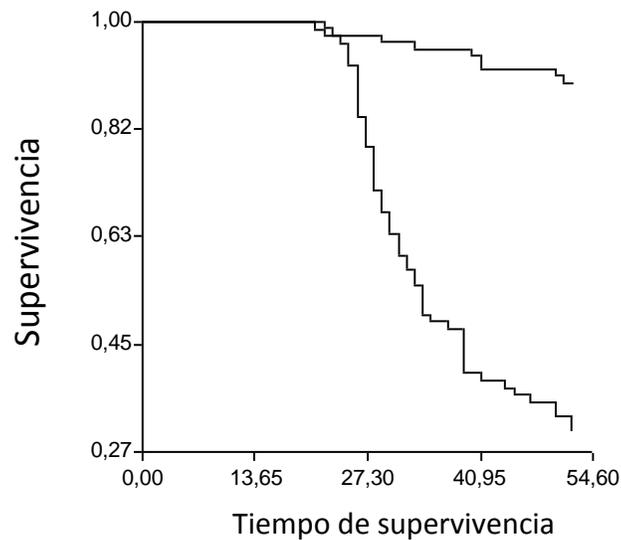
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=8,016 p=0,004637

Figura N° 56: Familias 19 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

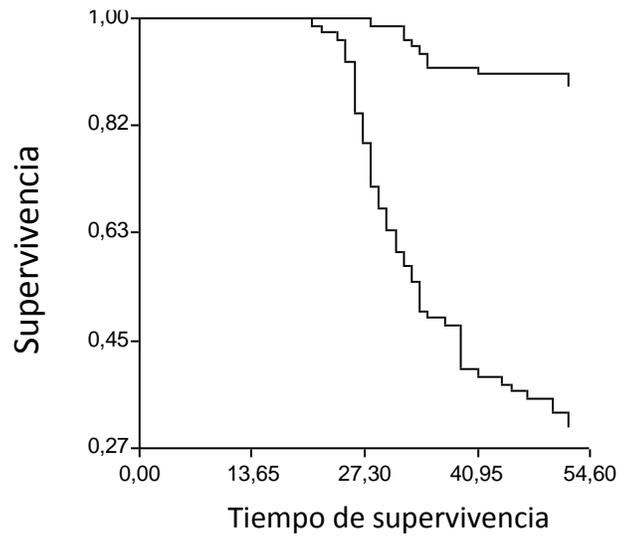
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=64,251 p=0,000000

Figura N° 57: Familias 20 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*.

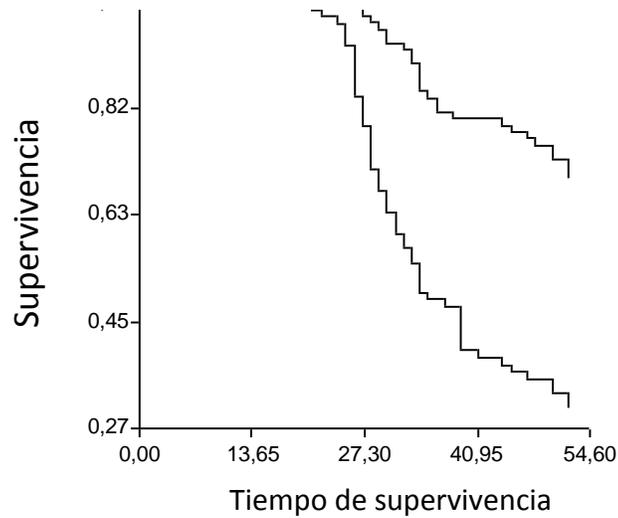
**Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)**



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=61,211 p=0,000000

Figura N° 58: Familias 21 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

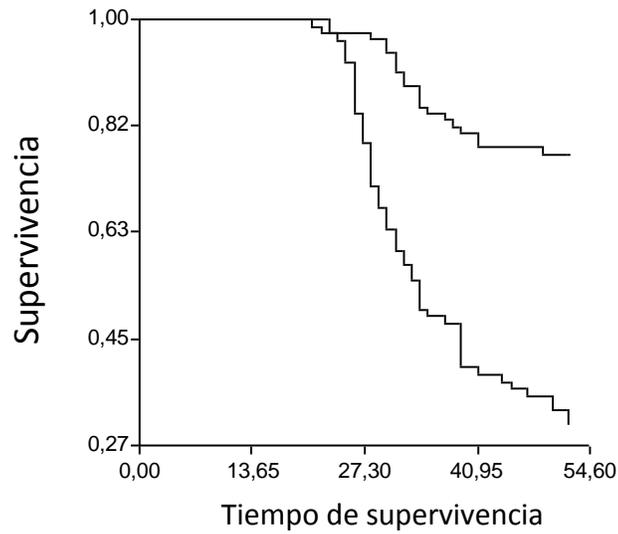
**Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)**



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=30,350 p=0,000000

Figura N° 59: Familias 22 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

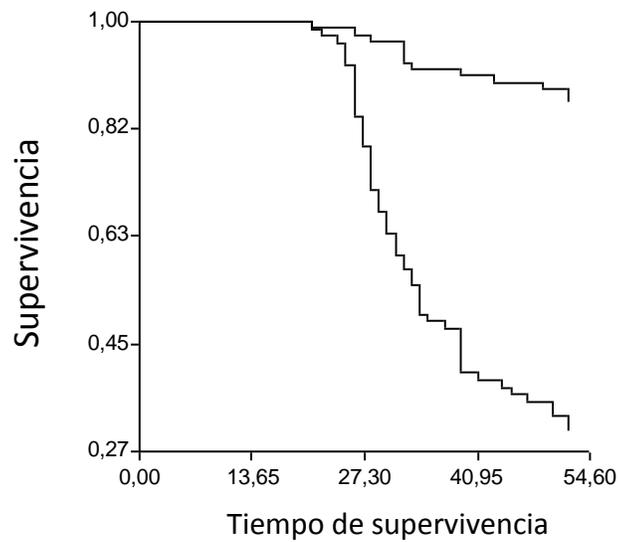
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=37,918 p=0,000000

Figura N° 60: Familias 23 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

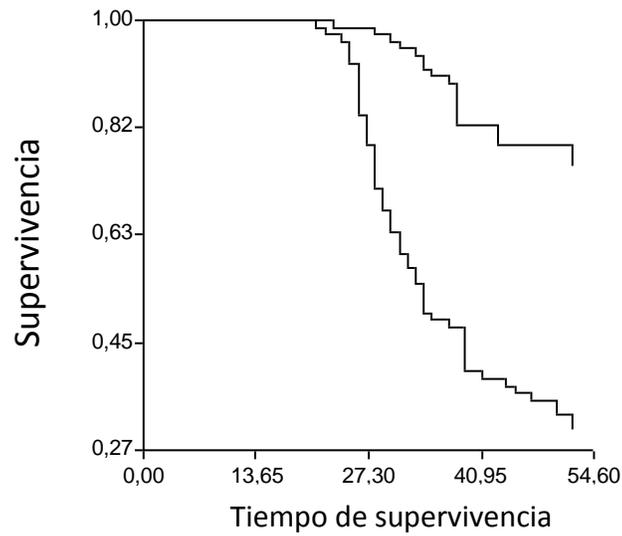
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=56,349 p=0,000000

Figura N° 61: Familias 24 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

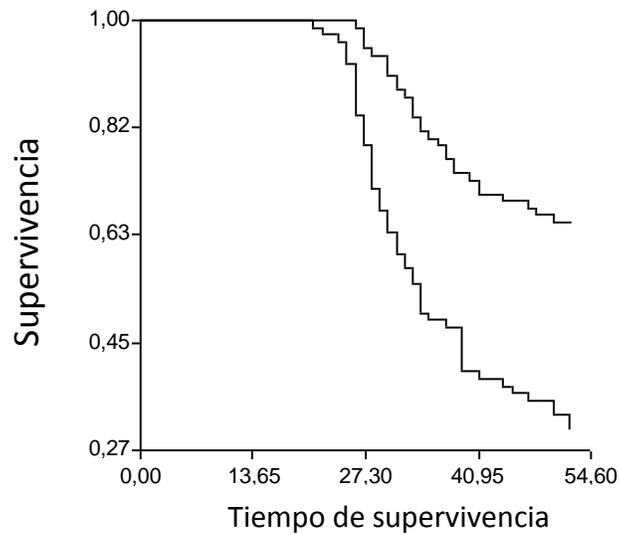
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=38,427 p=0,000000

Figura N° 62: Familias 25 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

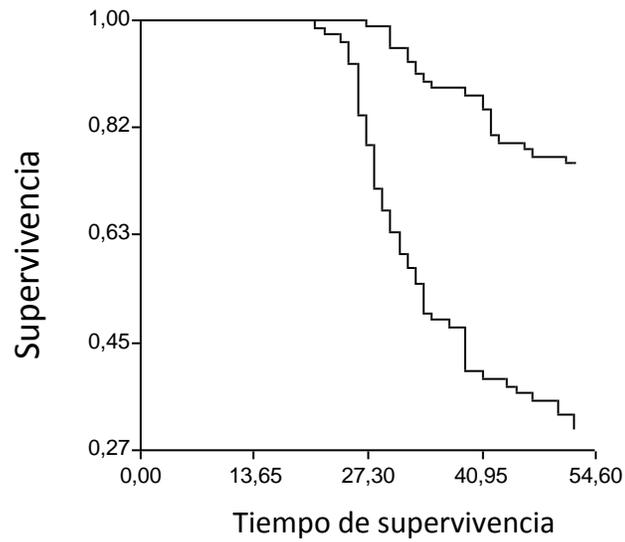
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=23,098 p=0,000002

Figura N° 63: Familias 26 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

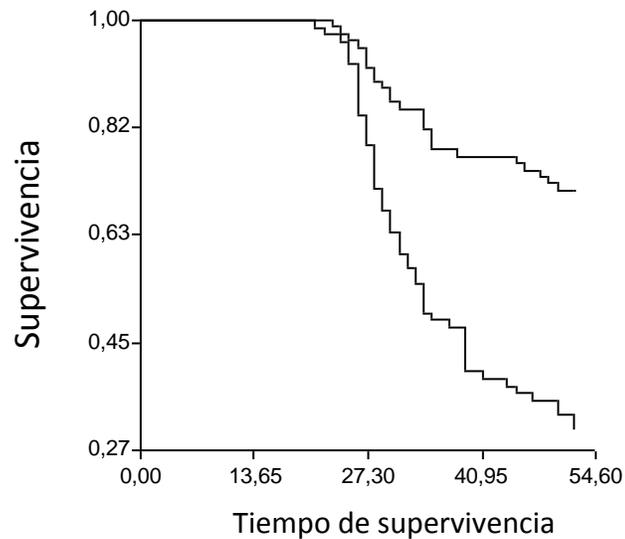
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=40,366 p=0,000000

Figura N° 64: Familias 27 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

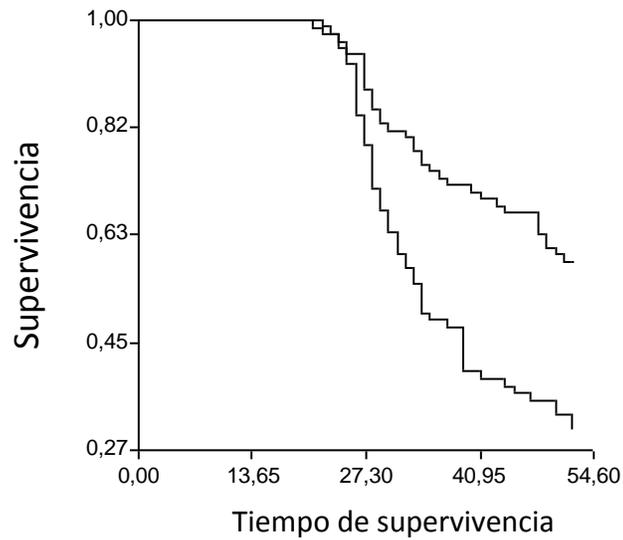
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=27,591 p=0,000000

Figura N° 65: Familias 28 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

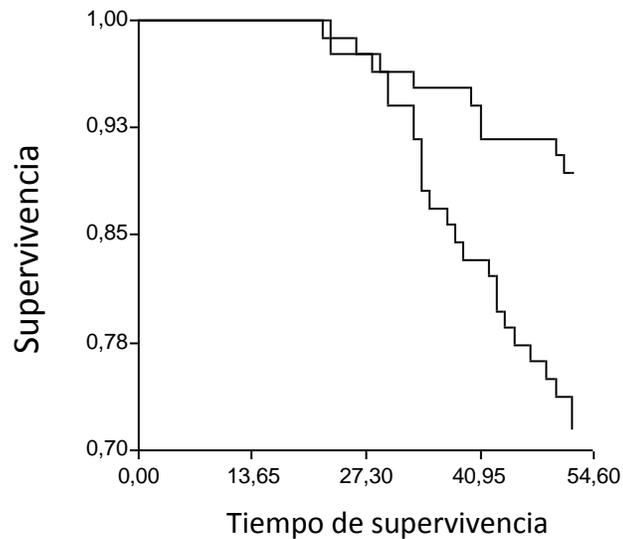
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=14,448 p=0,000144

Figura N° 66: Familias 29 y 6. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

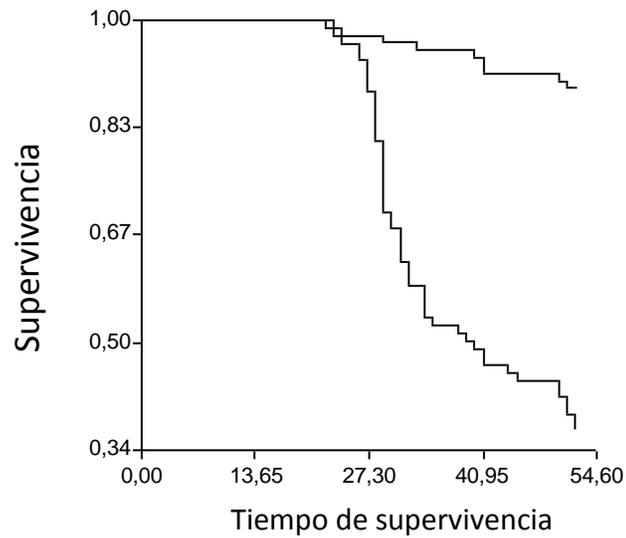
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=8,394 p=0,003766

Figura N° 67: Familias 1 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

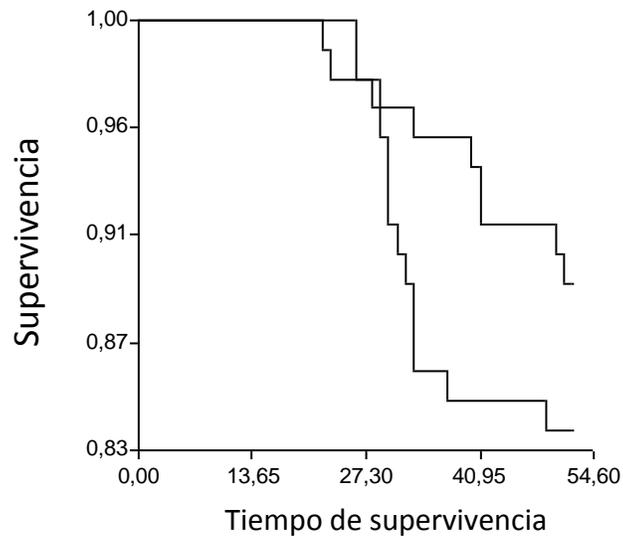
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=50,786 p=0,000000

Figura N° 68: Familias 2 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

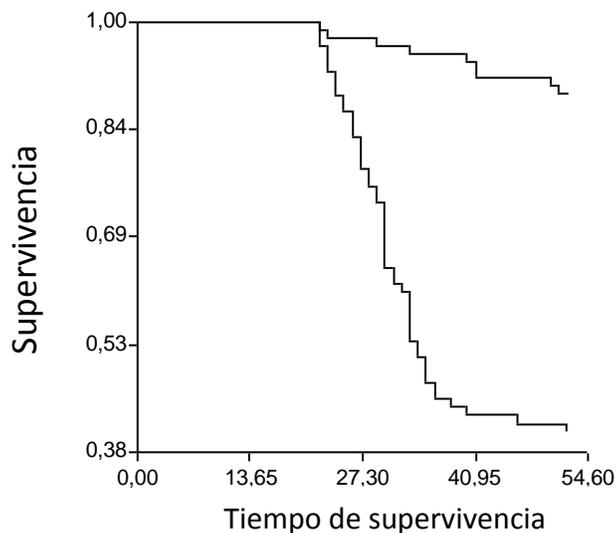
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=1,338 p=0,247410

Figura N° 69: Familias 3 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

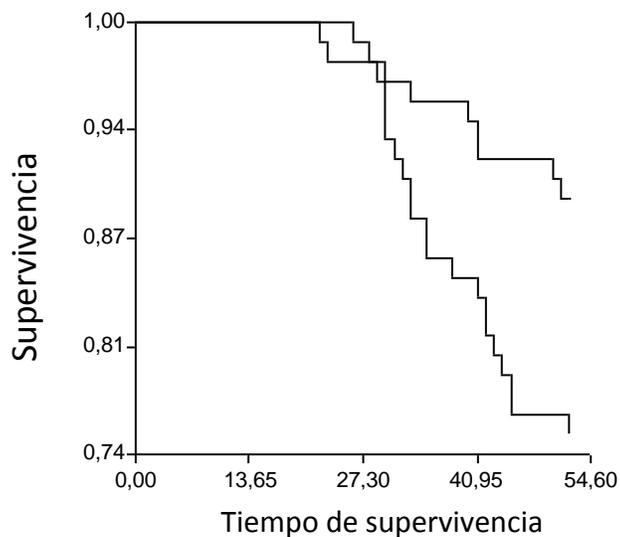
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=46,812 p=0,000000

Figura N° 70: Familias 4 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

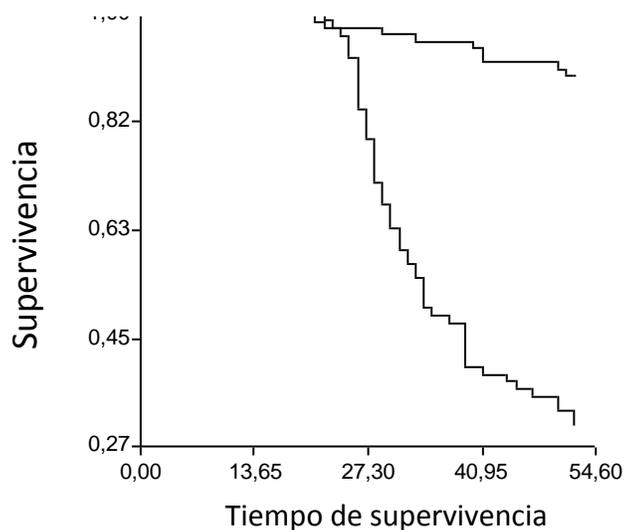
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=5,684 p=0,017122

Figura N° 71: Familias 5 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

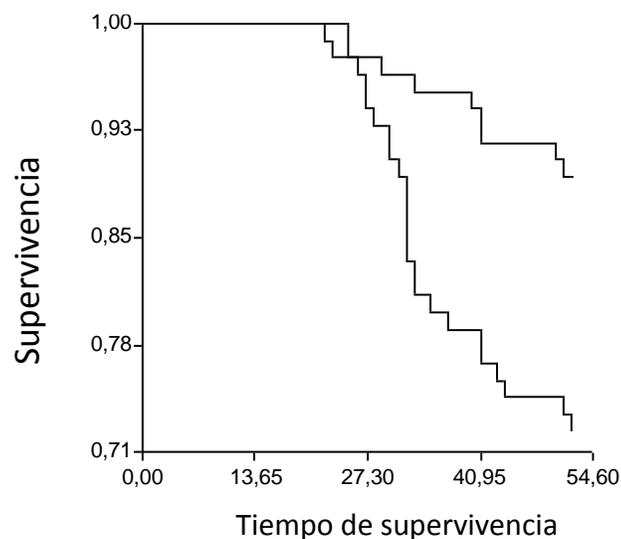
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=64,251 p=0,000000

Figura N° 72: Familias 6 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

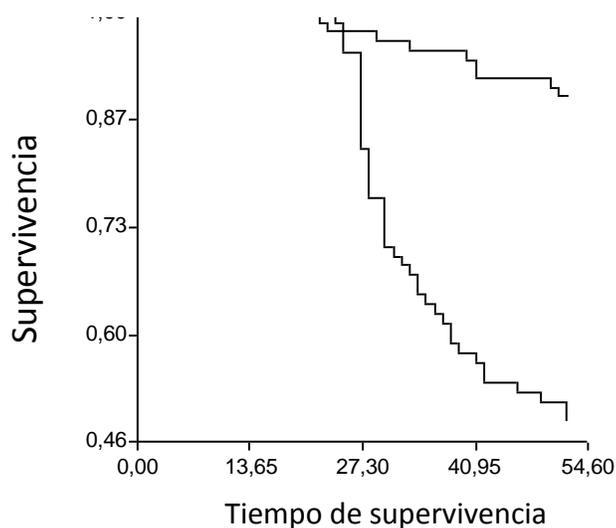
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=8,463 p=0,003624

Figura N° 73: Familias 7 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

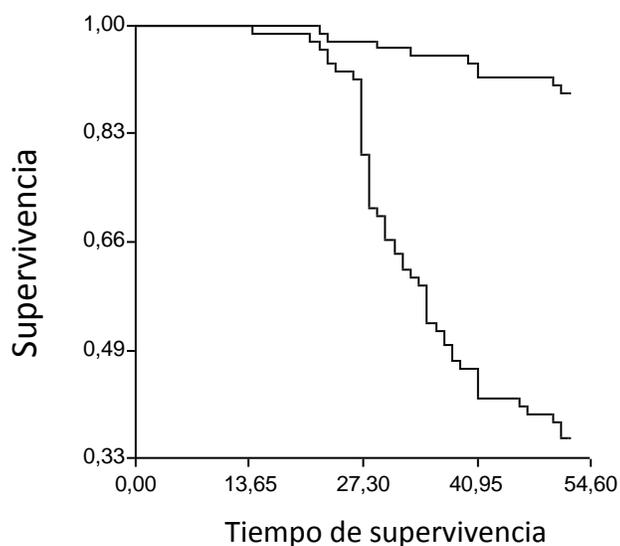
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=33,360 p=0,000000

Figura N° 74: Familias 8 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

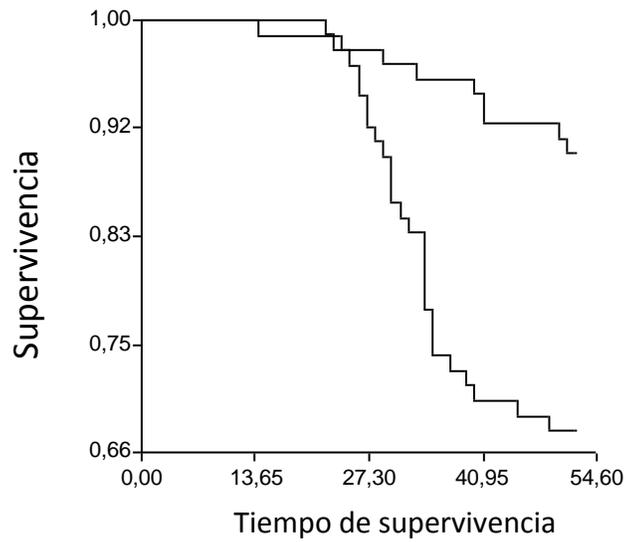
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=53,949 p=0,000000

Figura N° 75: Familias 9 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

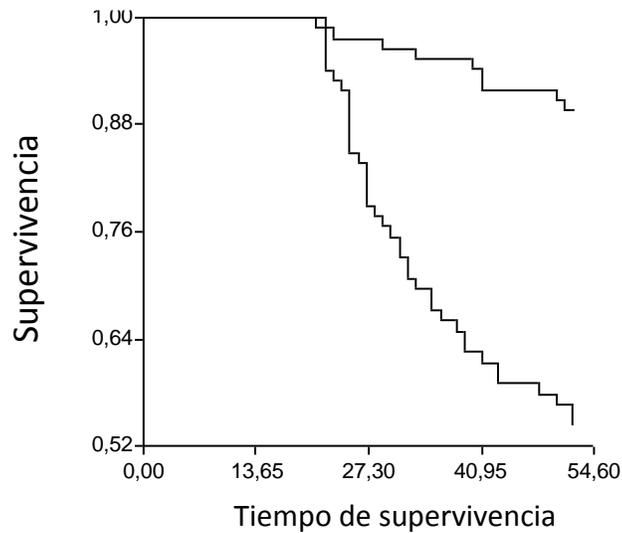
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=12,278 p=0,000458

Figura N° 76: Familias 10 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

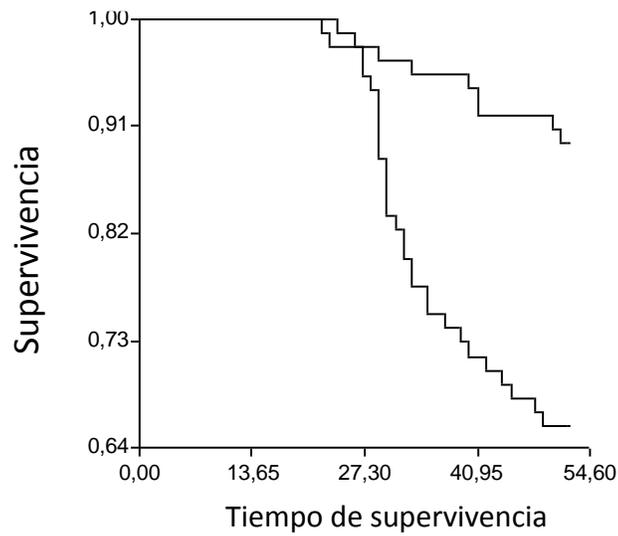
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=27,217 p=0,000000

Figura N° 77: Familias 11 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

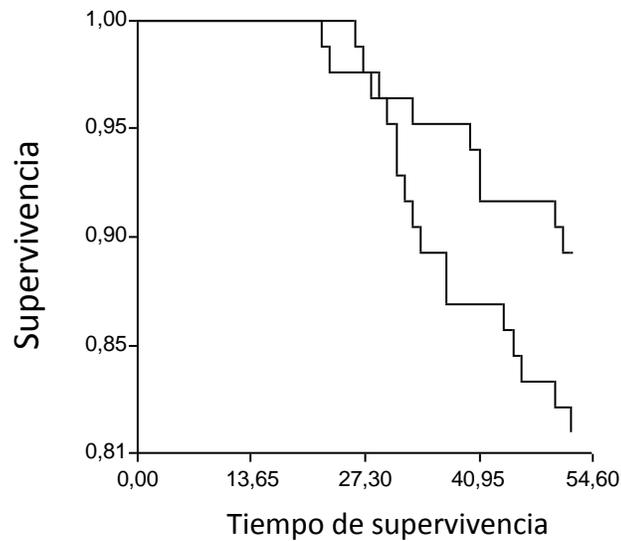
**Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)**



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=14,378 p=0,000150

Figura N° 78: Familias 12 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

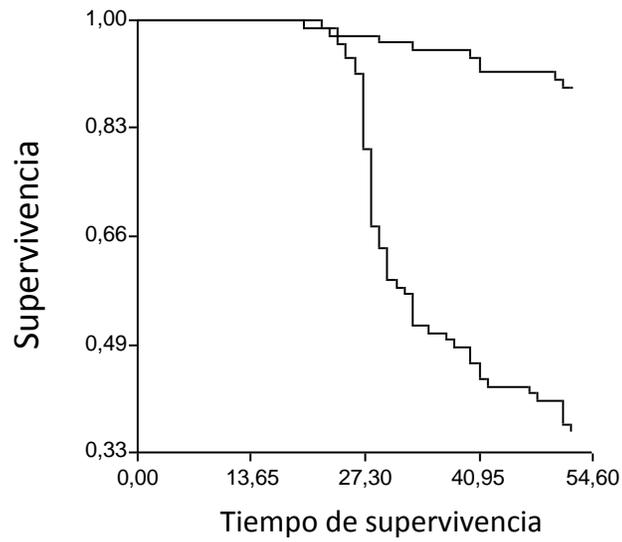
**Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)**



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=2,281 p=0,130943

Figura N° 79: Familias 13 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

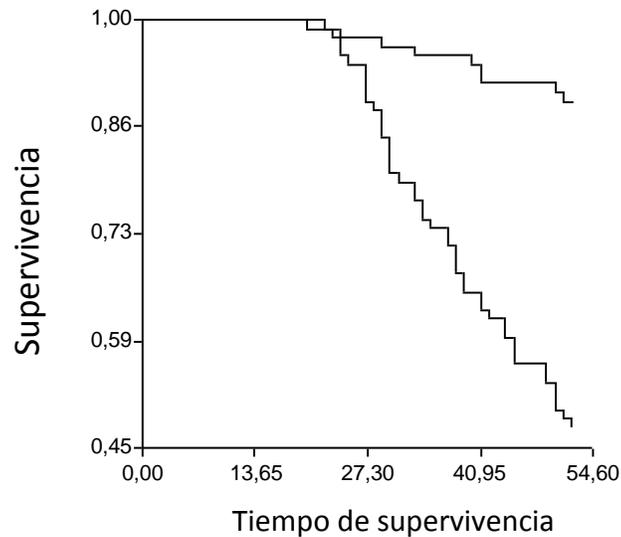
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=53,556 p=0,000000

Figura N° 80: Familias 14 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

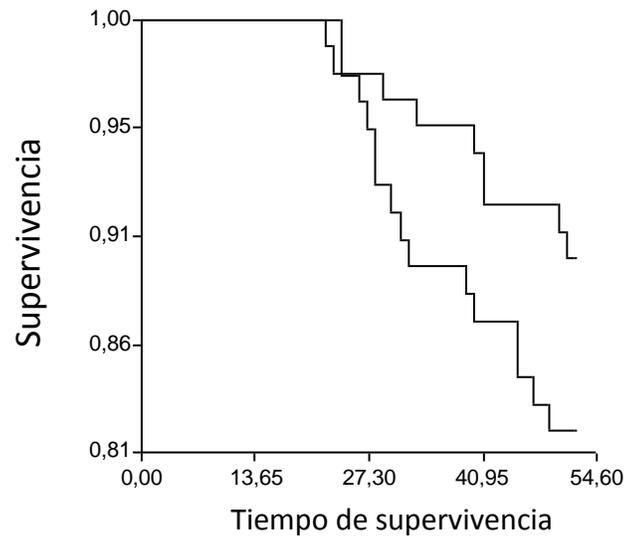
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=34,667 p=0,000000

Figura N° 81: Familias 15 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

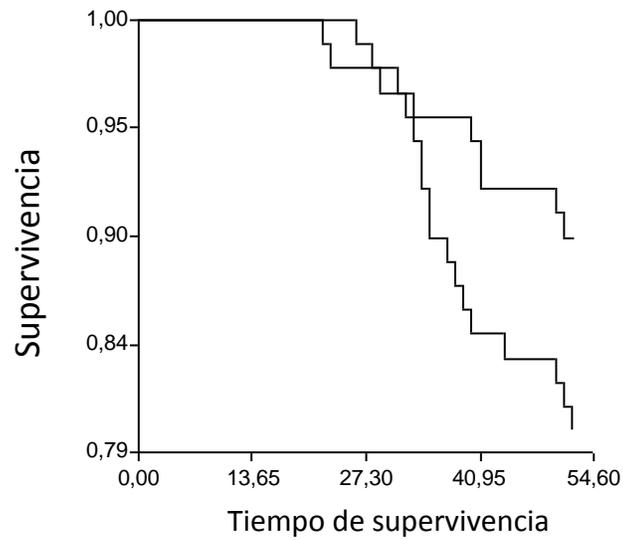
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=2,062 p=0,151055

Figura N° 82: Familias 16 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

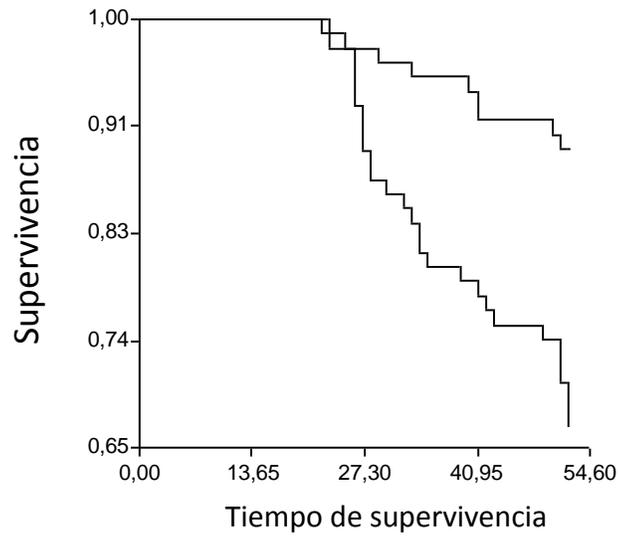
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=2,864 p=0,090596

Figura N° 83: Familias 17 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

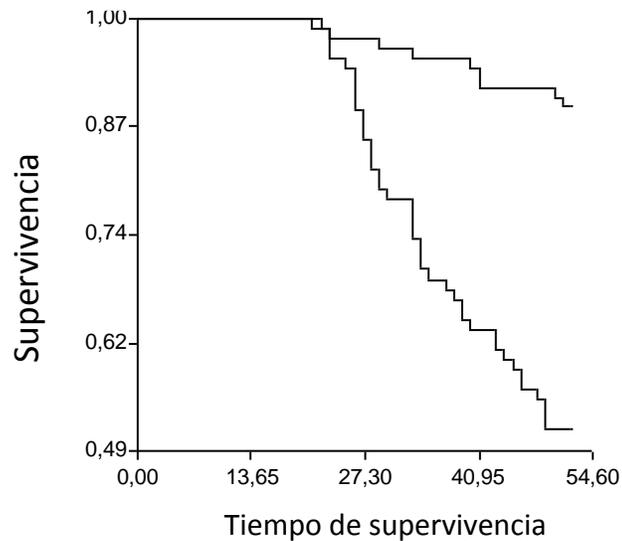
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=12,500 p=0,000407

Figura N° 84: Familias 18 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

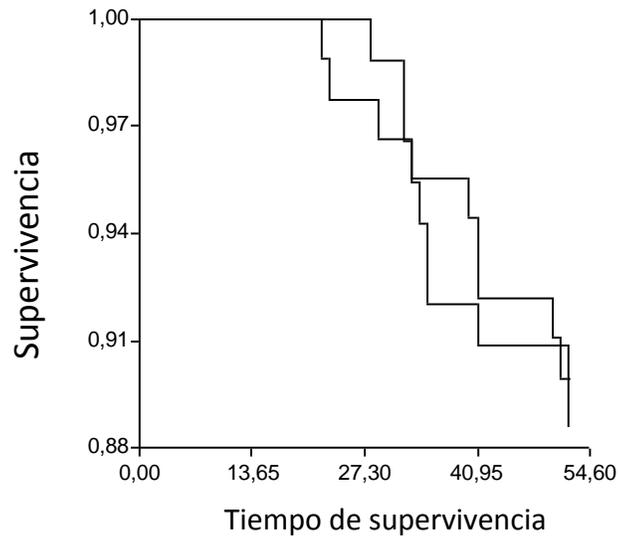
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=30,444 p=0,000000

Figura N° 85: Familias 19 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

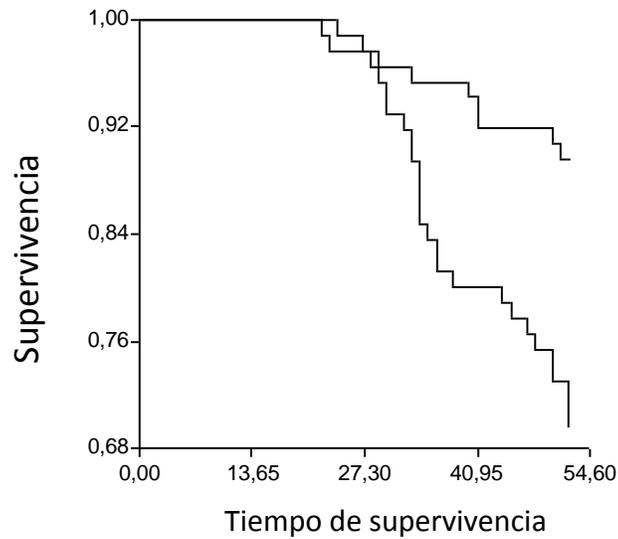
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=0,082 p=0,774185

Figura N° 86: Familias 21 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

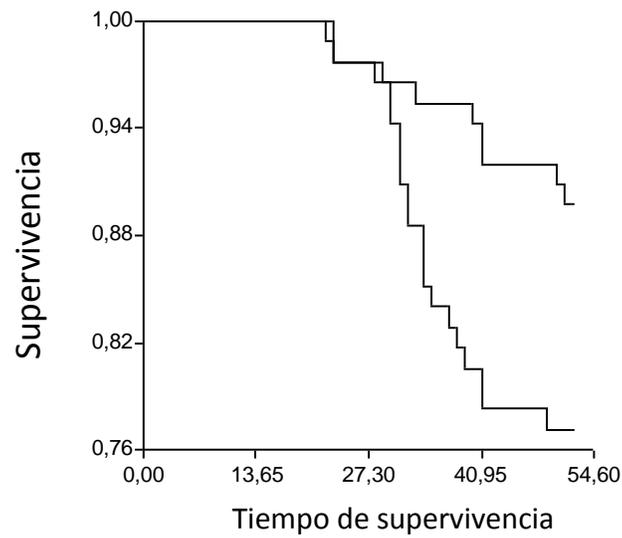
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=10,329 p=0,001309

Figura N° 87: Familias 22 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

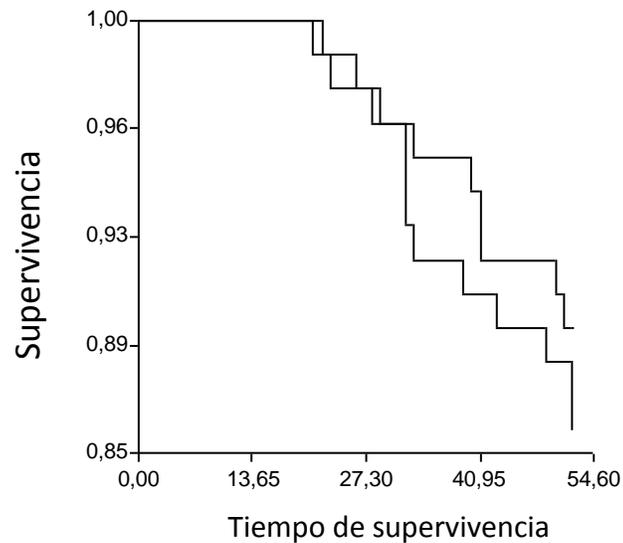
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=5,124 p=0,023594

Figura N° 88: Familias 23 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

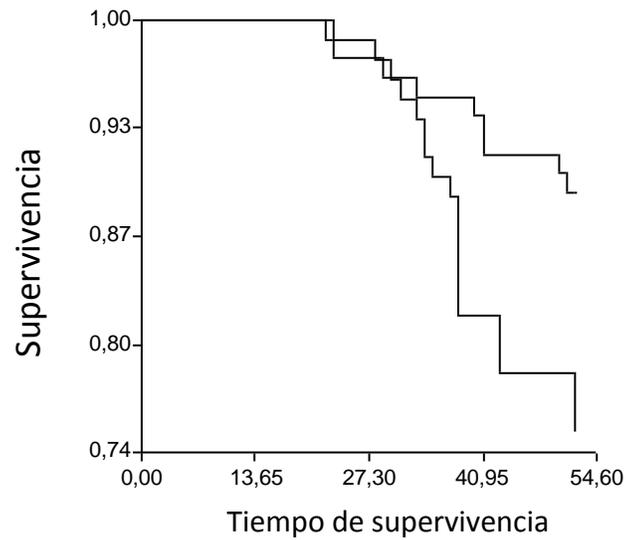
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=0,484 p=0,486517

Figura N° 89: Familias 24 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

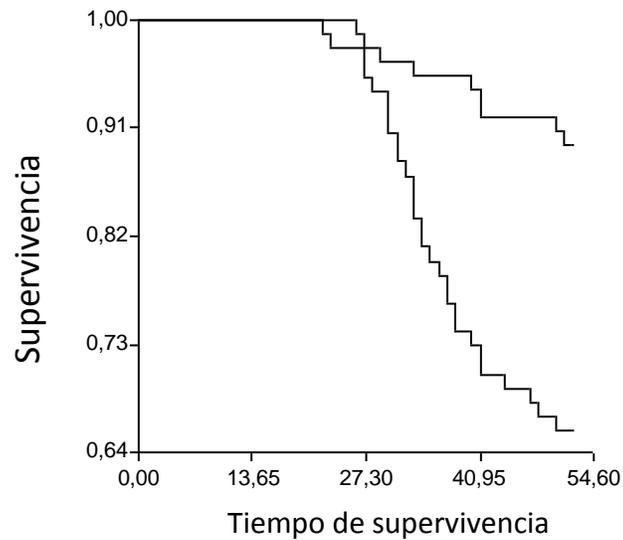
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=5,929 p=0,014896

Figura N° 90: Familias 25 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

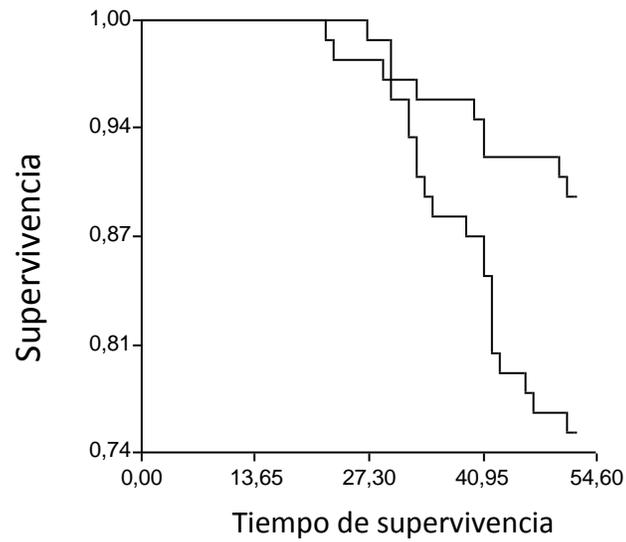
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=14,260 p=0,000159

Figura N° 91: Familias 26 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

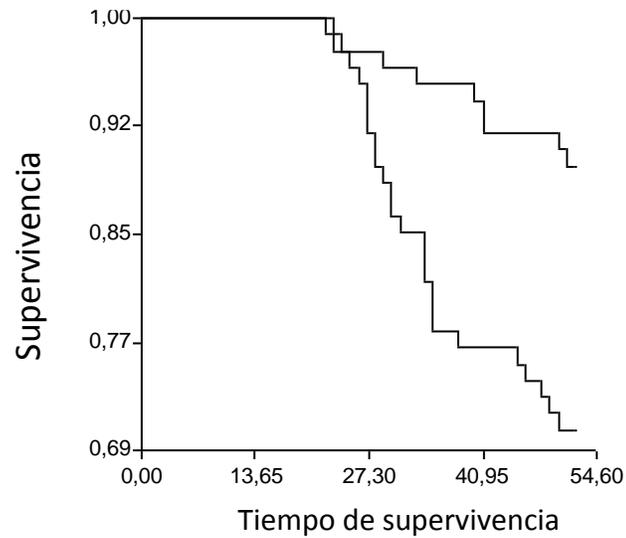
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=5,587 p=0,018097

Figura N° 92: Familias 27 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

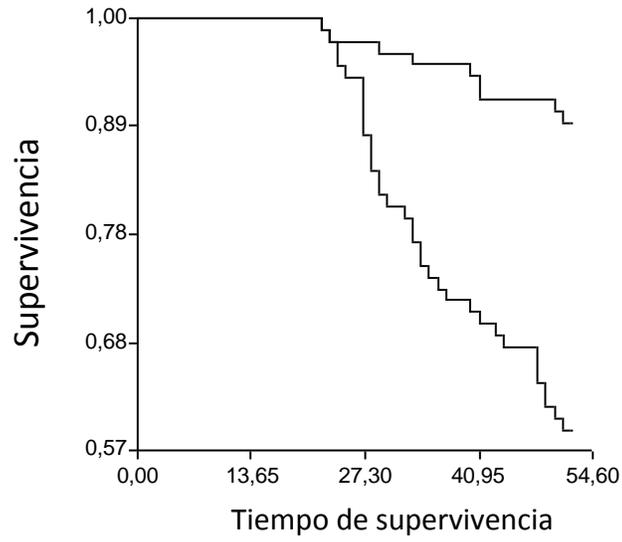
### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Logrank - Chi Cuadrado=9,534 p=0,002017

Figura N° 93: Familias 28 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

### Curvas de Supervivencia (Kaplan-Meier)



Prueba de Log-rank - Chi Cuadrado=21,203 p=0,000004

Figura N° 94: Familias 29 y 20. Comparación de curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de *Salmo salar* inoculados con *Piscirickettsia salmonis*

# **ANEXO 3**

### ANEXO 3

#### Datos sobre peso y talla de los peces.

La estadística descriptiva de estas dos variables se expone a continuación en las Tablas N° 5 y 6. Los resultados de los análisis de varianza, las comparaciones (Prueba de Tukey) y las correlaciones respectivas (Método de Pearson) se describen entre las Tablas N° 7 y la 11.

Tabla N° 5: Estadística descriptiva general de las variables peso y talla de *Salmo salar* registradas al momento de la inoculación.

<b>Variable</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>D.E.</b>	<b>CV</b>	<b>Mín</b>	<b>Máx</b>	<b>Mediana</b>
<b>PESO INOCULACIÓN</b>	2461	43,97	11,14	25,34	17,00	108,00	42,50
<b>TALLA INOCULACIÓN</b>	2461	15,70	1,24	7,93	12,00	21,00	15,60

Tabla N° 6: Estadística descriptiva por familia de las variables peso y talla de *Salmo salar*, registradas al momento de la inoculación.

<b>FAM</b>	<b>Variable</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>D.E.</b>	<b>CV</b>	<b>Mín</b>	<b>Máx</b>	<b>Mediana</b>
A	PESO INOCULACIÓN	85	42,40	8,69	20,49	26,00	72,00	41,00
A	TALLA INOCULACIÓN	85	15,56	1,02	6,54	13,50	18,20	15,50
B	PESO INOCULACIÓN	82	40,08	11,40	28,45	23,00	108,00	38,00
B	TALLA INOCULACIÓN	82	15,22	1,23	8,07	13,00	20,60	15,10
C	PESO INOCULACIÓN	86	49,24	10,24	20,80	29,00	73,00	47,50
C	TALLA INOCULACIÓN	86	16,14	1,07	6,66	14,00	18,50	16,00
CH	PESO INOCULACIÓN	84	45,39	9,19	20,25	29,00	70,00	44,00
CH	TALLA INOCULACIÓN	84	16,26	1,11	6,85	14,00	19,00	16,05
D	PESO INOCULACIÓN	86	37,26	8,10	21,73	23,00	65,00	36,00
D	TALLA INOCULACIÓN	86	15,01	0,92	6,10	13,50	17,50	15,00
E	PESO INOCULACIÓN	80	29,49	6,98	23,66	17,50	59,00	29,00
E	TALLA INOCULACIÓN	80	14,02	0,95	6,79	12,00	17,00	14,00
F	PESO INOCULACIÓN	87	44,18	9,35	21,16	29,00	68,00	43,00
F	TALLA INOCULACIÓN	87	15,91	1,03	6,48	14,00	18,20	16,00
G	PESO INOCULACIÓN	82	42,88	8,42	19,63	24,00	64,00	42,50
G	TALLA INOCULACIÓN	82	15,71	0,94	5,96	13,50	18,20	15,75

<b>FAM</b>	<b>Variable</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>D.E.</b>	<b>CV</b>	<b>Mín</b>	<b>Máx</b>	<b>Mediana</b>
<i>H</i>	PESO INOCULACIÓN	84	43,82	9,85	22,47	25,00	78,00	42,75
<i>H</i>	TALLA INOCULACIÓN	84	15,79	1,08	6,81	13,20	19,00	16,00
<i>I</i>	PESO INOCULACIÓN	84	41,36	7,81	18,89	26,00	63,00	40,00
<i>I</i>	TALLA INOCULACIÓN	84	15,26	0,84	5,53	13,50	17,00	15,20
<i>J</i>	PESO INOCULACIÓN	85	44,21	8,37	18,92	27,00	77,00	43,00
<i>J</i>	TALLA INOCULACIÓN	85	15,76	1,04	6,62	13,50	19,00	15,70
<i>K</i>	PESO INOCULACIÓN	86	45,04	7,97	17,69	30,00	62,00	45,00
<i>K</i>	TALLA INOCULACIÓN	86	15,89	0,96	6,06	13,50	18,20	16,00
<i>L</i>	PESO INOCULACIÓN	86	42,74	8,56	20,02	24,00	66,00	42,00
<i>L</i>	TALLA INOCULACIÓN	86	15,56	0,97	6,22	12,50	18,00	15,50
<i>LL</i>	PESO INOCULACIÓN	85	44,96	9,44	21,01	28,00	70,00	43,50
<i>LL</i>	TALLA INOCULACIÓN	85	15,89	0,94	5,95	13,90	18,00	16,00
<i>M</i>	PESO INOCULACIÓN	86	38,88	8,37	21,54	23,00	65,00	38,00
<i>M</i>	TALLA INOCULACIÓN	86	15,21	0,92	6,04	13,50	18,00	15,20
<i>N</i>	PESO INOCULACIÓN	84	45,31	7,55	16,66	29,00	64,00	45,00
<i>N</i>	TALLA INOCULACIÓN	84	15,85	0,97	6,14	13,50	18,50	16,00
<i>Ñ</i>	PESO INOCULACIÓN	86	34,47	6,54	18,98	24,00	54,00	33,00
<i>Ñ</i>	TALLA INOCULACIÓN	86	14,93	1,10	7,40	12,50	18,20	14,75

<b>FAM</b>	<b>Variable</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>D.E.</b>	<b>CV</b>	<b>Mín</b>	<b>Máx</b>	<b>Mediana</b>
O	PESO INOCULACIÓN	85	46,59	11,14	23,91	27,00	84,00	46,00
O	TALLA INOCULACIÓN	85	15,98	1,22	7,63	14,00	19,20	16,00
P	PESO INOCULACIÓN	85	50,16	9,71	19,35	31,00	79,00	50,00
P	TALLA INOCULACIÓN	85	16,09	0,94	5,86	14,00	18,20	16,00
Q	PESO INOCULACIÓN	86	43,69	6,64	15,21	29,00	66,00	43,50
Q	TALLA INOCULACIÓN	86	15,81	0,86	5,43	14,00	19,00	15,90
R	PESO INOCULACIÓN	84	48,36	8,95	18,51	30,00	75,00	48,00
R	TALLA INOCULACIÓN	84	15,98	1,23	7,69	12,70	19,00	16,20
S	PESO INOCULACIÓN	85	53,31	12,63	23,69	29,00	86,00	54,00
S	TALLA INOCULACIÓN	85	16,52	1,44	8,70	13,00	19,00	16,50
T	PESO INOCULACIÓN	86	35,65	8,03	22,53	21,00	69,00	36,00
T	TALLA INOCULACIÓN	86	14,88	1,20	8,07	12,20	17,70	15,00
U	PESO INOCULACIÓN	86	37,62	6,82	18,14	22,00	56,00	36,50
U	TALLA INOCULACIÓN	86	15,31	1,08	7,03	13,20	17,80	15,20
V	PESO INOCULACIÓN	84	51,27	10,02	19,54	30,00	78,00	50,00
V	TALLA INOCULACIÓN	84	16,33	1,10	6,71	13,50	19,70	16,20
W	PESO INOCULACIÓN	84	52,40	9,32	17,78	38,00	78,00	52,00
W	TALLA INOCULACIÓN	84	16,34	1,16	7,11	14,00	19,60	16,35

<b>FAM</b>	<b>Variable</b>	<b>n</b>	<b>Media</b>	<b>D.E.</b>	<b>CV</b>	<b>Mín</b>	<b>Máx</b>	<b>Mediana</b>
X	PESO INOCULACIÓN	86	37,27	6,28	16,85	21,00	56,00	37,00
X	TALLA INOCULACIÓN	86	14,83	0,94	6,36	12,90	18,50	14,80
Y	PESO INOCULACIÓN	86	43,19	7,13	16,51	27,00	58,00	44,00
Y	TALLA INOCULACIÓN	86	15,57	1,00	6,39	12,50	18,50	15,70
Z	PESO INOCULACIÓN	86	63,44	14,42	22,73	17,00	95,00	64,50
Z	TALLA INOCULACIÓN	86	17,45	1,60	9,19	12,00	21,00	17,50

Tabla N° 7: Análisis de varianza de la variable peso, registrada al momento de la inoculación, entre familias de *Salmo salar*.

<b>Variable</b>	<b>N</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup> Aj</b>	<b>CV</b>
<b>PESO INOCULACIÓN</b>	2461	0,34	0,34	20,64

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Modelo</b>	105074,98	28	3752,68	45,55	<0,0001
<b>FAM</b>	105074,98	28	3752,68	45,55	<0,0001
<b>Error</b>	200365,83	2432	82,39		
<b>Total</b>	305440,81	2460			

Tabla N° 8: Comparación de la variable peso, registrada al momento de la inoculación, entre familias de *Salmo salar*.

Prueba de Tukey Alfa:=0,05 DMS:=5,37234

Error: 82,3873 gl: 2432

<b>FAM</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>				
<i>E</i>	29,49	80	A			
<i>Ñ</i>	34,47	86	A	B		
<i>T</i>	35,65	86		B	C	
<i>D</i>	37,26	86		B	C	D
<i>X</i>	37,27	86		B	C	D
<b>FAM</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>				

<i>U</i>	37,62	86	B	C	D	E												
<i>M</i>	38,88	86	B	C	D	E	F											
<i>B</i>	40,08	82		C	D	E	F	G										
<i>I</i>	41,36	84			D	E	F	G	H									
<i>A</i>	42,40	85			D	E	F	G	H									
<i>L</i>	42,74	86				E	F	G	H									
<i>G</i>	42,88	82				E	F	G	H									
<i>Y</i>	43,19	86					F	G	H	I								
<i>Q</i>	43,69	86					F	G	H	I								
<i>H</i>	43,82	84					F	G	H	I								
<i>F</i>	44,18	87					F	G	H	I	J							
<i>J</i>	44,21	85					F	G	H	I	J							
<i>LL</i>	44,96	85						G	H	I	J	K						
<i>K</i>	45,04	86						G	H	I	J	K						
<i>N</i>	45,31	84						G	H	I	J	K						
<i>CH</i>	45,39	84						G	H	I	J	K						
<i>O</i>	46,59	85							H	I	J	K	L					
<i>R</i>	48,36	84								I	J	K	L	M				
<i>C</i>	49,24	86									J	K	L	M				
<b>FAM</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>	<hr/>															
<i>P</i>	50,16	85													K	L	M	

V	51,27	84	L	M
W	52,40	84		M
S	53,31	85		M
Z	63,44	86		N

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Tabla N° 9: Análisis de varianza de la variable talla, registrada al momento de la inoculación, entre familias de *Salmo salar*.

<b>Variable</b>	<b>N</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup> Aj</b>	<b>CV</b>
<b>TALLA INOCULACIÓN</b>	2461	0,26	0,25	6,86

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Modelo</b>	986,05	28	35,22	30,35	<0,0001
<b>FAM</b>	986,05	28	35,22	30,35	<0,0001
<b>Error</b>	2821,67	2432	1,16		
<b>Total</b>	3807,72	2460			

Tabla N° 10: Comparación de la variable talla, registrada al momento de la inoculación, entre familias de *Salmo salar*.

Prueba de Tukey Alfa:=0,05 DMS:=0,63754

Error: 1,1602 gl: 2432

<b>FAM</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>			
E	14,02	80	A		
X	14,83	86		B	
T	14,88	86		B	
Ñ	14,93	86		B	C

<b>FAM</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>													
<i>D</i>	15,01	86	B	C	D										
<i>M</i>	15,21	86	B	C	D	E									
<i>B</i>	15,22	82	B	C	D	E									
<i>I</i>	15,26	84	B	C	D	E	F								
<i>U</i>	15,31	86	B	C	D	E	F	G							
<i>A</i>	15,56	85		C	D	E	F	G	H						
<i>L</i>	15,56	86		C	D	E	F	G	H						
<i>Y</i>	15,57	86			D	E	F	G	H						
<i>G</i>	15,71	82				E	F	G	H	I					
<i>J</i>	15,76	85				E	F	G	H	I					
<i>H</i>	15,79	84				E	F	G	H	I					
<i>Q</i>	15,81	86				E	F	G	H	I					
<i>N</i>	15,85	84				E	F	G	H	I					
<i>K</i>	15,89	86					F	G	H	I	J				
<i>LL</i>	15,89	85					F	G	H	I	J				
<i>F</i>	15,91	87						G	H	I	J				
<i>O</i>	15,98	85							H	I	J				
<i>R</i>	15,98	84							H	I	J				
<i>P</i>	16,09	85							H	I	J				

<b>FAM</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>			
<i>C</i>	16,14	86		H	I J
<i>CH</i>	16,26	84			I J
<i>V</i>	16,33	84			I J
<i>W</i>	16,34	84			I J
<i>S</i>	16,52	85			J
<i>Z</i>	17,45	86			K

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Tabla N° 11: Coeficientes de correlación (Pearson) entre las variables mortalidad acumulada, peso y talla de los peces.

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	<b>Mortalidad (%)</b>	<b>Peso promedio</b>	<b>Talla</b>
<b>Mortalidad (%)</b>	1,00	0,72	0,72
<b>Peso promedio</b>	-0,07	1,00	0,00
<b>Talla</b>	-0,07	0,97	1,00