



Efectos de la calidad, robustez y bienestar de smolts en la resistencia al desafío con *Piscirickettsia* *salmonis* - Informe Final

ID Propuesta PGSA FIE 201708070146

Contenido

Resumen ejecutivo.....	4
Resumen ejecutivo.....	4
Executive summary	6
AVS Chile – VESO Chile	9
A. Generalidades	9
B. Características del sistema en CIC.....	10
C. Sala VESO.....	12
Marco teórico.....	13
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos.....	15
Actividades realizadas en el marco del Informe de Avance N°1	16
A. Contacto colaboradores.....	16
B. Peces	16
C. Habilitación del sistema	17
Actividades realizadas en el marco del Informe de Avance N°2.....	20
A. Habilitación final del sistema	20
.....	22
B. Peces – Etapa Ejercitación.....	22
Resultados y Discusión	30
Desafío por modelo de cohabitación con <i>P. salmonis</i>	42
Conclusiones - Objetivos 1-2 y Actividades relacionadas	46
Análisis costo-beneficio.....	48
Referencias.....	70
Anexos.....	73

Desarrollado por VESO Chile en el marco del Proyecto FIE Sernapesca 201708070146 "Efectos de la calidad, robustez bienestar de smolts en la resistencia al desafío con *Piscirickettsia salmonis*", **financiado con** aportes del Fondo de Inversión Estratégica del Ministerio de Economía Fomento y Turismo, Gobierno de Chile. Diciembre 2018.

Efectos de calidad, robustez y bienestar de smolts en la resistencia al desafío con *Piscirickettsia salmonis*

Resumen ejecutivo

Resumen ejecutivo

El proyecto se propuso realizar los análisis necesarios para esclarecer los efectos que tiene un smolt de robustez y calidad en la resistencia a una enfermedad infecciosa de elevado impacto sanitario y productivo en la industria salmonicultora chilena, como lo es la piscirickettsiosis (SRS). A nivel de industria de salmón del Atlántico, existen mortalidades de alrededor de un 1 a 2% mensual de la población total de peces post transferencia a mar. De esto, y durante el primer semestre del 2018, un 19,6%, 24,8% y 7,1% se debe a enfermedades infecciosas en salmón del Atlántico, trucha arcoíris y salmón coho, respectivamente. De estas la principal causa infecciosa en salmón del Atlántico y trucha arcoíris es el SRS causado por la bacteria *Piscirickettsia salmonis*, que da cuenta de la mortalidad en un 67,9% y 92,9% respectivamente.

En este escenario, el producir smolts de calidad y robustos se ha transformado en un claro desafío para la industria productora de salmónidos a nivel mundial. Lograr una alta robustez en un *batch* de smolts es una tarea que abarca todo el proceso de producción en agua dulce, desde la cepa que se decide sembrar, pasando por los manejos, el ambiente de cultivo, el alimento utilizado y las estrategias de esmoltificación. Últimamente han surgido numerosos estudios científicos en los cuales se concluye que salmones de cultivo con una buena capacidad cardíaca tendrían una mayor robustez. Esto se ha logrado, a nivel experimental, sometiendo a los peces a condiciones de ejercicio mediante nado en los estanques a velocidades de agua consideradas como óptimas. Para esto es necesario ajustar la entrada de agua a los estanques logrando una mayor velocidad de ésta; los peces se ejercitarán al intentar mantener su posición dentro del estanque mediante nado activo. El nado sostenido a velocidades óptimas ha demostrado incidir en una hipertrofia cardíaca, mejorando el rendimiento del corazón, aumentando la capacidad aeróbica del músculo esquelético y la capacidad de transporte y extracción de oxígeno en los músculos; todo lo anterior asociado además a una mayor resistencia a enfermedades infecciosas, a menores niveles de estrés, los niveles de agresividad entre los peces disminuyen, mejora el crecimiento corporal mediante un aumento del apetito y se observa una mayor eficiencia de conversión alimenticia, promueve la ventilación tipo RAM (ventilación branquial pasiva que ahorra energía), aumenta la secreción de la hormona del crecimiento y mejora la calidad ósea, entre otros beneficios.

En este Informe Final se reporta la totalidad de actividades realizadas en el proyecto incluyendo aquellas ya reportadas en los informes de avance N1 y N2. Se comienza con la habilitación del sistema de estanques y las pruebas necesarias para el ajuste de ajuste de las velocidades de agua y nado en ambos grupos. Durante este proceso, se realizó el muestreo basal (S1) enfocado a evaluar la condición inicial de la población origen. Una vez ajustado el sistema, se realizó la constitución de los grupos a evaluar: Grupo Control y Grupo Ejercicio,

dándose inicio a la etapa experimental de ejercicio la cual tuvo una duración de 11 semanas. Los grupos fueron monitoreados y tratados bajo estándares productivos en cuanto a monitoreo de peso y chequeo de proceso de esmoltificación (muestreo S2). Previo al desafío, se realizó el muestreo S3 consistente en una evaluación externa e interna de parámetros de salud y bienestar, así como también marcadores plasmáticos, histológicos y moleculares. Entre los hallazgos más interesantes al final de la etapa de ejercicio, y previo al desafío contra *P. salmonis*, se destaca la mayor ganancia de peso del grupo ejercitado en comparación al grupo control (4%). El estado de salud de ambos grupos se encontró óptimo, mientras que el estado de aletas fue mejor en el grupo ejercitado sugiriendo un mejor nivel de bienestar. En análisis por RT-PCR el grupo ejercitado mostró niveles de expresión de genes significativamente más elevados los cuales se relacionan a procesos de inmunidad celular. En concordancia a esto último, los análisis realizados con microarreglos mostraron un notable efecto del ejercicio en la expresión génica a nivel cardiaco. Estos análisis realizados en Nofima, Noruega, indican que hubo 522 genes expresados de manera diferencial entre Control y Ejercicio, y que estos se agrupan en una serie de grupos funcionales, es decir, mecanismos completos (y no sólo genes aislados) fueron estimulados por el ejercicio incluyendo aquellos involucrados en procesos celulares, metabólicos e inmunes, entre otros. En contraste a las respuestas mal-adaptativas de gran magnitud, las respuestas más moderadas de los procesos mencionados son reconocidas como evidencia de una positiva respuesta de los tejidos en su proceso de aclimatación a cambios ambientales (en este caso, mayor velocidad del agua forzando un nado ejercicio activo). En contraste, y si bien el ejercicio motivó la expresión diferencial de algunos genes en riñón anterior, estos fueron aislados y no agrupables de manera relevante a mecanismos celulares. En concordancia, el ejercicio estimuló tejidos más sanos (branquias e hígado). Con estos resultados, se concluye que logramos generar un mejor nivel de bienestar y robustez mediante el ejercicio en salmón del Atlántico durante la fase de cultivo en agua dulce.

Para el desafío por cohabitación con *P. salmonis*, los peces de ambos grupos fueron marcados y luego desafiados juntos en un mismo estanque de 4m³. Los peces *shedders* o troyanos fueron peces externos (no pertenecientes a ninguno de los dos grupos estudiados). La cohabitación se extendió por un periodo de 62 días, dándose por terminado una vez que las curvas de mortalidad de ambos grupos mostraban una variación mínima y con una mortalidad acumulada de 73%. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados en relación a su sobrevivencia durante el desafío, lo que demuestra que, al menos bajo las condiciones utilizadas, el ejercicio no habría otorgado al grupo experimental una robustez tal que les permitiera sortear de mejor manera la enfermedad SRS en comparación a los peces no ejercitados (Control). Durante el desafío se llevaron a cabo tres muestreos: S4 durante la etapa catalogada como de respuesta temprana frente a la enfermedad; S5 durante la etapa de respuesta tardía y S6 realizado en peces sobrevivientes al ensayo. En el muestreo S4, el único hallazgo relevante fue que el *Health Assessemnt Index* fue significativamente más alto ("peor") en el grupo ejercitado en comparación al control. Los resultados de lo microarreglos señalan que no hubo diferencias entre los grupos en el transcriptoma del riñón anterior durante la respuesta temprana. No obstante, sí se observó como era de esperarse una radical respuesta transcriptómica entre el muestreo previo (S3, post ejercicio) y este producto de la infección con *P. salmonis*, resultando en más de 5500

genes afectados en su transcripción. Una respuesta de esta magnitud puede ciertamente enmascarar cualquier potencial diferencia entre los grupos experimentales. En los muestreos S5 (respuesta tardía) y S6 (fin del desafío) no se observaron diferencias relevantes entre los grupos para ninguna de las variables estudiadas, lo que es coincidente con la inexistencia de diferencias en la mortalidad acumulada de ambos.

En conclusión, la modificación del ambiente de cultivo durante la etapa de crecimiento en agua dulce en salmón del Atlántico para estimular el ejercicio a velocidades consideradas como óptimas resultó en cambios estructurales y genéticos. Si bien en estudios previos estos han estado asociados a una mejor sobrevivencia en desafíos con enfermedades relevantes para la industria, en este estudio no observamos tal efecto en un desafío contra *P. salmonis* por cohabitación. Dada la elevada magnitud de la respuesta transcriptómica a la infección en ambos grupos, puede especularse que la intensidad del desafío fue suficiente como para enmascarar los potenciales efectos positivos del ejercicio.

Executive summary

In this project we performed the necessary analyzes to clarify the effects of smolt robustness and quality upon the resistance to an infectious disease with a high sanitary and productive impact in the Chilean salmon industry, such as Piscirickettsiosis (SRS). In salmon farming in Chile, within the Atlantic salmon sector, mortalities are around 1 to 2% per month of the total fish population after transfer to the sea. Of this, and during the first half of 2018, 19,6%, 24,8% and 7,1% was due to infectious diseases in Atlantic salmon, rainbow trout and Coho salmon; respectively. Within infectious diseases, 67,9% of mortalities are caused by SRS in Atlantic salmon, while the value goes up to 92,9% in rainbow trout. In this scenario, producing good quality and robust smolts has become a clear challenge for the salmon farming industry worldwide. Achieving high robustness in a batch of smolts is a task that covers the entire production process in fresh water, from the fish strain that is decided to farm, through the management, the growing environment, the feed used and the smoltification strategies. Lately, numerous scientific studies have emerged in which it is concluded that farmed salmon with a good cardiac capacity would have greater robustness. This has been achieved, experimentally, by subjecting the fish to exercising conditions by swimming in the tanks at water speeds considered optimal. For this it is necessary to adjust the water inlet to the tanks achieving a higher speed of it; the fish will exercise when trying to maintain their position inside the tank by active swimming. Sustained swimming at optimal speeds has been shown to increase the size of the heart, improve the performance of the cardiac muscle, increase the aerobic capacity of the skeletal muscle and the capacity of transport and oxygen extraction in the muscles; all of the above also associated with greater resistance to infectious diseases, lower levels of stress, lower levels of aggressiveness among fish, improves body growth through increased appetite and increased feed efficiency, promotes RAM-like ventilation (passive branchial ventilation that saves energy), increases the secretion of growth hormone and improves bone quality among other benefits.

In this Final Report we show all the activities performed during the Project, including those already reported on the previous progression reports (N1 and N2). First activities involved the adaptation of the swimming system and speeds in the experimental tanks. At this time, we did the first fish sampling (S1) in order to evaluate the starting conditions of the experimental fish. Once the system was fine-tuned, experimental groups were formed and stocked into their tanks: Control group and Exercise group, swimming at constant speeds of 0,4 and 1,0 body-lengths (BL) per second. This experimental phase went on for 11 weeks. Both groups were monitored daily and raised under strict productive standards and length and weight were controlled, as well as the smoltification process (sampling 2). At the end of the exercise period, and before sea water transfer and disease challenge, a sampling (S3) was performed to evaluate the effects of exercise on health and welfare, as well as plasmatic stress markers, tissue level effects by histological analyses and molecular transcriptomic studies via RT-PCR and microarrays. The Exercise group showed a 4% higher weight compared to the Control. While the health status was similarly good in both groups, fin condition which is associated to good welfare was better in the Exercise group. RT-PCR analyses of a set of selected immune response genes showed that the exercise regime promoted an over-expression of genes involved in the cellular arm of the immune system. In agreement with that, microarray results showed a massive effect of exercise on the cardiac muscle transcriptome. A total of 522 genes were differentially expressed in the Exercise group compared to the Control. Interestingly, these could be grouped into functional mechanisms such as cellular processes, metabolism, immune pathways and others. In contrast to exhaustion maladaptive stress responses, low to moderate stress is regarded as evidence of increased activity of tissue and acclimation to disturbance. On the other hand, exercise promoted the differential expression of fewer genes in head kidney, but these did not group into any specific functional mechanisms. Exercise also promoted healthier liver and gills as shown by histopathological analyses. These results show that we managed to promote a higher robustness and welfare by subjecting Atlantic salmon pre-smolts to an exercise training regime.

Fish from both groups were marked by maxillae-clipping and stocked together after sea water transfer and *P. salmonis* challenge by cohabitation. Shedder fish belonged to the same batch as experimental fish but were not part of the fresh water experimental phase. Cohabitation challenge lasted for 62 days, until mortality curves of both groups had flattened out. Overall mortality reached a 73% on average and no differences in mortality were found between Control and Exercise groups. From this we conclude that under this studies' characteristics, the delivered exercise regime did not increased robustness enough as to promote a higher survival against *P. salmonis*.

Three samplings took place throughout the challenge period: S4 during the early response phase; S5 during the late response phase; and S6 on survivor fish at termination of the challenge. On s4 the only relevant finding was that the health index was poorer on exercised fish compared to control. Microarray showed that nearly no genes were being differentially expressed in head kidney. Nevertheless, massive gene expression changes (>5500 genes) were seen between this and the previous sampling (S3, un-infected fish) due to *P. salmonis* infection

among all fish (not by groups). Such huge transcriptome changes might override and mask any potential differences between the experimental groups. On the two final samplings, S5 and S6, no relevant differences were found, which is in line with the challenge results.

To conclude, the environmental modification of the rearing environment to promote sustained exercise training in Atlantic salmon pre-smolts promoted a series of structural and genetic changes, from growth to tissue and molecular features. While previous reports have shown that this promotes a higher resistance to some industry-relevant infectious diseases, in this study we did not find such an effect. As suggested by the large exercise-driven cardiac transcriptomic changes, it may be suggested that the intensity of the cohabitation challenge model used was enough as to override any potential positive effects of exercise upon disease resistance.

AVS Chile – VESO Chile

A. Generalidades

Dado que la propuesta fue postulada por AVS Chile, se hace una reseña en breve de esta institución. AVS Chile S.A. fue establecida en Chile (Puerto Varas, región de Los Lagos) en agosto del 2007 por tres instituciones noruegas de investigación acuícola: Nofima, SINTEF *Fisheries and Aquaculture* y VESO.

El principal objetivo de AVS Chile es desarrollar y transferir conocimiento científico y tecnológico para toda la cadena de valor de la acuicultura, cumpliendo con las necesidades de la industria chilena. Junto con sus instituciones fundadoras (Nofima, SINTEF F&A y VESO), AVS Chile ha cubierto una amplia gama de competencias científicas en alimentación y nutrición, genética y reproducción, manejo sanitario, bienestar animal y ensayos pre- y clínicos bajo condiciones controladas. La misión de AVS Chile ha sido hasta la fecha crear conocimiento para una industria acuícola rentable, saludable y sustentable, así como fomentar el intercambio de conocimiento en acuicultura entre Chile y Noruega.

AVS Chile ha estado enfocada al desarrollo de investigación aplicada y su transferencia, así como a la entrega de asesorías especializadas, siempre con una cercana colaboración con la industria. Durante sus casi 10 años de existencia, AVS Chile, ha desarrollado más de 190 proyectos de I+D. Entre sus principales clientes destacan diferentes compañías que forman parte del clúster acuícola nacional. AVS Chile ha desarrollado proyectos de I+D en conjunto con instituciones públicas, tales como CORFO, Ministerio del Medio Ambiente, CONICYT y Sernapesca. En todos los proyectos mencionados, AVS Chile ha desarrollado investigación científica y tecnológica con el objetivo de resolver problemas específicos de la industria y de aprovechar oportunidades que podrían aumentar la competitividad del sector. En el contexto específico de la asesoría a llevar a cabo, AVS Chile desde el año 2012 ha venido desarrollado una serie de proyectos en relación a la calidad y robustez de smolt (biología de la producción) evaluando el performance de los peces de diferentes empresas productoras del sector contribuyendo a la revisión de parámetros relevantes en esta etapa del ciclo productivo. Así lo dan cuenta una serie de proyectos en modalidad de consorcio con el sector privado, que dio el pie inicial para un proyecto importante financiado por CORFO de bienes públicos mandado por Sernapesca e Intesal-SalmonChile.

Dentro de los mayores pilares de de AVS se encuentra su capital humano especializado, donde la multidisciplinariedad ha marcado un “plus” en relación al planteamiento y desarrollo de soluciones para el sector. Los miembros de AVS Chile son profesionales de sólida formación en el área biológica (biólogos, bioquímicos, médicos veterinarios, biólogos marinos), la mayoría con estudios de postgrados (MSc, PhD) en el extranjero: Alemania, Reino Unido, Noruega y Japón. Esto sin duda ha contribuido a la creación de redes de contacto en el extranjero que son utilizadas regularmente en la búsqueda de soluciones aplicables a las problemáticas de la industria acuícola en Chile.

A partir del 1 de Enero 2018 AVS Chile comienza a operar como VESO Chile, enfocándose a la realización de ensayos pre-clínicos y clínicos en apoyo al desarrollo de productos para el sector farmacéutico, nutricional y genético ligado a la acuicultura en Chile y el mundo. En este contexto VESO Noruega ha celebrado un acuerdo de trabajo y colaboración con Cargill enfocado en la utilización de una sala de desafío independiente para la realización de sus actividades, dentro del *Cargill Innovation Center* (CIC).

El CIC se encuentra registrado en el Registro Nacional de Acuicultura bajo el código SIEP 104373. La ubicación del centro se encuentra en la localidad de Colaco, Comuna de Calbuco, Región de Los Lagos (Fig. 1).

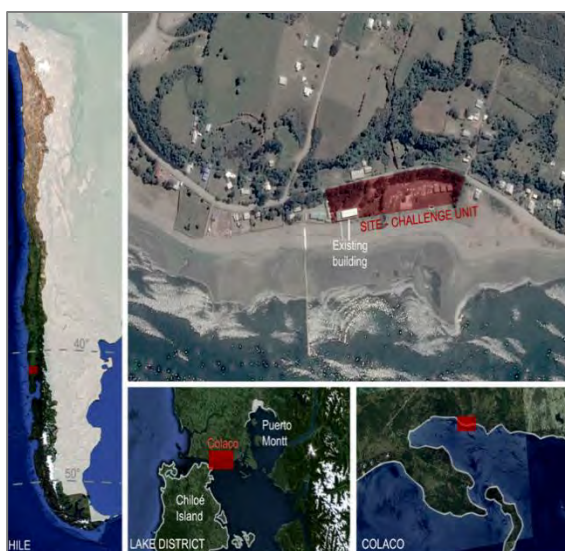


Figura 1. Ubicación de CIC y VESO Chile.

B. Características del sistema en CIC

El CIC fue diseñado con elevados estándares internacionales de bioseguridad con el objetivo de desarrollar ensayos que involucran desafíos con agentes patógenos relevantes para la acuicultura nacional e internacional incorporando estándares de bienestar y sustentabilidad en la práctica diaria.

Las instalaciones se emplazan en un área de 3000 m², lo que involucra 5 áreas delimitadas:

- Tratamiento de agua
- *Hatchery*
- Unidad de desafío
- Laboratorios
- Oficinas

Tratamiento de agua: El sistema de tratamiento de aguas se alimenta por medio de la captación por pozos profundos para el caso de agua dulce; para el caso de agua de mar la extracción se realiza por medio de un pozo arenoso. El sistema consta de filtros de arena para

remoción de partículas y hierro, desgasificador al vacío y filtros UV de 350.000 $\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$, dosis que está muy por sobre lo normado asegurando la remoción y desinfección de agentes patógenos difíciles como IPNV.

El sistema modulador de aguas está conformado por 11 estanques cabecera los cuales están destinados 3 para incubación, 2 para *hatchery* y 6 para las salas de desafío. Este sistema es altamente flexible pudiéndose modificar parámetros individuales para cada estanque, es decir, salinidad, oxígeno y temperatura. Esta flexibilidad del sistema permite contar con 6 calidades de agua distinta en cada sala de desafío lo cual permite optimizar los protocolos de investigación de acuerdo a los requerimientos de cada ensayo.

El sistema cuenta con un sistema de tratamiento de efluentes que involucra remoción de sólidos y desinfección mediante una capacidad instalada de filtros rotatorios, inyección de ozono 3mg/l por 3 min de retención, y filtros UV de 350.000 $\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$. A su vez el sistema cuenta con tratamiento de lodos igualmente mediante filtros rotatorios, filtros de banda y filtro centrífugo. Se asume que el sistema estaría produciendo aproximadamente una cantidad de 31 kg de lodo por día, los cuales serán incinerados *in situ*.

Hatchery: Esta área consta de un área de *Incubación* la cual se basa en un sistema de incubación Comphatch habilitado para contar con temperaturas independientes para cada piso de cultivo (5°-9°C), con una capacidad para incubar 350.000 ovas en total. Para las necesidades de CIC y VESO se ingresarán aproximadamente 20.000 ovas cada 4 meses, siendo los principales proveedores Stofnfiskur y AquaGen. Otra área dentro de esta sección es *Alevinaje* constituida por 4 estanques de 2 m³, que cuenta con monitoreo automático y control, individual de parámetros por estanque. Esta área tiene la capacidad de producir 17.000 alevines de 5 g cada cuatro meses. El área o sala de esmoltificación dentro del hatchery está conformada por 10 estanques de 2 m³, con monitoreo y control individual de parámetros por estanque. Esta área tiene la capacidad de producir alrededor de 8.000 smolt de 100 g cada cuatro meses. Es en esta última sala donde se ejecutará la primera parte del estudio enfocada a promover robustez mediante ejercicio.

Unidad de desafío: Está conformada por tres salas independientes con una variada cantidad de estanques para efectuar ensayos. Dada la flexibilidad del sistema modulador de agua se cuenta con seis diferentes calidades de agua por sala, brindando una máxima flexibilidad al momento de diseñar ensayos. Se cuenta con un sistema de alimentación automática Arbotech y sistema de recolección de sólidos. Cada sala cuenta con monitoreo en línea, control y alarmas de oxígeno, temperatura, flujo y niveles independiente para cada estanque. Ante una eventual alarma de oxígeno, se cuenta con un sistema de emergencia de inyección de oxígeno instalado en el interior de cada estanque.

Laboratorio: Las instalaciones cuentan con capacidad instalada en laboratorio para la realización de RT-PCR, cultivo celular, métodos *in vitro*, bacteriología y parasitología, lo cual entrega apoyo a las unidades de CIC como a VESO.

El centro cuenta con generadores para evitar contingencias de suministro eléctrico. Igualmente, todos los equipos críticos cuentan con back-up. Las unidades de *hatchery* y unidad

de desafío cuentan con ingresos independientes, tanto para visitas como para el personal que opera en cada unidad. Para el caso de contingencias en la desinfección de efluentes se cuenta con dos estanques de emergencia de 100 m³ cada uno lo cual da el tiempo de realizar mantención en el sistema ante alguna falla. Adicionalmente, el centro cuenta con su propio incinerador para toda materia orgánica generada en las instalaciones.

C. Sala VESO

La sala de desafío de AVS Chile VESO Chile consta de una superficie de 142 m², con una capacidad instalada de 20 estanques: 12 estanques de 0,5 m³, 6 estanques de 1,2 m³ y 2 estanques de 4 m³. El centro experimental cuenta con producción propia de peces libres de patógenos específicos sin vacunas especialmente producidos para ensayos de desafío. Al igual que lo mencionado en la sección de Unidad de desafío, la sala VESO consta de una flexibilidad en la utilización de calidades de agua de acuerdo a los requerimientos de los protocolos específicos de ejecución de ensayos, cuenta con sistema de alimentación automática, monitoreo en línea con la sala de operaciones, control y alarmas de oxígeno, temperatura, flujo y niveles independiente en cada estanque. Ante el evento de alarma de oxígeno se gatilla el funcionamiento del sistema de emergencia de inyección de oxígeno. La sala además cuenta con un acceso bioseguro habilitado con presión positiva con el objeto de minimizar las contaminaciones. Los procedimientos de bioseguridad se cumplen desde la entrada principal a la unidad de desafío donde se resguarda el cambio de ropa y calzado de trabajo, uso de maniluvios, resguardo de áreas limpias y sucias.

VESO Chile se rige con la misma rigurosidad de los procedimientos implementados en VESO Viken en Noruega, habiéndose traspasado el *know how* a su filial y profesionales científicos en Chile.

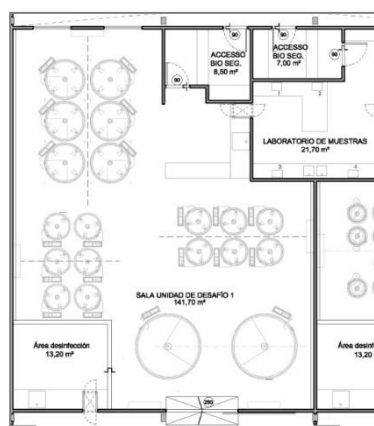


Figura 2. Disposición estanques Sala VESO en CIC Colaco.

Efectos de calidad, robustez y bienestar de smolts en la resistencia al desafío con *Piscirickettsia salmonis*

Marco teórico

Uno de los momentos técnicamente más complejos en la cadena productiva de los salmónidos es el de la transferencia de los peces esmoltificados desde centros de agua dulce a centros en mar, lo que requiere de una fina planificación y logística que suele incluir transporte terrestre y marítimo. Sin embargo, este es también un momento fundamental en el ciclo de vida de los peces, ya que deben complementar su transformación morfológica, fisiológica y conductual entre *parr* y smolt, para ser sometidos casi inmediatamente, a un nivel de estrés probablemente nunca antes experimentado que incluye el ser sacados de sus estanques mediante bombas, llegar a un estanque sobre un camión a densidades a las que no están acostumbrados, para luego ser despachados (*wellboat* mediante) a jaulas en el mar en un ambiente variable que muy probablemente será bastante más hostil al que estuvieron acostumbrados durante todo su desarrollo previo. Este nuevo ambiente incluye un medio de alta salinidad, lo cual requiere de un considerable uso de energía para mantener un óptimo balance osmótico. Incluye también la presencia de nuevos agentes patógenos, corrientes variantes, oscilación natural en la longitud del día y la noche, una muy baja densidad, cambios en la forma de alimentarse, etc. Se aprecia entonces que este es un proceso importante y altamente estresante, que requiere una precisa coordinación logística -por parte de la empresa- y fisiológica -por parte del pez-, todo lo cual debe ocurrir dentro del transcurso de unas pocas semanas.

Un smolt robusto puede ser definido como aquel que es capaz de combinar un buen crecimiento con una elevada resistencia a desafíos sanitarios y ambientales. Lograr una alta robustez en un *batch* de smolts es una tarea que probablemente abarca todo el proceso de producción en agua dulce, desde la cepa que se decide sembrar, pasando por los manejos, el ambiente de cultivo, el alimento utilizado y las estrategias de esmoltificación. Un smolt robusto debiera tener un rendimiento superior, dicho de otra manera, producir smolts robustos debiera ser un predictor de buen crecimiento y baja mortalidad en mar.

En la industria actual se observan altos niveles de mortalidad durante la etapa de crecimiento en mar, los que fluctúan entre el 10% y 20% en los principales países productores: Noruega y Chile. En Chile durante el primer semestre del 2018, un 19,6%, 24,8% y 7,1% se debe a enfermedades infecciosas en salmón del Atlántico, trucha arcoíris y salmón coho, respectivamente. De estas la principal causa infecciosa en salmón del Atlántico y trucha arcoíris es el SRS causado por la bacteria *Piscirickettsia salmonis*, que da cuenta de la mortalidad en un 67,9% y 92,9% respectivamente (Sernapesca 2018). Existe una serie de otros parámetros productivos y sanitarios en los cuales un individuo robusto tendría el potencial de superar en rendimiento a uno normal. Estos parámetros incluyen una reducción en la

proporción de peces clasificados como rezagados y/o desadaptados, una mayor capacidad para resistir la caligidosis y una menor incidencia de deformidades, entre otros.

En los últimos años, ha surgido una serie de estudios científicos en los cuales se concluye que salmones de cultivo con una buena capacidad cardíaca tendrían una mayor robustez. Existen dos principales formas de lograr una población con una capacidad cardiovascular superior. La primera es mediante la separación de la población, lo más tempranamente posible, de acuerdo a su capacidad cardiorrespiratoria intrínseca, para lo cual se somete a los peces a una prueba de nado masiva. De esta manera, se puede descartar tempranamente a individuos con una pobre capacidad aeróbica (Claireaux *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2013b; Anttila *et al.*, 2014). La segunda manera de lograr una población con una capacidad cardiovascular superior es lograr ejercitar a los peces durante su etapa de cultivo en agua dulce. Para esto es necesario ajustar la entrada de agua a los estanques logrando una mayor velocidad de ésta; los peces ejercitarán al intentar mantener su posición dentro del estanque mediante nado activo. Para producir beneficios, la velocidad de nado debe establecerse cercana a la velocidad óptima de nado, en donde el uso de energía para el traslado se hace más eficiente y el costo del transporte se minimiza (Tucker, 1970). El nado sostenido a velocidades óptimas ha demostrado aumentar el tamaño del músculo cardíaco, mejorar el rendimiento del corazón, aumentar la capacidad aeróbica del músculo esquelético y la capacidad de transporte y extracción de oxígeno en los músculos (Hochachka, 1961; Davie *et al.*, 1986; Farrell *et al.*, 1990; Farrell *et al.*, 1991; Thorarensen *et al.*, 1993; Cousins *et al.*, 1997; Gallagher *et al.*, 2001; Gamperl & Farrell, 2004; Anttila *et al.*, 2008; Palstra & Planas, 2011; Castro *et al.*, 2013a). Más aún, el ejercicio sostenido reduce el estrés y los niveles de agresividad entre los peces, mejora el crecimiento corporal mediante un aumento del apetito y una mayor eficiencia del alimento, promueve la ventilación tipo RAM (ventilación branquial pasiva que ahorra energía), aumenta la secreción de la hormona del crecimiento y mejora la calidad ósea (Jobling *et al.*, 1993; Davison, 1997; Palstra & Planas, 2011). Finalmente, se ha comprobado que el ejercicio en salmónidos mejora la resistencia a enfermedades infecciosas (Khovanskiy *et al.*, 1993; Castro *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2013b). En el estudio de Castro *et al.* (2011) se demostró que salmones entrenados por 6 semanas en el periodo de agua dulce mostraron una resistencia superior a IPN en un ensayo de desafío controlado. Esto estuvo además asociado a algunos de los marcadores de robustez cardíaca previamente mencionados. En conclusión, el ejercicio sostenido en salmónidos promueve efectos de robustez similares a los que produce en seres humanos, en donde el ejercicio moderado y constante también reduce el riesgo de contraer enfermedades infecciosas y de estilo de vida (Gleeson, 2007; Mathur & Pedersen, 2008).

Objetivo general

Establecer criterios de respuesta inmune, calidad de smolts y bienestar de salmones de cultivo y su asociación con *P. salmonis*, para favorecer la producción de smolts en aspectos de rendimiento, bienestar, robustez y sustentabilidad.

Objetivos específicos

1. Definir mecanismos inmunes relacionados con el establecimiento de la infección por *P. salmonis* bajo condiciones controladas.

Actividades asociadas:

- Acondicionamiento de estanques para estimular nado/ejercicio.
- Evaluación del desempeño y robustez durante la esmoltificación.
- Evaluación del desempeño y robustez en post-smolts.

2. Evaluar el rol de la calidad de *smolt* y bienestar de salmones de cultivo en la infección por la bacteria y magnitud de brotes de Piscirickettsiosis.

Actividades asociadas:

- Desafío por cohabitación con *P. salmonis*.
- Análisis de respuesta inmune preclínica y clínica de peces desafiados y sobrevivientes.
- Evaluación del parámetro mortalidad/sobrevivencia de peces desafiados (cohabitantes)

3. Proponer recomendaciones prácticas que apunten a un mejoramiento sanitario de la acuicultura.

Actividades asociadas:

- Análisis costo modificaciones de diseño de entrada de agua.
- Análisis beneficio (indicador: reducción de mortalidad).

En este Informe Final hemos optado por mantener el formato y la información entregada en los informes anteriores (de Avance N°1 y N°2) para que sea más fácil hacer el seguimiento de las actividades realizadas. A continuación, se detallan las actividades de ambos informes de

Avance agregando la información relevante. A continuación de estos, se encontrarán los resultados, discusión y conclusiones finales.

Actividades realizadas en el marco del Informe de Avance N°1

De acuerdo a la propuesta postulada las actividades contempladas a informar en el Informe de Avance N°1 corresponden a la etapa previa/preparación para cumplir con en el Objetivo Específico N°1: Definir mecanismos inmunes relacionados con el establecimiento de la infección por *P. salmonis* bajo condiciones controladas.

Las actividades en específico según Cronograma de Actividades (carta Gantt) corresponden a las siguientes:

- Acondicionamiento estanques para estimular el nado/ejercicio, a realizarse durante Trimestre 4 (Tr4) (a partir del 15 de diciembre).
- Desempeño y robustez durante etapa de esmoltificación (a desarrollarse en Tr1 y Tr2).
- Desempeño y robustez en post-smolt (a realizarse durante Tr2).

El Informe de Avance N°1 comprometido involucra actividades de habilitación de sistema para la calibración de entrada de agua, modificaciones potenciales y su materialidad con el objeto de lograr las velocidades requeridas para los grupos de estudio establecidos, y la adquisición de los peces sujeto del estudio. Se detalla a continuación.

A. Contacto colaboradores

Ante la notificación de adjudicación de la propuesta postulada, a partir de la semana 48/2017 se comenzó con el contacto de los servicios colaboradores que serán subcontratados:

- Nofima, cuya contraparte es el Dr. Aleksei Krasnov de extensa experiencia en transcriptómica y análisis bioinformático en relación a enfermedades de peces e inmunidad. Para el desarrollo del estudio se utilizará el microarreglo SIQ 6.0 de 15000 secuencias de genes relacionados con respuesta inmune y calidad en salmón del Atlántico desarrollado por este grupo de investigación.
- Pathovet, cuya contraparte es el Dr. Marco Rozas, gerente general del laboratorio. Pathovet ha desarrollado y tiene a disposición una variedad de herramientas analíticas cubriendo marcadores plasmáticos, genéticos y generales para el diagnóstico de enfermedades en peces.

B. Peces

En la semana 49-50/2017 se revisa disponibilidad, talla y número de peces producidos en CIC, quedando estos reservados para el estudio en cantidad de 1200 ejemplares.

Los días 18 y 19 de diciembre 2017 se hace ingreso a la Unidad de Hatchery de CIC, donde se revisa el sistema desde sala incubación a sala esmoltificación.

Se realizó inspección de los peces destinados al estudio ubicados en sala de alevinaje del CIC. Los peces corresponden a CIC batch 3 2017, de ovas importadas desde Islandia, proveedor Stofnfiskur. A la fecha de la inspección los peces tienen una talla entre 6-8 g. De acuerdo a programación, estos peces estarán en con talla de aproximadamente 20 g a fines de enero, fecha en la cual estarán listos para la etapa de entrenamiento según la propuesta. La cantidad reservada y comprometida para la realización del estudio es de 1200 peces. Se cuenta con documentos de certificación sanitaria en origen de ovas y análisis de agentes patógenos en distintas etapas en producción en CIC, presentando resultados negativos para los agentes analizados (Anexo 1).

C. Habilitación del sistema

Durante la semana 51-52/2017 se realizaron las siguientes actividades:

- a. Inspección: Se realizó inspección de la sala de esmoltificación donde se realizará el estudio. Esta consta de 10 estanques de 2 m³, de los cuales 2 de estos estarán destinados a la ejecución de la presente iniciativa.

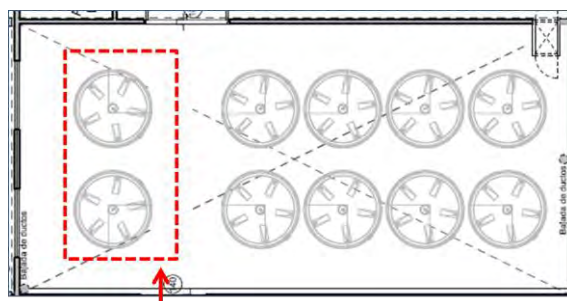


Figura 3. Disposición de estanques en sala de esmoltificación. Estanques enmarcados destinados al estudio.

- b. Medición de flujo y velocidad de agua en estanques: De acuerdo a la literatura científica que sustenta la presente iniciativa el punto óptimo de velocidad que promueve el ejercicio en salmónidos se encuentra entre los 0,8 y 1,2 BL/s (*body-lengths per second* o largos de cuerpo por segundo; Jobling *et al.*, 1993; Davison, 1997; Castro *et al.*, 2011). Este proyecto apunta a generar dos ambientes de nado; uno sedentario entre 0,2-0,4 BL/s, y otro que promueva el ejercicio apuntando a 1 BL/s).

Para este objetivo se utilizó un equipo manual de hélice con lector digital (Flowwatch®, JDC Electronics, Suiza). Esta primera medición se realizó con estanques llenos de agua a máxima capacidad, sin peces y con un flujo de 40 l/s. se definieron 8 distintos puntos de medición según ubicación y altura de la columna de agua (Fig. 4, Tabla 1, Anexo 2).

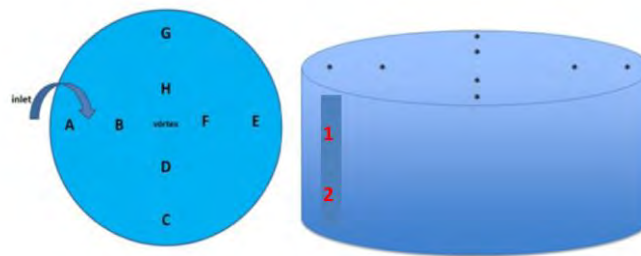


Figura 4. Puntos de medición en estanques a utilizar: 8 puntos, 4 en el exterior y 4 en el interior, y dos puntos de profundidad.

Tabla 1. Valores de puntos de medición en estanque (pies/s).

	A	C	E	G
Exterior				
1	0,6	0,6	0,5	0,5
2	0,8	0,9	1,0	0,6
	B	D	F	H
Interior				
1	0,2	0,1	0,2	0,2
2	0,1	0,2	0,2	0,2

*1pie=0,3048 m

c. Evaluación modificaciones y ajuste de sistema:

El primer punto evaluado fue la entrada de agua efectiva, lo que involucra una modificación del ángulo de ubicación y tamaño y/o número de agujeros de esta (Fig. 5).

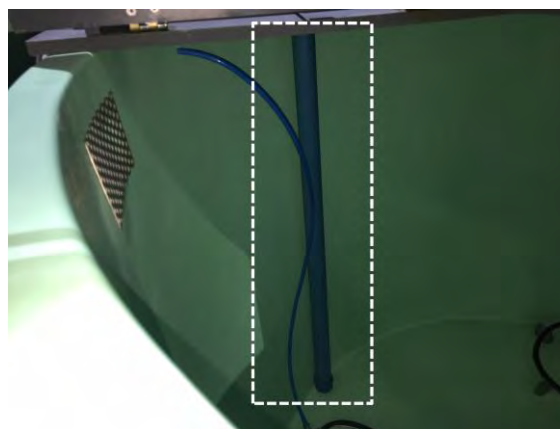


Figura 5. Entrada de agua del estanque.

El segundo punto evaluado fue la factibilidad de confeccionar un corredor de entrenamiento para los peces. Este será ubicado en la zona central del estanque con el objeto de evitar la “zona muerta” en términos de velocidad (Fig. 6).

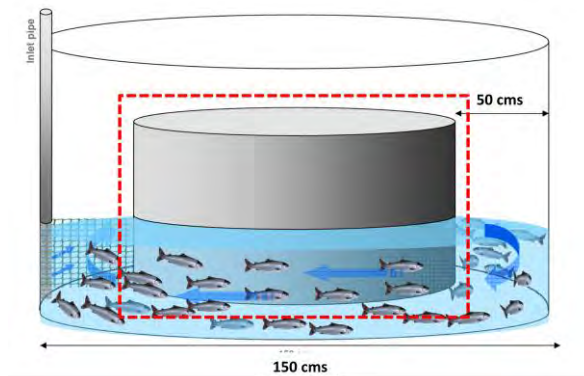


Figura 6. Esquema de corredor para estanques prueba.

Otro punto importante evaluado fue la intervención de los moduladores de nivel o comúnmente llamadas “guillotinas”, con el fin de modificar el nivel de los estanques en utilización para el estudio (Fig. 7).



Figura 7. Juego de “guillotinas” para estanques

Actividades realizadas en el marco del Informe de Avance N°2

De acuerdo con la propuesta, las actividades contempladas a informar en el Informe de Avance N°2 corresponden a labores en el marco del cumplimiento del Objetivo Específico N°1: Definir mecanismos inmunes relacionados con el establecimiento de la infección por *P. salmonis* bajo condiciones controladas. Ya hemos reportado en el Informe de Avance anterior la etapa de acondicionamiento del sistema, la cual prosiguió en este periodo hasta contar con los peces ya desarrollados para comenzar con el estudio. Las actividades en específico a informar en este Avance fueron:

- Índices de desempeño, robustez y condición de peces del grupo control (origen) y velocidad mejorada durante la esmoltificación y post-smolts.

A. Habilitación final del sistema

Con el objeto de proseguir con las actividades se procedió a finalizar confección del sistema de estanques para el estudio, se detalla a continuación.

Semana 1/2018: Confección del corredor- en base a un cilindro enrejado- etapa en la cual se revisó la materialidad y factibilidad de realización (i.e. malla plástica, tubos PVC, sellos, etc.). Un aspecto importante fue el revisar el comportamiento del alimento en la columna de agua, por lo tanto, se procedió a chequear caída y recorrido de este. De acuerdo a lo observado se realizaron modificaciones en relación a las dimensiones de la malla en altura con el objeto de evitar traspaso de peces hacia el centro, además se verificó el sistema de aireadores dentro de los estanques (Fig. 8).

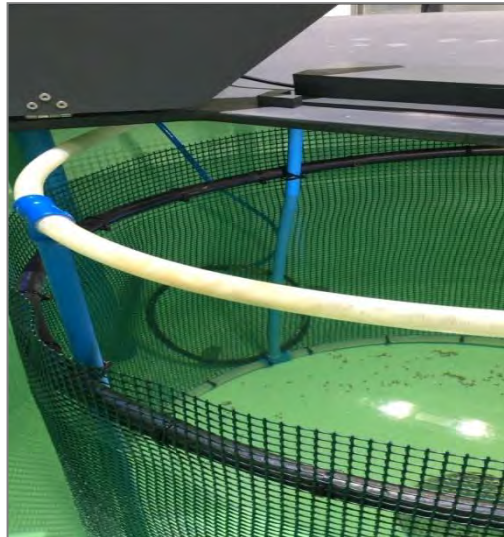


Figura 8. Disposición del corredor en estanque.



Figura 9. Vista de ambos estanques del estudio en zona de Hatchery. Se observa el cilindro confeccionado, formando el corredor de nado y circunscribiendo a la zona muerta, evitando de esta forma el acceso de los peces a esta zona.

Semana 3/2018: Se gestiona y realiza la compra de materiales para habilitar la entrada de agua en base a nuevas flautas de PVC, configuración de agujeros con el fin de establecer la velocidad adecuada para el ensayo.

Semana 4-5-6/2018: Se habilita estructuralmente el sistema. Adicionalmente, se habilita en CIC fuente de agua dulce con nuevo pozo, biofiltro y *skimmer*. Se procede a la medición de velocidades en base al sistema de flautas de PVC con configuración en zigzag sin la incorporación aun de peces.

El sistema de corredor queda configurado con el objeto de circunscribir la zona muerta del (los) estanque(s) o de nula/baja velocidad, esto enfocado a evitar el ingreso de los peces a esta

zona y por lo tanto someterlos a velocidades conocidas y deseadas tanto para el caso del grupo control (sedentario 0,4 BL/s) como para el grupo ejercitado (1 BL/s) (Fig. 9 y Fig. 10).



Figura 10. Cilindro enrejado antes de ser colocado en el centro de cada estanque.

B. Peces – Etapa Ejercitación

Semana 1/2018: Se realiza una selección del *batch* 3 2017 en CIC *Hatchery*, los que son ingresados a la sala de esmoltificación. Al momento de la selección los peces se encontraban en 10 g (04.01.2018).

Semana 7/2018: Se realiza el Muestreo basal S1 previo al comienzo del entrenamiento, que involucró las siguientes actividades:

- a. Evaluación de parámetros externos e internos asociados a calidad/robustez en base a:
 - HAI: *Health Assessment Index* (Adams *et al.*, 1993), y SWIM: *Salmon Welfare Index Model* (Stien *et al.*, 2013; Pettersen *et al.*, 2013). Ambos *scores* son realizados en base a necropsias individuales con puntajes para cada órgano/tejido. El número de peces evaluado fue de 12.

- En paralelo al método SWIM, y debido a la importancia de la calidad de las aletas en el bienestar de los peces, se utilizó un sistema de *scores* para estado de aletas previamente diseñado (Hoyle *et al.*, 2007). El sistema se basa en establecer grados o *scores* que dan cuenta del nivel de daño y erosión de cada aleta de manera individual (excepto la aleta adiposa); el score para cada aleta va desde “0” (aleta wild-type) hasta “5” (aleta altamente erosionada o inexistente; Fig. 11).

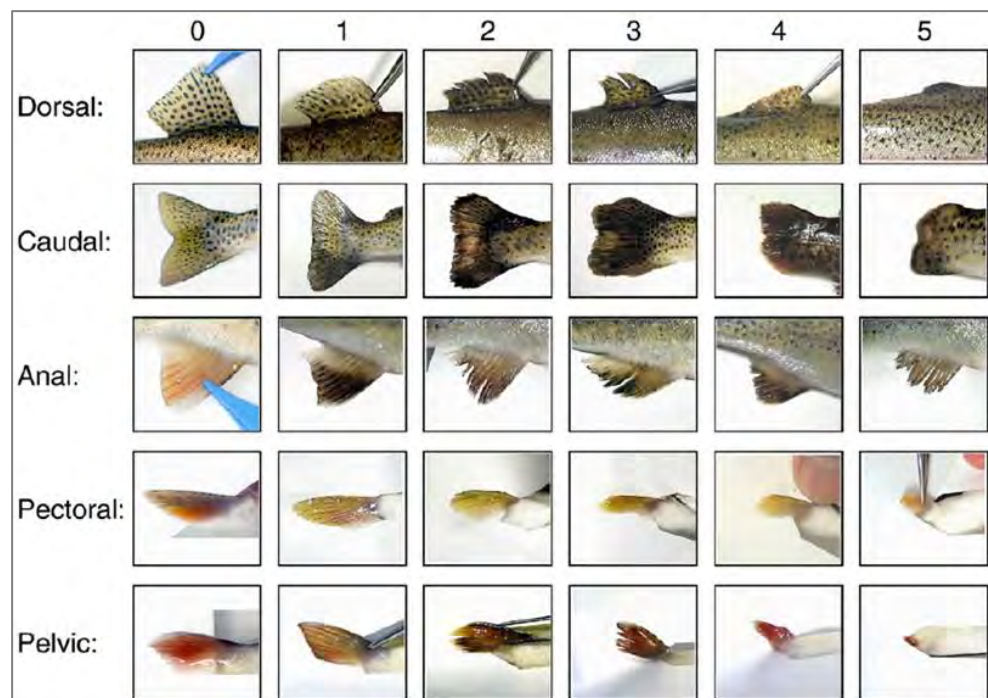


Figura 11. Clave de identificación utilizada para el cálculo del score de aletas (tomada de Hoyle *et al.*, 2007).

Para fortalecer aún más el valor de analizar las aletas y su relación con el bienestar de los peces, se calculó valor de índice de aletas con otro método (Person-Le Ruyet *et al.*, 2007) para la dorsal, anal y pectoral izquierda de cada pez (Fig. 12). Para esto se midió el largo del rayo más largo de cada aleta y se calculó un índice de la siguiente manera:

$$\text{Índice de aletas} = (\text{largo aleta} / \text{largo pez}) \times 10000$$

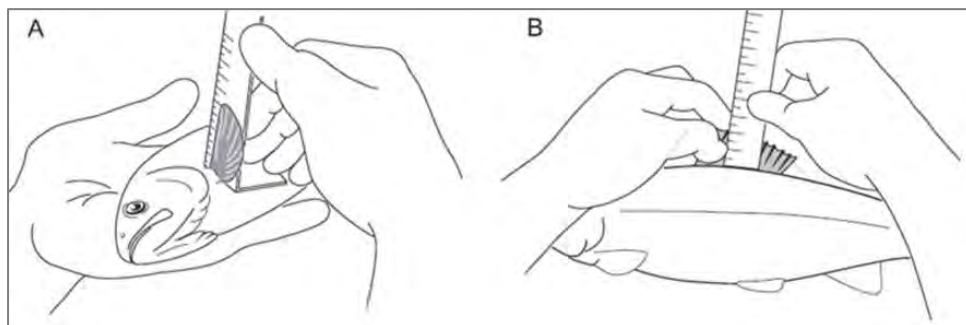


Figura 12. Método de medición de aletas para calcular el índice de aletas: (A) aleta pectoral izquierda; (B) aleta dorsal. También se midió de similar manera la aleta anal (figuras tomadas de Person Le-Ruyet, 2007).

- b. Marcadores plasmáticos de stress (cortisol, lactato, glucosa). Se colectó 12 peces con los cuales se generaron 3 *pools* con muestra de 4 peces cada uno.
- c. Colección de muestras destinadas a RT-PCR (riñón anterior). Peces n=12. Los genes a analizar son un total de 15: CD4, CD8, INF γ , INF α , IL-10, IL-12, IgM, IgT, IL-8, IL-2, IL-15, IL-18, IL1b, MHC I y MHC II. Mientras que como genes de referencia se utilizaron los que codifican para las proteínas ELF1 y B-actina.
- d. Colección de muestras para análisis histológico basal que incluyó branquias, corazón, hígado y piel. Peces n=12.

Semana 8/2018: Se realiza el traslado de peces a sus estanques definitivos en *hatchery* (Fig. 13) configurándose así los grupos de estudio. De esta forma se destinan 400 peces en estanque Grupo Control (C) y 400 en Grupo Experimental a ejercitar (E). Previo al traslado se realiza pesaje de todos los peces de ambos estanques (n= 400/estanque) y se mide la longitud de una proporción de cada estanque (n= 80 por estanque; Tabla 2). La temperatura del agua es de 13 ± 1 °C, la cual se mantendrá durante toda la etapa experimental en *hatchery*. El manejo del fotoperiodo será de la manera habitual en este centro, es decir 6 semanas de señal invierno (16 h de luz y 8 h de oscuridad al día) seguidas por 4 semanas de señal verano (24 h de luz continuas). La saturación de oxígeno dentro de los estanques se mantiene >70% en todo momento, con sistemas de sensores dentro de los estanques y de alarmas en caso de que la saturación bajase. En estos casos, el sistema de oxigenación dispuesto dentro de cada estanque experimental se activa.



Figura 13. Peces en estanque con corredor habilitado; situación durante toda la fase experimental de agua dulce (grupos Control y Ejercicio).

Tabla 2. Peso y longitud de peces de grupos ya constituidos. Semana 7: Día 0.

Grupo	Peso (g)	SD	Longitud (cm)	SD
Control	35,8	$\pm 0,15$	13,9	$\pm 0,05$
Ejercicio	35,7	$\pm 0,14$	13,8	$\pm 0,04$

n=400 por estanque para peso; n=80 peces por estanque para longitud.

Semana 9/2018 (26.02.2018): Se da inicio a la etapa de ejercitación propiamente tal, que involucra 11 semanas de ejercitación para el grupo en estudio. Para este objeto se ajustaron las velocidades de agua y de natación utilizando datos obtenidos la semana anterior, enfocados en lograr velocidades aproximadas de 0,4 y 1,0 largos de cuerpo por segundo en los grupos C y E; respectivamente.

Se inicia manejo de fotoperiodo invierno con el objeto de comenzar a entregar señales para el proceso de esmoltificación.

Como rutina fundamental de esta etapa, los peces son monitoreados diariamente, siendo la velocidad ajustada en la medida necesaria (de acuerdo al crecimiento). El ajuste de velocidad es realizado en base a la modificación de la orientación del flujo de agua de entrada, así como al recambio de agua en el estanque. En conjunto se verifica que la naturaleza del nado sea homogénea y que los peces se estén alimentando correctamente.

Semana 10-11/2018: Se continúa con el monitoreo diario, que involucra la verificación del buen funcionamiento del sistema en general, y chequeo de alimentación efectiva de los peces en estudio.

Semana 12/2018: En forma adicional a la rutina diaria, se realiza un muestreo de peso con el objeto de verificar si el proceso de alimentación está siendo efectivo en el sistema experimental habilitado con el diseño de corredor (Tabla 3).

Tabla 3. Peso y longitud de peces de grupos en estudio. Semana 12: Día 21.

Grupo	Peso (g)	SD	Longitud (cm)	SD
Control	46,5	± 0,71	15,3	± 0,08
Ejercicio	48,5	± 0,59	15,5	± 0,06

n= 50 peces por grupo

Cabe destacar que a tres semanas de comenzado el estudio, ya se observa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$; Prueba t de Student) en el peso, de los peces entre los grupos lo que resulta coincidente con la literatura científica en donde el ejercicio promueve un mayor crecimiento de los peces.

Semana 13-14/2018: Se realiza inspección rutinaria de los peces en estudio, así como el funcionamiento general del sistema. Igualmente, se verifica alimentación efectiva. Se modifica el calibre del alimento desde 5 a 50.

Semana 15/2018: En forma adicional a la rutina diaria, se realiza un muestreo de peso con el objeto de verificar si el proceso de alimentación está siendo efectivo en el sistema experimental habilitado con el diseño de corredor (Tabla 4).

Tabla 4. Peso y longitud de peces de grupos en estudio. Semana 15: Día 42.

Grupo	Peso (g)	SD	Longitud (cm)	SD
Control	59,8	± 0,92	16,4	± 0,07
Ejercicio	63,4	± 0,99	16,8	± 0,08

n= 50 peces por grupo

Cabe destacar que a seis semanas de comenzado el estudio se continúa observando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$; Prueba t de Student) en el peso entre ambos grupos.

Obtenidos los datos de longitud de los peces, se procedió a nuevamente ajustar el sistema en cuanto a velocidades de los estanques, mediante el aumento de flujo y recambio. Ambos estanques mantienen su velocidad objetivo en aproximadamente 0,4 y 1 BL/s para los grupos Control y Ejercicio, respectivamente.

Semana 16-17/2018: Se da inicio al manejo de fotoperiodo de verano (24 horas luz continua). El estudio sigue en fase de ejercitación como programada, y con rutinas diarias de observación y monitoreo de comportamiento. Sin actividades adicionales específicas.

Semana 18/2018: Adicional a la rutina de monitoreo de los grupos en experimentación, se ejecuta rutina de producción: S2 - Primer muestreo de ATPasa (03.05.2018), peces $n= 5$. La metodología tradicional arroja valores promedio de $14,4 \pm 0,41$ y $13,95 \pm 0,74$ U/mg (actividad específica Na^+/K^+ ATPasa; Universidad de los Lagos) para grupos Control y Ejercicio, respectivamente. Para mayor confirmación del correcto proceso de esmoltificación, se utiliza el método *Smoltmeter* (Pathovet), que mide mediante técnica de RT-PCR la razón entre las subunidades de agua mar y agua dulce de la Na^+/K^+ ATPasa. Según estos resultados, los peces de ambos estanques ya se encuentran en estado de *smolt* (Figura 14, Anexo 3). Los pesos promedio al momento del muestreo para ATPasa fueron de 79,0 g y 83,3 g para los grupos Control y Ejercicio, respectivamente

Semana 19/2018: Adicional a la rutina del estudio, se realiza una segunda colección de muestras para determinación de ATPasa ($n= 5$ peces por grupo) para determinar la evolución temporal de dicho parámetro. En esta oportunidad ambos grupos se observaron con valores sobre 15 U/mg ($15,5 \pm 0,49$ y $16,3 \pm 0,33$ para Control y Ejercicio, respectivamente, en base a la metodología tradicional (Anexo 3). Con estos valores se considera a ambos grupos completamente esmoltificados y por lo tanto aptos para su transferencia a agua de mar.

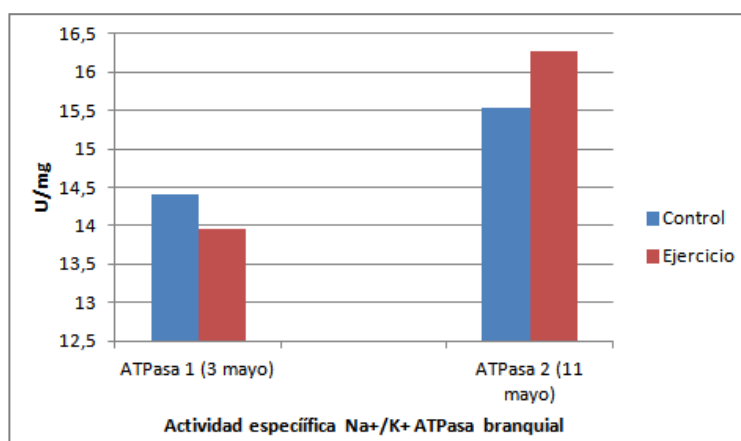


Figura 14. Evolución, por grupo experimental, de la actividad específica de Na^+/K^+ ATPasa branquial. $n= 5$ por grupo en cada muestreo.

Semana 20/2018: Al igual que en las semanas anteriores, se prosiguió con la rutina diaria y monitoreo de los peces. Esta semana se realizó el muestreo S3 enfocado a:

- a. Evaluación de parámetros externos e internos asociados a calidad/robustez en base a *scores* de bienestar animal
 - HAI: Health Assessment Index, y SWIM: *Salmon Welfare Index Model*. Ambos *scores* son realizados en base a necropsias individuales con puntajes para cada órgano/tejido. El número de peces evaluado fue $n=12$ por grupo experimental.
 - Evaluación aletas en base a *scores* (*fin score*) y a medición para cálculo de índice de aletas (*fin index*). Peces $n: 12$ por grupo experimental.
- b. Marcadores plasmáticos de stress (cortisol, lactato, glucosa. Se colectaron y analizaron individualmente 12 peces por estanque.
- c. Colección de muestras destinadas a RT-PCR y microarreglos (riñón anterior). Peces $n=8$ por grupo experimental. Lista de genes analizados por RT-PCR descrita previamente.
- d. Colección de muestras para análisis histopatológico que incluyó branquias, corazón, hígado y piel. Peces $n: 12$ por grupo experimental.
- e. Colección de muestras de corazón y branquias para evaluación de marcadores macro y tisulares de robustez mediante biometría. Peces $n: 12$ por grupo experimental. En cada pez muestreado, se tomaron los ventrículos completos y se fijaron en formalina al 4%. En imágenes individuales se midió la razón entre el largo y el ancho del ventrículo, así como el ángulo formado por el ápice ventricular, con el objetivo de evaluar la forma de este (Fig. 15).

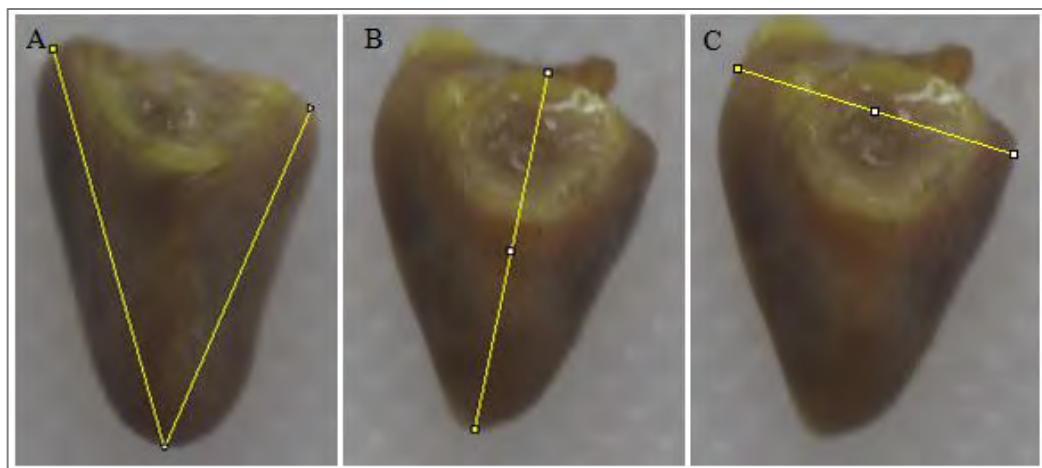


Figura 15. Evaluación de forma del ventrículo cardiaco. A: medición del ángulo formado entre las puntas de los “hombros” del ventrículo y el ápice de este. B y C muestran la forma de medición del alto y el ancho del ventrículo para el cálculo de la razón entre éstos; mientras menor la altura del corazón, la razón se acercará más al valor 1 reflejando un corazón más redondeado.

Previamente, los ventrículos fueron pesados en balanza analítica para calcular el índice ventrículo somático (VSI) de la siguiente manera:

$VSI = 100 * (VW/W)$; en donde VW es el peso ventricular (g) y W es el peso (g) del pez.

Las muestras de branquias (segundo arco branquial costado izquierdo del pez) fueron fijadas en formalina 4% y luego fueron procesadas de modo estándar. Brevemente, luego de fijadas las muestras y seccionadas, se sometieron a una batería de alcoholes para deshidratación, aclaramiento en xilol e impregnación en una combinación comercial de parafina y polímeros plásticos (Paraplast®). Una vez procesadas las muestras, se obtuvieron cortes longitudinales de 3-5 μm que se sometieron a tinción hematoxilina-eosina (Luna 1968). La observación se realizó en un microscopio estereoscópico estándar (Olympus, Tokyo, Japan), acoplado con un sistema de análisis de imágenes (Microshot Technology Limited, Guangzhou, China). Los análisis biométricos de las muestras se hicieron utilizando el software ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, USA). Un total de 5 imágenes por pez (amplificación 20X) de secciones histológicas de branquias fueron analizadas con el objetivo de medir el largo promedio de las lamelas secundarias. Se midieron 50 lamelas secundarias por pez (10 por imagen), dando un total de 600 mediciones por grupo experimental. Se construyó un índice de branquias (o del largo de las lamelas relativo al largo del pez (*RLL*; *relative lamelar length*)) de la siguiente forma:

RLL (índice de branquias) = $100 * (LL/FL)$; en donde FL es el largo (mm) del pez y LL es el largo (mm) de las lamelas secundarias (Fig. 16).

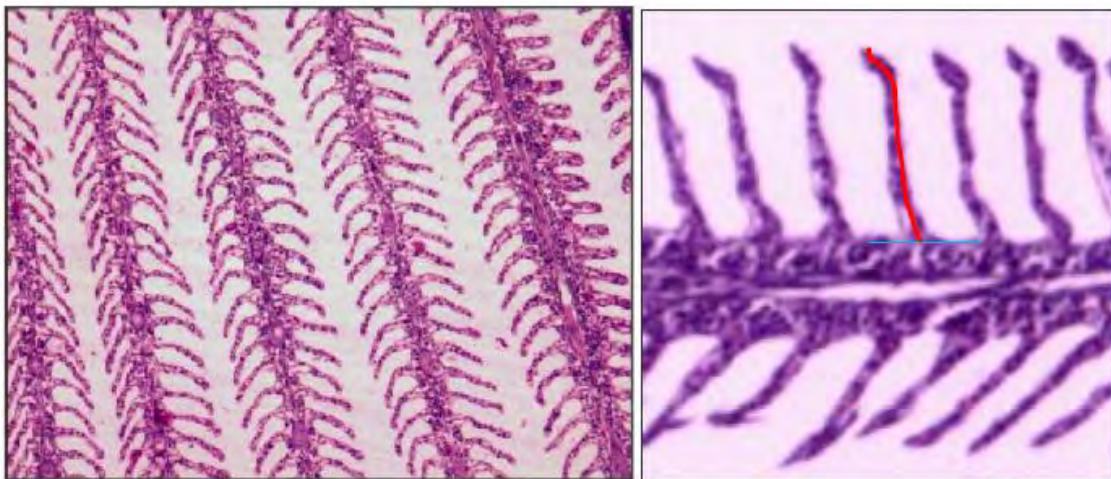


Figura 16. Cortes histológicos para medición de longitud de lamelas secundarias; línea roja (figura derecha) representa el modo de medición, desde el ápice hasta la base potencial de intercambio activo de gases (línea azul).

El día 16 de mayo se procede a traslado de los peces desde *hatchery* a Sala de Desafío de VESO Chile. En esta instancia se lleva a cabo medición de peso de todos los peces correspondientes a cada grupo (Tabla 5). Además, todos los peces son marcados: grupo Control con corte de maxila izquierda; grupo Ejercicio con corte de maxila derecha. Los peces son sembrados, ambos grupos juntos, en un estanque de 4 m³ para su preparación al desafío (n= 270/grupo).

Tabla 5. Peso de peces de grupos en estudio. Semana 20: Día 79.

Grupo	Peso (g)	SD
Control	89,9	$\pm 0,6$
Ejercicio	93,5	$\pm 0,6$

n= 365 peces por grupo

Semana 21/2018 (24.05.2018): Con el objeto de aclimatar a los grupos experimentales Control y Ejercicio a la temperatura de desafío, esta se eleva a 15°C. Dicha temperatura es la utilizada para todo el periodo de desafío con *P. salmonis*.

Semana 22/2018 (29.05.2018): Se comienza el desafío de los grupos experimentales en base al modelo de cohabitación de VESO Chile, se utiliza cepa 1704 correspondiente a *P. salmonis* EM 90-like, concentración $1,5 \times 10^4$ cfu/pez, en dosis de 0,1 ml por pez troyano (*shedder*) utilizando jeringa automática Socorex. Los peces troyanos utilizados pertenecen al mismo *batch* que los peces del estudio.

Resultados y Discusión

Muestreo S1

Con el objetivo de caracterizar más profundamente a la población que sería sometida al estudio se evaluaron una serie de parámetros en los peces previo a su distribución (Anexo 4).

- Índices de salud y bienestar: Ambos Índices evaluados, tanto HAI (valor 12,5; bajo 40 es considerado como óptimo) como SWIM (nivel pez; valor 0,98 de un máximo de 1) revelaron puntajes muy buenos tanto para el examen externo como interno de los peces deduciéndose un buen estado de salud y bienestar para la población origen a ser utilizada en el ensayo.
- Índice de aletas para la población origen fue de $11,1 \pm 0,8$; vale decir dentro de rango considerado como óptimo, cuyo valor de referencia es $>10,5$ (Castro et al. 2017). Similarmente el score de aletas tuvo un promedio de 1,4 (rango de 1 a 5 en donde 1 es valor óptimo; aletas menos erosionadas).
- Marcadores plasmáticos de stress (cortisol, lactato y glucosa), se encuentran dentro de los rangos de referencia para la especie (cortisol: $2,2 \pm 0,7$ ng/mL; glucosa: $4,5 \pm 0,4$ mmol/L; lactato: $3,8 \pm 0,5$ mmol/L) (Anexo 4).
- Marcadores tisulares: Se realizó evaluación histológica de corazón, branquias, hígado y piel. Corazón se muestra de estructura conservada en todos los individuos analizados. Las

branquias resultaron en un score de 2,92 para la población evaluada lo que refleja patología no significativa (escala 0 a 24) (Mitchell *et al.*, 2012). Por otro lado, hígado muestra un score de 3,6 para el indicador de degeneración grasa, estando en un nivel moderado (escala 0-5) (Martínez-Rubio *et al.*, 2013); en este órgano no se observa otro tipo de lesión. Piel muestra los siguientes indicadores: células mucosas /100 μm =2,03 y un grosor promedio de epidermis de 35,5 μm .

Al momento de la distribución de los peces en ambos grupos, se pesaron de manera individual. Los pesos promedio de ambos grupos distribuidos en sus estanques para la fase experimental en *hatchery* se muestran en la Tabla 2.

Tanto los pesos como las longitudes, así como las dispersiones dentro de cada grupo son mínimas, asegurándonos así de que ambos grupos comiencen en las condiciones más parecidas posibles. Lo mismo se observó para los marcadores de calidad, salud y bienestar.

Muestreos rutinarios de peso

Los muestreos rutinarios de peso que, como ya ha sido explicado, se realizaron periódicamente para evaluar el crecimiento y buen consumo de alimento por parte de los peces en ambos estanques arrojaron interesantes resultados (ver Tablas 4 y 5).

Las Figs. 17 y 18 muestran la tendencia de evolución de los pesos en ambos grupos, asociados a la velocidad del nado que fue siendo modificada posterior a cada muestreo para mantener los valores deseados en términos de BL/s.

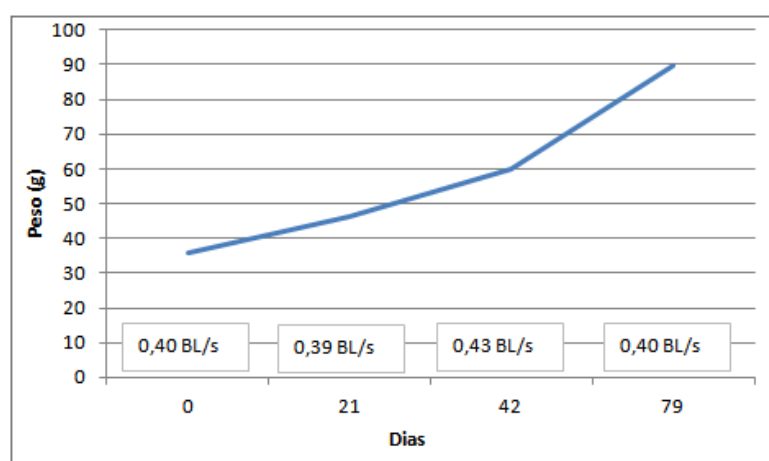


Figura 17. Crecimiento del grupo Control sometido a velocidad promedio de 0,4 BL/s durante la etapa previa al desafío.

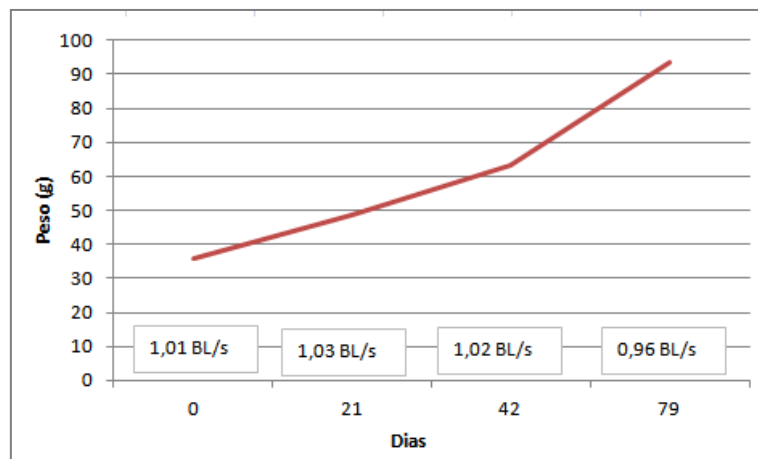


Figura 18. Crecimiento del grupo Ejercicio sometido a velocidad promedio de 1,0 BL/s durante la etapa previa al desafío.

Ya a las tres semanas (día 21) de comenzado el estudio fue posible evidenciar una diferencia significativa entre el grupo Control y el de Ejercicio en términos de peso, efecto que se mantuvo hasta el final de la fase experimental de ejercicio (Fig. 19). La última medición de peso se realizó en cada uno de los peces de ambos grupos ($n=365/\text{grupo}$) al término del periodo experimental, y un día previo al traslado de los peces a su estanque de desafío, en donde se colocaron juntos (previamente marcados) para aclimatarse durante dos semanas previo al desafío con *P. salmonis*.

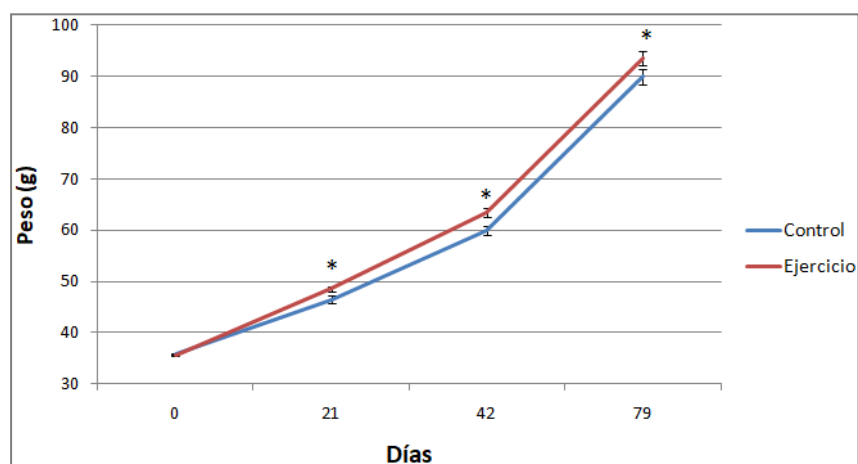


Figura 19. Peso (g) de grupos Control y Ejercicio durante el transcurso del periodo de control de velocidad de nado (días 0 a 79). *representa diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p<0.05$; test de t de Student; $n=50$ (días 21 y 42; $N=365$, día 79). Barras representan error estándar.

Muestreo S2

Como ya se ha señalado previamente, este muestreo consistió solamente en la extracción de tejidos para la evaluación de ATPasa en relación al proceso de esmoltificación (ver Fig. 12).

Muestreo S3

Recordemos que este muestreo se realizó una vez finalizada la etapa experimental en *hatchery*, en donde ambos grupos, C y E, estuvieron sometidos a ambientes controlados en donde la velocidad del agua, y por ende del nado, fue manipulada a valores promedio de 0,4 y 1,0 BL/s, respectivamente.

Índices de salud y bienestar: Ambos Índices evaluados, tanto HAI como SWIM revelaron puntajes muy buenos tanto para el examen externo como interno de los peces deduciéndose un muy buen estado de salud y bienestar en ambos grupos en estudio. Cabe destacar que ambos índices arrojaron valores óptimos para los dos grupos (HAI = 0; SWIM = 1). Se deduce que el mantener a este grupo específico de peces (C) bajo condiciones de sedentarismo no produjo, en estas condiciones de cultivo, una merma en su salud ni en su bienestar. Este resultado destaca además las buenas prácticas de producción y mantención del sistema en general.

Índice de aletas: Si bien el índice de aletas demostró ser buena para ambos grupos ($10,8 \pm 0,3$ y $11,4 \pm 0,3$ para los grupos C y E, respectivamente; Fig. 16), sí se logró observar una clara tendencia, aunque no significativa, hacia un mejor nivel en el grupo E ($p=0,058$; test de t de Student; $n=12$ /grupo; Fig. 16). Este índice es más sensible que los anterior mencionados (HAI y SWIM), los cuales evalúan a los peces más *grosso modo*. Si bien la diferencia fue leve, este resultado se relaciona positivamente con la literatura científica, en donde se ha observado que el ejercicio, al promover el nado en cardumen, puede reducir drásticamente los niveles de agresión dentro de un estanque. lo que se compara positivamente con literatura previa al respecto (Davison, 1997; Planas & Palstra, 2011).

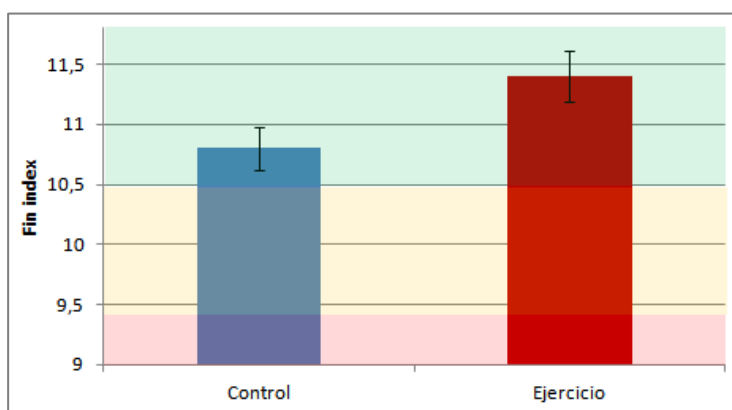


Figura 16. Índice de aletas de peces correspondientes a grupos experimentales. Un índice en el rango $<9,4$ (rojo translúcido) se considera subóptimo o malo, $9,4-10,5$ regular amarillo translúcido) y $>10,5$ se considera óptimo (verde translúcido). Índice promedio de tres aletas medidas: dorsal, anal, pectoral izquierda). $n=12$ peces por grupo. $p\text{-value}$: 0,058 (test de t Student).

Marcadores plasmáticos: En relación a los marcadores plasmáticos de stress (Tabla 6; Anexo 5), se observa una diferencia significativa ($p<0,05$; test de t Student) para la glucosa, teniendo

el grupo Ejercicio un valor mayor que el Control. Sin embargo, ambos grupos se encuentran dentro de los rangos considerados como normales para la especie. El rango de referencia (Laboratorio Pathovet) para la glucosa en salmón del Atlántico va desde 1,3 a 11,2 mmol/L. Para lactato, ambos grupos están dentro de rango, mientras que para cortisol están ambos ligeramente por sobre el rango (máx. de 43 ng/mL) aunque sin diferencias entre los grupos. Esto podría explicarse ya que los peces estaban en pleno proceso de esmoltificación, lo que es sabido eleva los niveles de cortisol para la preparación de los peces al ambiente marino.

Tabla 6. Marcadores plasmáticos de estrés en S3.

Grupo	Cortisol (ng/mL)	Glucosa (mmol/L)	Lactato (mmol/L)
Control	44,6 ± 7,5	7,7 ± 0,1*	3,7 ± 0,2
Ejercicio	43,9 ± 5,6	8,2 ± 0,2	3,6 ± 0,2

n= 12 peces por grupo. *diferencia estadísticamente significativa entre grupos. Se presenta valor promedio ± error estándar.

Biometría: El índice cardiosomático (CSI) no arrojó diferencias entre los grupos Control y Ejercicio ($0,09 \pm 0,001$ para ambos grupos). Si bien la literatura científica ha descrito efectos en este índice en respuesta al ejercicio en el sentido de que en respuesta a la mayor demanda de oxígeno y nutrientes por parte de los tejidos el ventrículo muestra una hipertrofia fisiológica a modo de compensación (Gamperl y Farrel, 2004; Palstra y Planas, 2011; Castro, 2012). Se concluye que la diferencia (o el delta) entre los estímulos de velocidades de nado utilizadas en este estudio no fueron suficientes para estimular una hipertrofia ventricular. Cabe destacar que, en estudios previos ya citados, las velocidades estudiadas en los grupos controles solía ser cercana a cero. Se puede especular entonces que en estudios previos la diferencia entre grupos control y experimental era aún mayor que la estudiada aquí; es decir, nuestro grupo control sometido a una velocidad de nado promedio de 0,4 BL/s fue suficiente para estimular algunos de los efectos del ejercicio en los peces. En este estudio, dicha velocidad Control fue la escogida ya que refleja la situación que ocurre a nivel industria (Castro *et al.*, 2017) y representa la situación basal sobre la cual se quería evaluar los efectos del ejercicio.

El ángulo ventricular fue levemente más bajo en el grupo Ejercicio en comparación al Control, aunque esta diferencia no fue significativa ($45,2 \pm 2,1$ y $43,4 \pm 1,4$ para Control y Ejercicio, respectivamente). La razón entre el alto y ancho del ventrículo tampoco mostró diferencias significativas entre los grupos ($1,13 \pm 0,08$ y $1,30 \pm 0,04$; para Control y Ejercicio, respectivamente), aunque esta no alcanzó a ser significativa ($P\text{-value} = 0,07$; prueba de t-student). Estos dos resultados (ángulo ventricular y razón alto/ancho) si bien no estadísticamente significativos, sí apuntan a la misma dirección en términos de sugerir que, como efecto del ejercicio, los ventrículos se aclimatan hacia una forma más piramidal (similar a

corazón *wild-type* de salmónidos) y menos redondeada (similar a lo que se observa comúnmente en individuos sometidos a sedentarismo). Esta adecuación morfológica se asocia a una mejor eficiencia cardíaca y por ende capacidad de nado (Poppe *et al.*, 2003; Gamperl & Farrell, 2004; Claireaux *et al.*, 2005).

No se observaron diferencias entre los grupos para el indicador RLL (*relative lamellar length*). Los valores fueron de $8,44 \pm 0,35$ y $8,52 \pm 0,19$ para los grupos Control y Ejercicio, respectivamente. Ambos valores se encuentran en la parte alta del rango de valores considerando como óptimo ($>5,7$; rango generado con datos de la industria nacional; Castro *et al.*, 2017). Estudios previos han mostrado que lamelas más largas con relación al largo del pez, se producen en respuesta al ejercicio y generarían una mayor superficie de contacto para el intercambio gaseoso (Anttila *et al.*, 2014). Nuevamente, se podría especular que la velocidad control utilizada en este trabajo fue suficiente para estimular algo de ejercicio en los peces, logrando que la diferencia con el grupo Ejercicio no fuera tan elevada como para estimular cambios a nivel branquial.

Expresión génica (RT-PCR): La extracción del RNA de los tejidos, cuantificación y medición de calidad del RNA, así como la normalización de valores de expresión de genes se llevó a cabo de acuerdo con métodos detallados en (Rozas-Serri *et al.*, 2017). De los 15 genes estudiados con respecto a sus niveles de expresión en S3 mediante RT-PCR, tres mostraron una diferencia significativa entre los grupos (IL15, IL18, MHC class II), con valores más elevados en el grupo Ejercicio en comparación al Control (Fig. 17). En conjunto, estos resultados sugieren que, en ausencia de patógenos, el ejercicio por sí sólo es capaz de modificar la expresión de genes ligados al brazo celular del sistema inmune (Anexo 6).

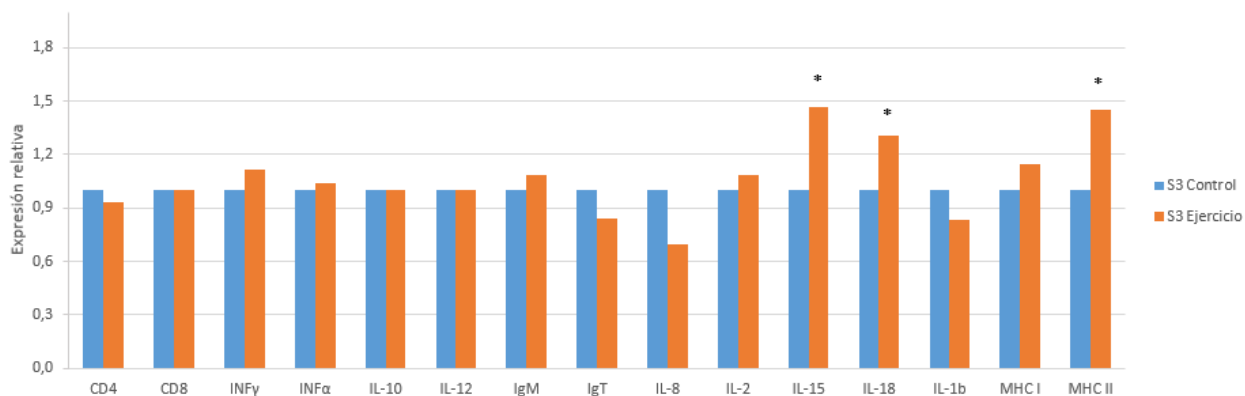


Figura 17. Expresión génica en S3. Se analizó mediante RT-PCR la expresión de 15 genes asociados a la respuesta inmune. El grupo Ejercicio mostró tener niveles más elevados en tres de estos (IL-15, IL-8 y MHC II). *refleja diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados ($p < 0,05$; test de t Student; $n = 12/\text{grupo}$).

Expresión génica (microarreglos): Los análisis de microarreglos se llevaron a cabo en ventrículo cardíaco (muestreo S3) y en riñón anterior (muestréos S3 y S4). Se utilizó el microarreglo desarrollado por Nofima (Salgeno) que contiene 44k 60-mer DNA sondas de oligonucleótidos que abarcan todos los genes codificantes de proteínas identificados en

salmón del Atlántico. Los microarreglos fueron fabricados por Agilent Technologies, mientras que los reactivos y equipamiento provienen del mismo proveedor. Se utilizó el *One-Color Quick Amp Labelling Kit* para la amplificación y marcaje del RNA. El kit *Gene Expression Hybridization* se utilizó para la fragmentación de RNA marcado. El *input* de RNA en cada reacción fue de 500 ng. Luego de una hibridación durante toda la noche (17 horas, 65 °C, velocidad de rotación de 0,01g), los arreglos fueron lavados con *Gene Expression Wash Buffers* 1 y 2 y luego escaneados con escáner de Agilent. Análisis posteriores se realizaron con el sistema informático de Nofima STARS (Krasnov *et al.*, 2011). Normalización global se llevó a cabo igualando las intensidades promedio de todos los microarreglos realizados. A continuación, los valores individuales de cada sonda se dividieron por el valor promedio de todas las muestras que produjeron *expression ratios* (ER). Se calculó y normalizó el log2-ER mediante *Lowess normalization*. Los genes con expresión diferencial (DEG) fueron seleccionados utilizando el criterio $ER > 1,6$ fold; $p < 0,05$.

El ejercicio durante 11 semanas indujo cambios sustanciales en el transcriptoma cardiaco de los peces, en comparación a los peces del grupo control. El número de DEG fue de 522, y más interesante aún, fueron varios los grupos funcionales que mostraron una regulación consistente (Tabla 7). Los resultados sugieren una aclimatación activa por parte del corazón al estímulo de ejercicio por medio de una estimulación de procesos metabólicos celulares, protección y desarrollo del músculo cardiaco. Lo anterior se evidencia por un incremento en el metabolismo del calcio y de lípidos, mientras que la simultánea sobre expresión de genes ligados a proteínas de las miofibras indican una mayor fuerza mecánica del músculo. El control del ciclo celular, así como la transcripción fueron activadas, en conjunto con la transducción de señales sugieren una percepción aumentada de estímulos externos; en este caso fue notorio el aumento de la expresión de múltiples genes relativos al sistema nervioso. La expresión aumentada de una serie de reguladores de diferenciación se observó en conjunto a la estimulación de genes codificantes para varios componentes de la matriz extracelular: glicanos, colágenos y otras proteínas. La sobre expresión de genes relacionados al sistema inmune sugiere una reacción de defensa al estímulo externo de velocidad del agua (especialmente proteínas secretoras incluyendo el sistema del complemento y lectinas), así como al metabolismo de xenobióticos (biotransformación) y estrés celular. Cabe destacar que, en contraste a las respuestas mal adaptativas al estrés, una respuesta de estrés baja a moderada como la observada en este caso, es evidencia de una mayor actividad del tejido y de aclimatación al ambiente.

Tabla 7. Grupos funcionales de genes cuya expresión se vio afectada por el ejercicio. Todas las diferencias mostradas son con respecto al control y estadísticamente significativas.

Grupos – número de genes	Mean fold change*
Metabolism calcium - 6	1.8
Proteases - 10	2.1
Metabolism retinoid - 7	2.9
Metabolism lipid - 13	2.9
Cell cycle - 11	1.8
GTP signaling - 11	1.9
Transcription factors - 9	2.1
Signaling - 22	2.1
Transcription - 5	2.2
Effectors - 6	1.8
Cell Stress - 8	1.8
Metabolism Xenobiotic - 5	2.0
Secretory proteins - 8	2.3
Complement - 7	3.4
Lectins - 5	4.1
Glycans - 5	1.7
Neural system - 22	1.8
Collagens - 24	2.1
Myofiber proteins - 10	2.3
Differentiation - 39	2.3
Extracellular matrix proteins - 15	2.8

*Fold change

Entre aquellos genes que resultaron tener los cambios de expresión más drásticos en corazón (desde 4,6 hasta 13,8 *fold changes*), también se logra observar algunas tendencias interesantes en términos funcionales. De los 20 genes presentes en la Tabla 8, seis corresponden al sistema del complemento incluyendo dos componentes del complejo *C1q* que se adhiere al complejo antígeno-anticuerpo activando el mecanismo clásico del complemento; así como a componentes de mecanismo de las lectinas (también del sistema del complemento): *C-type lectin* y *manose binding protein*. Los dos genes con mayor sobreexpresión en comparación al grupo Control, llamados *G0/G1 switch proteins 2* pueden participar en numerosos procesos celulares, desde la diferenciación de linfocitos hasta la regulación del metabolismo de lípidos (Heckman *et al.*, 2013; Knapp & Gorski, 2017). Cabe destacar que otras dos proteínas de esta lista (*fatty acid binding protein 2* and *perilipin-1*) también están involucradas en el control intracelular del metabolismo de lípidos. Las de éstas se han visto comúnmente co-reguladas y responden al ejercicio tanto en músculo esquelético como en cardíaco (Knapp & Gorski *et al.*, 2017). La regulación de tres genes *retinol binding proteins* sugiere una mayor retención de retinol en el corazón de peces ejercitados. El retinol y sus derivados juegan un rol esencial en el desarrollo y regeneración del corazón (Pan & Baker 2007). La lista incluye otros reguladores del desarrollo como *polycystin*, *semaphorins* y *axin*. *Cyclic AMP-dependent ATF-3*

es un factor de transcripción multifuncional con un rol indispensable en el músculo cardíaco, ya que su disfunción se asocia a hipertrofia patológica, isquemia y fibrosis (Zhou *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2017). En conclusión, la data transcriptómica sugiere un efecto beneficioso del ejercicio en el corazón de salmón del Atlántico; los cambios en el transcriptoma observados son consistentes con la interpretación.

Table 8. Lista de los 20 genes con mayor cambio en su expresión en respuesta al ejercicio en corazón de salmón del Atlántico.

Anotación/mecanismo	Nombre	Fold change*
Calcium metabolism	Ictacalcin-like	5.3
Cell Signaling	Cyclic AMP-dependent ATF-3	4.6
Differentiation	Axin 2	4.6
Differentiation	Polycystin-1	5.1
Differentiation	Semaphorin 5B	5.1
Immunity chemoattractant	Stromal derived cell factor 1	4.7
Immunity antiviral response	Patched domain containing 3	5.8
Immunity, complement	C-type lectin M4, cd209l	5.3
Immunity complement	Complement C1q4-1	6.0
Immunity complement	Complement C1q4-2	5.3
Immunity complement	Complement component C6	5.2
Immunity complement	Complement C4b-B	4.6
Immunity complement	Mannose-binding protein C-like	8.4
Lipid metabolism	Fatty acid binding protein 2	9.2
Lipid metabolism	Perilipin-1	7.6
Lipid metabolism, immunity, apoptosis	G0/G1 switch protein 2-1	13.8
Lipid metabolism, immunity, apoptosis	G0/G1 switch protein 2-2	12.9
Retinoid metabolism	Retinol-binding protein 4-B	6.9
Retinoid metabolism	Retinoid-binding protein 7	6.2
Retinoid metabolism	Retinol binding protein 4, like	5.9

*Fold change del grupo ejercicio con respecto al grupo Control

Los efectos del ejercicio en el transcriptoma del riñón anterior fueron mucho menores y de menor magnitud en el muestreo post-ejercicio (S3), y fueron reducidos aún más posterior al desafío (S4). Un total de 121 y 12 genes fueron diferencialmente expresados de manera significativa entre los grupos en los puntos S3 (respuesta temprana) y S4 (respuesta tardía), respectivamente. No hubo sobreposición de los genes entre ambos muestreos, así como tampoco una clara agrupación de estos en grupos funcionales claros que nos puedan ayudar a sacar conclusiones claras.

Donde sí se observaron diferencias a nivel transcriptómico fue entre los puntos previo a desafío (S3) y respuesta temprana (S4), pero sin agrupar por Control o ejercicio, es decir,

tomando la población entera. En este caso, la infección provocó que 5517 genes tuviesen un cambio en su expresión de más del doble (> 2 fold changes).

Aunque especulativo, lo anterior podría sugerir que el proceso de infección fue de una magnitud tal, que los efectos observados en respuesta al ejercicio a nivel transcriptómico en corazón, así como en otras variables afectadas y ya comentadas en este reporte (mayor peso previo al traslado a agua de mar, un mejor estado de aletas sugere de mayor bienestar y corazones (ventrículos) menos redondeados que sugieren una mejor capacidad cardiorrespiratoria) no fueron suficientes para producir una mejora en la sobrevivencia en este estudio.

Marcadores tisulares- Evaluación histológica: Para ambos grupos en prueba – Control y Ejercicio, se llevó a cabo una colección de muestras involucrando tejidos/órganos como corazón, branquias, hígado y piel. La metodología utilizada fue la estándar de procesamiento histológico. Brevemente, las muestras fueron fijadas en formalina tamponada al 10%, luego enviadas al laboratorio Pathovet para su procesamiento hasta tinción Hematoxilina Eosina, para luego ser analizadas en VESO Chile en forma ciega por nuestra especialista patóloga veterinaria.

En relación con corazón, este se evaluó en su integridad general, y ante eventos de inflamación se evaluaría en base a Finstad *et al.*, 2012.

Respecto a branquias estas se evaluaron según Mitchell *et al.*, 2012, que involucra un completo barrido a este órgano. Esta evaluación resulta en un índice semi-cuantitativo para medir las patologías branquiales; este índice involucra evaluación de hiperplasia lamelar, fusión lamelar, anomalías celulares, edema lamelar, hipertrofia, alteraciones circulatorias y presencia de agentes patógenos.

En cuanto a hígado se evaluó integridad general y se evaluó el grado de infiltración grasa presente de acuerdo con escala según Martínez-Rubio *et al.*, 2013.

Para el caso de piel, se evaluaron 2 indicadores (Fast *et al.*, 2002a, 2002b), a saber: células mucosas/ 100 μm (GC/100 μm) y grosor promedio de epidermis (μm) (área total epidermis/largo total epidermis).

Los datos de histología fueron analizados por Student's t-test, en el software GraphPad Prism 7 (version 7.03, GraphPad Software, Inc.).

Se observó diferencia significativa ($P < 0,01$) en la condición de las branquias de los individuos muestreados (n : 12 por grupo) (Fig.18). El grupo Ejercicio demostró tener una mejor condición con un score promedio de 1,25 en contraste a lo presentado por el grupo Control con un score promedio de 3,08. El puntaje para cada evaluación puede moverse entre 0 a 24, para el caso de la presente evaluación ambos scores se encuentran en el rango 0-3 que refleja patología no significativa.

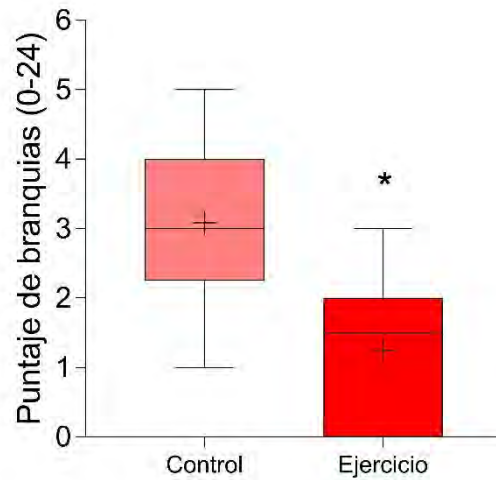


Figura 18. Condición branquial en grupos control y ejercicio.

Igualmente, se observó diferencia significativa ($P < 0,01$) en la condición del hígado para la presentación de infiltración grasa en los grupos en prueba (Fig. 19). En este caso, al igual que el caso anterior, el grupo Ejercicio mostró un mejor *score* promedio correspondiente a 1,33; en tanto, el grupo Control presentó un *score* promedio de 2,33, presentándose una severidad más frecuente en este grupo (Fig. 19).

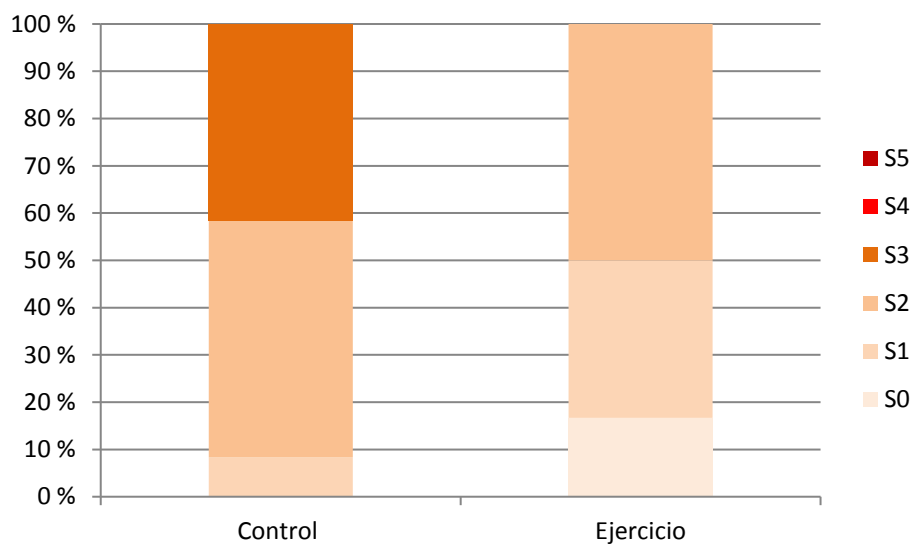


Figura 19. Frecuencia de severidad de lesiones en hígado (cambios grasos), basado en escala de puntaje 0-5.

El puntaje para cada evaluación puede moverse en un rango de 0 a 5, correspondiendo el *score* del grupo Ejercicio (1,33) a una condición de formación de vacuolas que involucra entre 25 a 50% de los hepatocitos y entre 25 a 50% del área de los hepatocitos en forma individual. En tanto el *score* del grupo Control (2,33) corresponde a una condición de formación de vacuolas

que involucra entre 50 a 75% de los hepatocitos y entre 50 a 75% del área de los hepatocitos en forma individual.

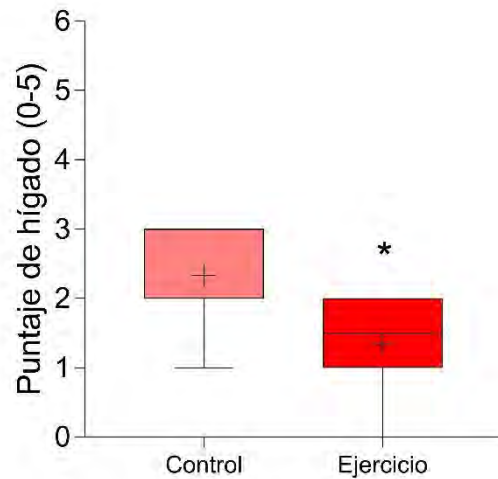


Figura 20. Puntaje promedio en los grupos evaluados. Puntaje menor refleja menor impacto de infiltración grasa en grupo ejercicio ($P<0,01$).

En relación con los demás tejidos/órganos muestreados – corazón y piel – no se observó diferencia significativa entre los grupos evaluados. Corazón en ambos grupos se observa microarquitectura conservada. Piel se observa sin lesiones aparentes y con indicadores que no demuestran diferencia significativa entre los grupos Ejercicio y Control (Fig. 21). El grupo Ejercicio se observa con una cantidad de 2,97 GC/100 μm y un grosor promedio de epidermis de 42,94 μm ; en tanto el grupo control muestra 2,88 GC/100 μm y un grosor promedio de epidermis de 41,52 μm .

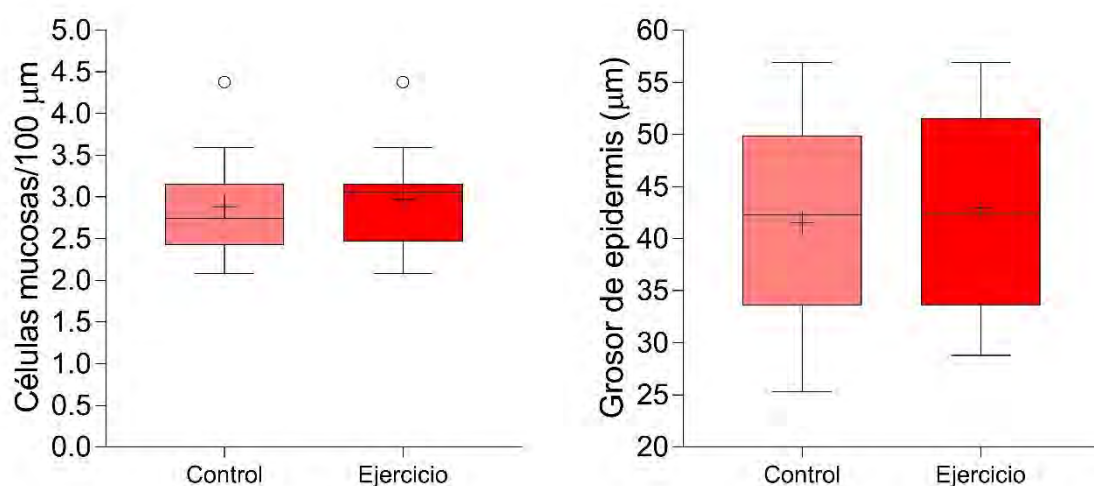


Figura 21. Evaluación de indicadores de piel: Derecha, células mucosas/100 μm ; Izquierda: grosor promedio de epidermis. No se observa diferencia entre grupos.

Desafío por modelo de cohabitación con *P. salmonis*

Como se mencionó en la sección de actividades, en la semana 22/2018 (29.05.2018) se llevó a efecto el desafío en base al modelo de cohabitación, desarrollado por VESO, de los grupos en estudio: Control y Ejercicio. El número de peces fue de 290 y 292 para los grupos Control y Ejercicio, respectivamente, y la temperatura se mantuvo en $15 \pm 1^\circ\text{C}$. Se dio comienzo al desafío al incluir peces troyanos (no pertenecientes a ninguno de los grupos de estudio, pero si al mismo *batch* que éstos). El rol de los peces troyanos fue el de diseminar la infección de un modo similar al natural en el ambiente de las poblaciones en estudio, cumpliendo así un papel únicamente funcional a la infección. El día de inclusión de los troyanos en el estanque clasifica como día "0" del proceso de infección. El modelo de cohabitación ha sido ajustado por VESO Chile en base a la experiencia de nuestra organización matriz en Noruega, logrando repetitividad en los resultados en términos del perfil de la curva de mortalidad tanto en troyanos como en cohabitantes desafiados. Por lo tanto, habiendo logrado una estandarización del modelo como herramienta, es posible aplicarlo con mayor precisión en distintos tipos de ensayo según sea el objetivo de estos. De esta forma la efectividad del modelo se encuentra bajo control. El total de peces desafiados fue de 269 y 273 para Control y Ejercicio, respectivamente, mientras que el número de troyanos fue de 120 (18% del total de peces en el estanque).

El desafío se extendió por un total de 63 días. Los troyanos murieron en un 99,2% (119 de 120). Al final del ensayo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en términos de mortalidad acumulada 70,4% y 75,6% para los grupos Control y Ejercicio, respectivamente (test *log-rank* de Mantel-Cox para determinar diferencia entre los grupos; análisis se llevaron a cabo en el software GraphPad Prism 7 version 7.03, GraphPad Software, Inc.; Fig. 22).

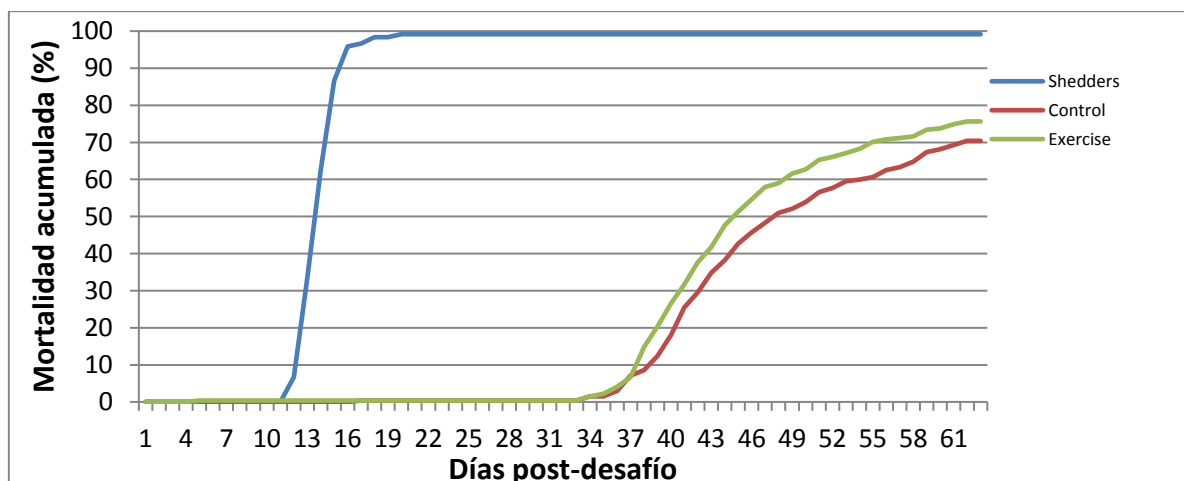


Figura 22. Curvas de mortalidad acumulada en modelo de desafío por cohabitación. El desafío se extendió por 63 días luego de la inoculación e inserción de troyanos en el estanque. No se observaron diferencias significativas en mortalidad acumulada entre los grupos.

Durante el desarrollo del desafío se efectuaron tres muestreos.

- El muestreo S4 (03.07.2018; día 35 post desafío) tuvo por objetivo evaluar la existencia de diferencias a nivel de expresión génica entre los grupos Control y Ejercicio en el momento del comienzo de brote, es decir, en la etapa de respuesta temprana de los peces a la enfermedad.
- El muestreo S5 (17.07.2018; día 49 post desafío) tuvo por objetivo evaluar las diferencias de los grupos, a nivel de expresión génica y de carga bacteriana en el momento en que la pendiente de la curva de mortalidad en el estanque comenzaba a decrecer, es decir, en la etapa tardía de respuesta de los peces a la enfermedad.
- El muestreo S6 (31.07.2018; día 63 post desafío) tuvo como objetivo evaluar a los grupos al momento de término del ensayo, una vez que la curva de mortalidad acumulada ya alcanzaba su nivel *plateau*.

Muestreo S4

- El índice de salud HAI mostró una diferencia significativa entre los grupos, con valores más altos (peores) en el grupo Ejercicio ($95,8 \pm 7$) en comparación al Control ($121,7 \pm 5,8$) al comienzo de las mortalidades por *P. salmonis* (respuesta temprana). Notable es la diferencia en comparación al muestreo anterior (S3), en donde ambos grupos marcaron cero para este índice. Con respecto al índice SWIM, no se vieron diferencias entre los grupos y este también mostró un claro retroceso en comparación al muestreo anterior ($0,89 \pm 0,01$ y $0,88 \pm 0,01$ para Control y Ejercicio, respectivamente). Tampoco se observaron diferencias entre los grupos para el *score* o el índice de aletas (Anexo 7).
- A nivel de marcadores de *stress*, no se observaron diferencias importantes entre los grupos del estudio (Tabla 9). El cortisol siguió alto en ambos grupos por sobre lo considerado como límite máximo normal (Anexo 7).

Tabla 9: Marcadores plasmáticos de *stress* en S4.

Grupo	Cortisol (ng/mL)	Glucosa (mmol/L)	Lactato (mmol/L)
Control	$55,4 \pm 10,2$	$4,2 \pm 0,4$	$3,9 \pm 0,4$
Ejercicio	$45,5 \pm 12,0$	$4,1 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,3$

n= 12 peces por grupo. *diferencia estadísticamente significativa entre grupos. Se presenta valor promedio $\pm$ error estándar

- Si bien hubo un notable incremento en la expresión de los genes estudiados entre el muestreo S3 y el S4 (desde 1,00 hasta 3,03 en Control y desde 1,07 hasta 3,34 en Ejercicio en promedio de los 15 genes), esto es altamente esperado dada el avanzado desarrollo de la enfermedad en S4. Lo que en este estudio interesaba comparar era entre grupos en un mismo tiempo de muestreo. En S4, observamos sólo un gen, de los 15 estudiados, con una expresión diferencial entre los grupos Control y Ejercicio (MHC II). Este hallazgo es bastante aislado y por ende se hace difícil sacar conclusiones sin caer en una sobre-especulación (Anexo 6: S3 y S4).
- Carga bacteriana: De manera simultánea a los análisis de expresión génica mediante RT-PCR, y en los mismos peces, se realizó el estudio de carga bacteriana mediante la misma técnica. No se encontró diferencia significativa entre los grupos Control y Ejercicio.
- Como ya mencionado anteriormente, los microarreglos en S4 resultaron en un bajísimo número de genes diferencialmente expresados entre los grupos (N=12) en riñón anterior, los cuales no se coinciden con los del muestreo anterior (S3), y no se agrupan en ningún grupo o mecanismo/función celular específica.
- A nivel de análisis histopatológico, en hígado se observan cambios inflamatorios (focal y difuso, perivascularitis, pericolangitis asociada). Además, se observan, cambios regresivos caracterizados por focos extensos o aislados de necrosis hepatocelular. Se observa una tendencia a mayor cantidad de casos conservados, i.e. sin cambios (lesiones) en el grupo Ejercicio sobre el Control (3/12 vs 0/12). En riñón se observan cambios inflamatorios caracterizados por una nefritis intersticial con infiltración de mono- y polimorfonucleares, cambios regresivos representados por degeneración hialina tubular principalmente; al igual que en hígado se observa una tendencia a mayor frecuencia de casos conservados en el grupo Ejercicio sobre el Control (2/12 vs 0/12).

Muestreo S5

- En el muestreo S5, realizado durante la etapa tardía del desarrollo de la enfermedad y la curva de mortalidad, los índices de salud y bienestar (HAI y SWIM) no mostraron diferencias entre los grupos (Anexo 8). De igual manera, no se vieron diferencias con respecto al muestreo anterior (S4; respuesta temprana). Los índices de aletas tampoco mostraron diferencias entre grupos.
- Con respecto a los marcadores plasmáticos de estrés (Anexo 8), en S5 no observamos diferencias entre los grupos (Tabla 10). Si se detectó un claro incremento en el nivel de cortisol entre los muestreos S4 y S5 en el promedio del estanque ($51,1 \pm 7,6$ y $106,9 \pm 11,9$ en S4 y S5, respectivamente; $p < 0,05$).

Tabla 10: Marcadores plasmáticos de stress en S5.

Grupo	Cortisol (ng/mL)	Glucosa (mmol/L)	Lactato (mmol/L)
Control	107,6 ± 15,5	3,9 ± 0,5	5,3 ± 1,0
Ejercicio	106,1 ± 19,6	4,5 ± 0,2	4,8 ± 0,2

n= 10 peces por grupo. *diferencia estadísticamente significativa entre grupos. Se presenta valor promedio ± error estándar

- En este muestreo, tampoco observamos diferencias en la carga bacteriana entre los grupos, coincidente con los resultados de mortalidad acumulada en el desafío.

Muestreo S6

- En el muestreo S6, realizado al momento de término del ensayo por cohabitación en peces sobrevivientes los índices de salud y bienestar (HAI y SWIM – Anexo 9) no mostraron diferencias entre los grupos. Como era de esperarse, y dado que se trata de peces sobrevivientes al ensayo, ambos índices fueron claramente mejores que en el muestreo previo. Mientras que en S5 el promedio del estudio fue de 0,89 para SWIM y 101,9 para HAI; los sobrevivientes mostraron valores de 0,96 para SWIM y 50,0 para HAI. Esto refleja que los peces muestreados al final del estudio para ambos grupos ya han logrado sortear con éxito la enfermedad. Lo anterior se ve reflejado en el evidente crecimiento mostrado por los peces sobrevivientes, con promedios de peso de 222 ± 12,2 y 248 ± 17,5 gramos para los grupos Control y Ejercicio, respectivamente (diferencia no significativa). No se observó diferencias en índices o *score* de aletas.
- Con respecto a los marcadores plasmáticos de estrés (Anexo 9), en S6 se repite la tendencia a no observarse diferencias significativas entre los grupos de estudio. Lo que resulta congruente con los resultados en general del desafío en la línea en que no hubo diferencias en la mortalidad. En este caso, y si bien los valores para cortisol y glucosa fueron superiores al muestreo previo, la diferencia no fue significativa (Tabla 11).

Tabla 11: Marcadores plasmáticos de *stress* en S6.

Grupo	Cortisol (ng/mL)	Glucosa (mmol/L)	Lactato (mmol/L)
Control	140,3 ± 44,7	9,1 ± 3,4	5,0 ± 0,8
Ejercicio	126,9 ± 29,6	5,1 ± 0,3	3,6 ± 0,1

n= 8 peces por grupo. *diferencia estadísticamente significativa entre grupos. Se presenta valor promedio ± error estándar.

Conclusiones - Objetivos 1-2 y Actividades relacionadas

En este estudio quisimos analizar los potenciales efectos que tendría sobre la resistencia a SRS el generar smolts con un mayor grado de robustez, para lo cual sometimos a los peces a un programa de ejercicio por nado activo durante la fase de crecimiento en agua dulce. Esto último ya ha demostrado ser una buena manera de aumentar la robustez y bienestar de la población de cultivo resultando en una larga lista de efectos beneficiosos entre los cuales se incluye una mayor resistencia a enfermedades y un mejor crecimiento. En la etapa de generación de robustez, que duró 11 semanas, los peces del grupo Ejercicio mostraron un peso final 4% superior al grupo Control, lo que nos dio luces sobre la concordancia entre este y estudios previos publicados. De igual manera, observamos que el transcriptoma cardíaco (principal órgano afectado por el ejercicio físico) tuvo notables cambios promovidos por el ejercicio, incluyendo sets de genes involucrados en procesos metabólicos, inmunes, de estrés, formación de tejidos, etc. Se destaca que cambios similares habían sido observados para salmón del Atlántico en estudios previos. Otros efectos del ejercicio en este estudio, aunque no estadísticamente significativos, fueron los indicios de un mejor bienestar y robustez sugeridos por los resultados obtenidos en mejores índices del estado de aletas y aquellos relativos a un ventrículo cardíaco con forma más piramidal, lo cual es un resultado conocido del ejercicio en salmónidos y que les otorga una mayor capacidad cardiorrespiratoria. Igualmente, a la evaluación de la microarquitectura de tejidos/órganos – mediante el análisis histológico- en lo que respecta a condición de hígado y branquias se observa diferencia significativa, denotando una mejor condición en el grupo Ejercicio sobre el grupo Control.

Nuestra hipótesis sostiene que esta mayor robustez/bienestar lograda con el ejercicio resultaría en una mejor sobrevivencia frente a un desafío con *P. salmonis*, teniendo en cuenta estudios previos con otros patógenos. Sin embargo, y mediante el modelo de cohabitación efectuado, no se observaron diferencias significativas para la mortalidad acumulada entre los grupos. Esto fue concordante con los muestreos realizados durante y al término del desafío, en

donde prácticamente no se observaron diferencias entre los grupos de estudio -y las que hubo fueron bastante aisladas- incluyendo las respuestas transcriptómicas.

La generación de robustez producida en la etapa de agua dulce fue leve y no habría sido suficiente para lograr una mayor sobrevivencia frente al desafío con *P. salmonis*. Se puede especular que el delta en velocidad de nado entre el grupo Control (0,4 BL/s) y el grupo Ejercicio (1,0 BL/s) no fue el suficiente para ver cambios más drásticos. Si bien la velocidad del grupo Ejercicio está dentro del rango considerado como óptimo para esta especie, la velocidad del grupo Control puede no haber sido lo suficientemente baja como para provocar la nocividad del sedentarismo. Cabe destacar que la velocidad Control aquí utilizada se basó en estudios previos con respecto a las velocidades observadas en pisciculturas comerciales en la industria nacional, y era nuestra intención utilizar este valor, muy bajo en relación a lo considerado óptimo, con el fin de que los resultados fueran aplicables a la industria.

Análisis costo-beneficio

Contexto general del análisis:

Análisis descriptivo de pisciculturas en Chile:

De acuerdo con la información disponible desde las entidades oficiales que regulan la actividad acuícola nacional se presentan los antecedentes más relevantes relativos a ubicación territorial y operación de las pisciculturas destinadas a la producción de peces en Chile,

Se registra otorgamiento de autorización de funcionamiento para pisciculturas a un total de 373 unidades productivas, las cuales se ubican principalmente entre la octava y décimo primera región. Las regiones de Los Lagos, Araucanía, Los Ríos y Aysén son las que poseen en la actualidad la mayor cantidad de pisciculturas otorgadas.

Del total de autorizaciones de funcionamiento otorgadas (n=373 pisciculturas), en promedio operan en mayor o menor medida en Chile alrededor de 180 unidades anuales, lo que corresponde a un 48% del universo total autorizado. Esta operación productiva activa, asociada principalmente a la industria del salmón, se concentra mayoritariamente en la zona sur austral. En este contexto, las regiones de Los Lagos y La Araucanía presentan una operación que representa más del 60% del total de unidades activas a nivel nacional.

Respecto del origen de las fuentes de agua que originalmente generaron la tramitación de solicitud de aprovechamiento de aguas éstas se encuentran distribuidas como se menciona: a) cuerpos de agua del tipo río (44% del total), solicitudes desde fuentes definidas como esteros (23% de total), de origen desde vertientes (14%) y pozo (5% del total), seguida de otras fuentes de menor relevancia. La operación efectiva de muchas pisciculturas y, de acuerdo a los requerimientos productivos, efectúa utilización de diversas fuentes de agua para las diversas etapas del ciclo de crecimiento del salmón en su etapa de agua dulce, utilizando así, matrices de abastecimiento y utilización de líneas separadas por fuente de origen o mezclando fuentes de origen para incrementar volúmenes disponibles o efectuar acondicionamientos para el uso en los peces en base a temperaturas, oxígeno, dureza u otras características propias de cada fuente de abastecimiento.

En relación con las principales regiones asociadas a la crianza de salmón en agua dulce estas variables mencionadas anteriormente presentan los siguientes antecedentes presentando los antecedentes como unidades productivas y no referidas a unidades o biomásas de peces:

- La Región de La Araucanía presenta un promedio de 50 pisciculturas operativas actualmente, representando el 27% de la operación nacional utilizando como fuente de abastecimiento de agua principalmente cuerpos de agua del tipo estero (52%).
- La Región de Los Ríos tiene activas 29 pisciculturas, representando aproximadamente el 11% nacional. La fuente de abastecimiento proveniente principalmente de cuerpos de agua del tipo río (71%).

- La Región de Los Lagos reporta actividad en 85 pisciculturas, representando el 34% de la operación total nacional utilizando mayormente fuentes de agua desde ríos (57%).

- La Región de Aysén presenta 24 pisciculturas operativas que corresponde aproximadamente a un 9,5% del total nacional sin existir una tendencia mayoritaria en el abastecimiento observándose una distribución de cuerpos de agua del tipo estero (29%), río (27%), vertiente (22%) y arroyo (15%) en porcentajes similares.

En relación con las características de las pisciculturas en base a los sistemas de producción para salmón representando alrededor del 80% de la industria (datos inicio 2017), se categoriza según se describe:

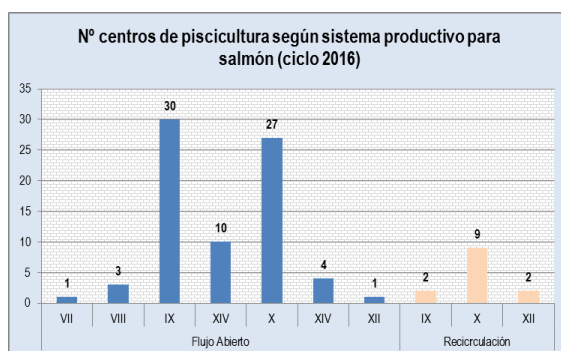


Figura 23. Número de pisciculturas de agua dulce por región y sistema de producción utilizadas en la industria del salmón.

Esta distribución de la industria permite distinguir diferenciales en cuanto a la preponderancia de las fuentes de abastecimiento y a las estrategias productivas, en cuanto que, la utilización de pisciculturas de recirculación por ejemplo, permite incrementar temperaturas y crecimientos con diferentes condiciones de recambios de agua hora y por ende con diferencias en cuanto a robustez y bienestar de los peces.

Regímenes promedio de temperatura

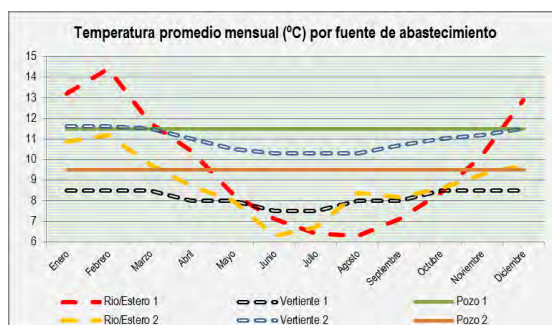


Figura 24. Perfiles de temperaturas mensuales (°C), altas y bajas, por fuente de abastecimiento para pisciculturas.

En el gráfico presentado se observan las características estacionales promedio de perfil de temperaturas utilizadas como fuentes de agua para uso en sistemas productivos de agua

dulce. En el caso de ríos y esteros, al corresponder a aguas superficiales corrientes estas se encuentran sujetas a variaciones asociadas a los regímenes pluviales y/o nivales correspondiente a la zona geográfica y también a la latitud y altitud desde donde son tomadas para su uso.

Para vertientes utilizadas principalmente en la zona más austral las consideraciones de uso se encuentran definidas por su disponibilidad estacional y no siempre se encuentran disponibles para uso en el año completo, muchas veces usadas como complemento a otras fuentes de abastecimiento.

Para el caso de los pozos utilizados por la industria salmonera el perfil térmico está relacionado principalmente a la latitud y profundidad del mismo con una condición de mayor estabilidad en relación a las otras fuentes de abastecimiento.

Análisis de las existencias de peces

La industria del salmón chileno regula su producción en base a la capacidad de uso de sus activos correspondientes a unidades productivas de agua dulce: propias, arrendadas o maquiladas, sus concesiones marinas y a la información de mercado que posee respecto de la comercialización de salmón de cultivo y las condiciones de predicción de pesca respecto de salmón silvestre, lo que finalmente se ve reflejado en la valorización mundial del producto en sus diversos mercados.

Esta observación activa del mercado genera diversas estrategias de las compañías respecto de la producción de los activos biológicos en el tiempo. Debido al largo del ciclo biológico-productivo, la planificación efectuada se genera comúnmente en base a proyecciones de siembra de entre 3 a 5 años previo al inicio del ciclo de producción. Las condiciones específicas de mercado permiten a las compañías efectuar modificaciones en sus planificaciones, generando eliminación de ovas o peces (generalmente en etapas tempranas), para ajustar sus proyecciones a las condiciones de mercado existentes. Es así como, las existencias son reguladas cada año determinando la cantidad de smolts a sembrar en el mar por temporada, lo que permite proyectar las cosechas que se realizarán posteriormente según la especie de cultivo.

A continuación, se presenta la siembra de smolts a los diversos centros de engorda ubicados entre las regiones de Los Lagos y Magallanes para las especies de cultivo en Chile.

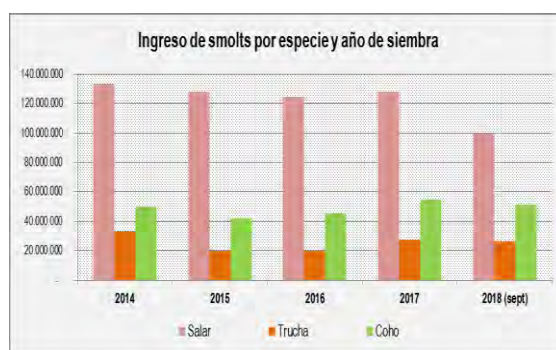


Figura 25. Número de smolts según especie salmonídea ingresados a centros de mar desde diversos orígenes en agua dulce entre los años 2014 a 2018 (sept.).

Para el caso de Salmón del Atlántico, la producción de smolts para siembra proviene desde las diversas pisciculturas caracterizadas en secciones anteriores, correspondiendo desde su origen, aproximadamente a un 70% desde centros de origen con flujo abierto, mientras que el saldo restante desde unidades operativas de recirculación con pesos de siembra que no difieren en el rango, con un promedio de siembra de 140 ± 54 grs. para el primero y 134 ± 56 grs., respectivamente.

Productivamente, en condiciones de agua dulce, las existencias de salmón del Atlántico poseen una pirámide de desarrollo en base a la fecha de obtención de los gametos y los crecimientos obtenidos o programados por las compañías de acuerdo a sus planificaciones pre-establecidas. Es así como se encuentra de manera más o menos estable en los diversos meses del año un stock en cultivo de alrededor de 135-145 millones de alevines y un stock de 35-40 millones de smolts para ser sembrados, generando la estructura de siembra anual de las compañías. Este volumen de producción es sustentado inicialmente con una generación de ovas que llega a los 350-430 millones anuales. De esta forma se generan las diversas clasificaciones de las siembras de smolts de Salmón del Atlántico considerados como de otoño-invierno-primavera y verano según sea el caso, con sus correspondientes regímenes de crecimiento en sus fases de agua dulce basados en las temperaturas existentes en las fuentes de abastecimiento de las pisciculturas utilizadas.

Proyecciones en base a resultados de robustez efectuados

Para efectuar el análisis del efecto del ejercicio sobre el crecimiento de peces en agua dulce se modelaron diferentes escenarios asociados al efecto de la fuente de abastecimiento de agua sobre los niveles de consumo y por ende los crecimientos esperados. Para estos efectos existen algunas consideraciones que fueron establecidas como parte de los antecedentes previos que se describen a continuación:

- Se considera al inicio del ciclo de producción un ingreso de 1.800.000 ovas viables hasta entrega de smolts de 120 gramos.

- b) Se considera como base patrón de análisis una proyección estandarizada de la industria utilizando temperaturas acorde a la etapa del ciclo de crecimiento de los peces para ovas hasta 2-3 gramos con temperaturas de 7°C a 9°C para posteriormente incrementar la temperatura de acuerdo al perfil productivo considerando entre 12 y 15°C de acuerdo a su disponibilidad y región.
- c) Se asume mortalidades mensuales iguales para todas las proyecciones considerando el ciclo productivo propio de la industria con sus manejos correspondientes (graduaciones, vacunaciones, fotoperíodo, despacho a siembra).
- d) El crecimiento establecido para la población en análisis correspondió a un 80% promedio mensual utilizando como indicador del mismo el SGR (Specific Growing Rate).
- e) Los regímenes de temperaturas corresponden a los presentados en el gráfico correspondiente para las distintas fuentes de abastecimiento, considerando valores promedios y representativos de las zonas de cultivo de salmón utilizadas.
- f) No se consideran traslados de peces dentro del ciclo de producción analizado que modifiquen los perfiles de temperatura de acuerdo al abastecimiento de agua establecido por cada análisis.
- g) Se considera en base a los resultados de la prueba ejecutada un promedio de un 2% mensual de crecimiento adicional al proyectado según el modelo 80%.

Tabla 12: Resultados de muestreos de peso para *S. salar* según día de muestreo y grupo de peces.

Muestreo (días)	Control (grs)	Ejercicio (grs)	%
0	35,8	35,7	-0,3
21	46,5	48,5	4,2
42	59,8	63,4	5,7
79	89,9	93,5	3,9

- h) El análisis de modelación del efecto del ejercicio sobre los peces se efectúa a partir de los 5 gramos, peso en que es considerado como condición mínima establecida factible de incrementar los flujos de agua en los estanques de producción para alevines.
- i) Se desarrollan 2 proyecciones de crianza por fuente de abastecimiento de agua en razón de las temperaturas correspondientes a cada mes de cultivo y piscicultura de recirculación.

Tabla 13: Perfil de temperaturas en grados Celsius por mes según fuentes de abastecimiento para pisciculturas en rangos superiores e inferiores de cada uno.

	Rio/Estero 1	Rio/Estero 2	Vertiente 1	Vertiente 2	Pozo 1	Pozo 2
Enero	13,2	10,9	11,6	8,5	11,5	9,5
Febrero	14,4	11,2	11,6	8,5	11,5	9,5
Marzo	11,8	9,8	11,5	8,5	11,5	9,5
Abril	10,4	8,7	11	8	11,5	9,5
Mayo	8,3	8,0	10,5	8	11,5	9,5
Junio	7,1	6,3	10,3	7,5	11,5	9,5
Julio	6,4	6,7	10,3	7,5	11,5	9,5
Agosto	6,3	8,4	10,3	8	11,5	9,5
Septiembre	7,1	8,2	10,7	8	11,5	9,5
Octubre	8,4	8,6	11	8,5	11,5	9,5
Noviembre	10,2	9,3	11,2	8,5	11,5	9,5
Diciembre	12,9	9,7	11,5	8,5	11,5	9,5

Modelo de crecimiento basal:

	Mes 1		Mes 2		Mes 3		Mes 4		Mes 5		Mes 6		Mes 7		Mes 8		Mes 9		Mes 10		Mes 11		Mes 12	
	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2
N° inicial	1.800.000	1.746.000	1.711.080	1.693.969	1.677.030	1.643.489	1.610.619	1.594.513	1.578.568	1.546.996	1.516.057	1.485.735	1.456.021	1.441.460	1.427.046	1.412.775	1.398.648	1.384.661	1.370.815	1.357.106	1.343.535	1.316.665	1.303.498	1.290.463
Peso inicial (gr)	0,15	0,20	0,28	0,37	0,51	0,69	0,94	1,33	1,77	2,35	3,12	4,52	6,54	10,28	15,72	22,71	31,66	39,47	49,21	59,66	71,82	83,19	95,36	108,16
Biomasa inicial (kg)	270	355	472	633	850	1.136	1.517	2.126	2.795	3.636	4.732	6.714	9.527	14.814	22.438	32.079	44.285	54.658	67.461	80.964	96.491	109.536	124.300	139.582
SGR	2,03	2,03	2,03	2,03	2,06	2,06	2,32	1,89	1,89	1,89	2,47	2,47	3,01	2,84	2,45	2,22	1,47	1,47	1,28	1,24	0,98	0,91	0,84	0,84
N° final	1.746.000	1.711.080	1.693.969	1.677.030	1.643.489	1.610.619	1.594.513	1.578.568	1.546.996	1.516.057	1.485.735	1.456.021	1.441.460	1.427.046	1.412.775	1.398.648	1.384.661	1.370.815	1.357.106	1.343.535	1.316.665	1.303.498	1.290.463	1.277.558
Peso final (gr)	0,20	0,28	0,37	0,51	0,69	0,94	1,33	1,77	2,35	3,12	4,52	6,54	10,28	15,72	22,71	31,66	39,47	49,21	59,66	71,82	83,19	95,36	108,16	122,69
Biomasa final (kg)	355	472	633	850	1.136	1.517	2.126	2.795	3.636	4.732	6.714	9.527	14.814	22.438	32.079	44.285	54.658	67.461	80.964	96.491	109.536	124.300	139.582	156.742
Temp. (°C)	7,0	7,0	7,0	7,0	8,0	8,0	9,0	9,0	9,0	9,0	12,0	12,0	15,0	15,0	14,0	14,0	12,0	12,0	11,0	11,0	9,0	9,0	8,0	8,0
Mortalidad %	3,0%	2,0%	1,0%	1,0%	2,0%	2,0%	1,0%	1,0%	2,0%	2,0%	2,0%	2,0%	1,0%	1,0%	1,0%	1,0%	1,0%	1,0%	1,0%	1,0%	2,0%	1,0%	1,0%	1,0%

Considera el uso de vertiente 1 (Gráfico de temperaturas por fuente de abastecimiento) en la fase de incubación hasta el mes 5, mezcla vertiente con río el mes 6 y continuando con uso de río tipo 1 hasta el mes 12. Se considera recepción de ovas en el mes de mayo del año calendario.

Modelo de crecimiento fuente de abastecimiento perfil río 1 (alta temperatura)

a.- Modelo de crecimiento considerando un 80% según programa de alimentación.

	Mes 6	Mes 7		Mes 8		Mes 9		Mes 10		Mes 11	
	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2
N° inicial	1.500.000	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870
Peso inicial (gr)	5,00	6,97	10,48	14,91	21,74	30,10	41,30	55,61	69,40	85,89	102,85
Biomasa inicial (kg)	7.500	10.354	15.409	21.694	31.320	42.936	58.321	77.742	96.063	116.505	138.112
SGR	2,22	2,72	2,35	2,52	2,17	2,11	1,98	1,48	1,42	1,20	1,14
N° final	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442
Peso final (gr)	6,97	10,48	14,91	21,74	30,10	41,30	55,61	69,40	85,89	102,85	122,09
Biomasa final (kg)	10.354	15.409	21.694	31.320	42.936	58.321	77.742	96.063	116.505	138.112	162.312
Temp. (°C)	10,2	12,9	12,9	13,2	13,2	14,4	14,4	11,8	11,8	10,4	10,4
Mortalidad %	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	2,00%	1,00%	1,00%

El peso promedio de los peces alcanza 122,09 gramos al término de los 11 meses de producción.

b.- Modelo de crecimiento considerando un incremento de un 2% mensual al modelo de 80% según programa de alimentación

	Mes 6	Mes 7		Mes 8		Mes 9		Mes 10		Mes 11	
	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2
N° inicial	1.500.000	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870
Peso inicial (gr)	5,00	7,03	10,68	15,32	21,84	30,49	42,16	57,20	71,79	88,68	106,67
Biomasa inicial (kg)	7.500	10.440	15.696	22.294	31.469	43.493	59.546	79.968	99.362	120.291	143.243
SGR	2,27	2,79	2,41	2,36	2,22	2,16	2,03	1,51	1,41	1,23	1,17
N° final	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442
Peso final (gr)	7,03	10,68	15,32	21,84	30,49	42,16	57,20	71,79	88,68	106,67	127,17
Biomasa final (kg)	10.440	15.696	22.294	31.469	43.493	59.546	79.968	99.362	120.291	143.243	169.066
Temp. (°C)	10,2	12,9	12,9	13,2	13,2	14,4	14,4	11,8	11,8	10,4	10,4
Mortalidad %	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	2,00%	1,00%	1,00%

El peso promedio de los peces alcanza 127,17 gramos al término de los 11 meses de producción.

Modelo de crecimiento fuente de abastecimiento perfil río 2 (baja temperatura):

a.- Modelo de crecimiento considerando un 80% según programa de alimentación.

	Mes 6	Mes 7		Mes 8		Mes 9		Mes 10		Mes 11		Mes 12		Mes 13		Mes 14
	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1
N° inicial	1.500.000	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442	1.316.147	1.302.986	1.276.926	1.264.157
Peso inicial (gr)	5,00	6,78	9,19	12,12	16,12	20,93	27,41	35,91	43,87	52,92	61,90	71,93	82,05	93,23	102,12	113,46
Biomasa inicial (kg)	7.500	10.066	13.510	17.641	23.231	29.852	38.711	50.200	60.728	71.784	83.123	95.630	107.992	121.471	130.401	143.429
SGR	2,03	2,03	1,85	1,90	1,74	1,80	1,80	1,34	1,25	1,04	1,00	0,88	0,85	0,61	0,70	0,70
N° final	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442	1.316.147	1.302.986	1.276.926	1.264.157	1.251.515
Peso final (gr)	6,78	9,19	12,12	16,12	20,93	27,41	35,91	43,87	52,92	61,90	71,93	82,05	93,23	102,12	113,46	126,05
Biomasa final (kg)	10.066	13.510	17.641	23.231	29.852	38.711	50.200	60.728	71.784	83.123	95.630	107.992	121.471	130.401	143.429	157.758
Temp. (°C)	9,3	9,7	9,7	10,9	10,9	11,2	11,2	9,8	9,8	8,7	8,7	8,0	8,0	6,3	6,3	6,7
Mortalidad %	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	2,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	2,00%	1,00%	1,00%

El peso promedio de los peces alcanza 126,05 gramos al término de los 14 meses de producción (1ra. quincena).

b.- Modelo de crecimiento considerando un incremento de un 2% mensual al modelo de 80% según programa de alimentación.

	Mes 6	Mes 7		Mes 8		Mes 9		Mes 10		Mes 11		Mes 12		Mes 13	
	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2
N° inicial	1.500.000	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442	1.316.147	1.302.986	1.276.926
Peso inicial (gr)	5,00	6,83	9,33	12,39	16,60	21,69	28,60	37,72	46,32	56,14	65,92	76,89	88,00	100,30	109,84
Biomasa inicial (kg)	7.500	10.143	13.717	18.036	23.921	30.940	40.394	52.736	64.117	76.145	88.519	102.221	115.816	130.689	140.258
SGR	2,08	2,08	1,89	1,95	1,78	1,84	1,84	1,37	1,28	1,07	1,03	0,90	0,87	0,61	0,61
N° final	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442	1.316.147	1.302.986	1.276.926	1.264.157
Peso final (gr)	6,83	9,33	12,39	16,60	21,69	28,60	37,72	46,32	56,14	65,92	76,89	88,00	100,30	109,84	120,29
Biomasa final (kg)	10.143	13.717	18.036	23.921	30.940	40.394	52.736	64.117	76.145	88.519	102.221	115.816	130.689	140.258	152.065
Temp. (°C)	9,3	9,7	9,7	10,9	10,9	11,2	11,2	9,8	9,8	8,7	8,7	8,0	8,0	6,3	6,3
Mortalidad %	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	2,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	2,00%	1,00%

El peso promedio de los peces alcanza 120,29 gramos al término de los 13 meses de producción.

Modelo de crecimiento fuente de abastecimiento perfil vertiente 1 (alta temperatura):

a.- Modelo de crecimiento considerando un 80% según programa de alimentación.

	Mes 6	Mes 7		Mes 8		Mes 9		Mes 10		Mes 11		Mes 12
	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1
N° inicial	1.500.000	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442
Peso inicial (gr)	5,00	7,19	10,35	14,15	19,36	25,80	33,80	43,28	54,62	68,17	84,36	103,08
Biomasa inicial (kg)	7.500	10.681	15.212	20.601	27.899	36.807	47.730	60.516	75.596	92.467	113.289	137.036
SGR	2,42	2,42	2,09	2,09	1,91	1,80	1,65	1,55	1,48	1,42	1,34	1,14
N° final	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442	1.316.147
Peso final (gr)	7,19	10,35	14,15	19,36	25,80	33,80	43,28	54,62	68,17	84,36	103,08	122,36
Biomasa final (kg)	10.681	15.212	20.601	27.899	36.807	47.730	60.516	75.596	92.467	113.289	137.036	161.048
Temp. (°C)	11,2	11,5	11,5	11,6	11,6	11,6	11,6	11,5	11,5	11,0	11,0	10,5
Mortalidad %	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	2,00%	1,00%	1,00%	1,00%

El peso promedio de los peces alcanza 122,36 gramos al inicio de los 12 meses de producción (1ra. quincena).

b.- Modelo de crecimiento considerando un incremento de un 2% mensual al modelo de 80% según programa de alimentación.

	Mes 6	Mes 7		Mes 8		Mes 9		Mes 10		Mes 11		Mes 12
	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1
N° inicial	1.500.000	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442
Peso inicial (gr)	5,00	7,26	10,54	14,53	20,03	26,41	34,83	44,88	56,97	71,50	88,32	108,46
Biomasa inicial (kg)	7.500	10.779	15.491	21.144	28.860	37.678	49.190	62.753	78.848	96.981	118.606	144.188
SGR	2,48	2,48	2,14	2,14	1,84	1,84	1,69	1,59	1,51	1,41	1,37	1,17
N° final	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442	1.316.147
Peso final (gr)	7,26	10,54	14,53	20,03	26,41	34,83	44,88	56,97	71,50	88,32	108,46	129,30
Biomasa final (kg)	10.779	15.491	21.144	28.860	37.678	49.190	62.753	78.848	96.981	118.606	144.188	170.181
Temp. (°C)	11,2	11,5	11,5	11,6	11,6	11,6	11,6	11,5	11,5	11,0	11,0	10,5
Mortalidad %	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	2,00%	1,00%	1,00%	1,00%

El peso promedio de los peces alcanza 129,3 gramos al inicio de los 12 meses de producción (1ra. quincena).

Modelo de crecimiento fuente de abastecimiento perfil vertiente 2 (baja temperatura):

a.- Modelo de crecimiento considerando un 80% según programa de alimentación.

	Mes 6	Mes 7		Mes 8		Mes 9		Mes 10		Mes 11		Mes 12		Mes 13		Mes 14		Mes 15
	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1
N° inicial	1.500.000	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442	1.316.147	1.302.986	1.276.926	1.251.388	1.238.874	1.226.485
Peso inicial (gr)	5,00	6,53	8,53	10,89	13,67	17,16	21,12	25,63	31,11	37,12	44,28	52,22	61,08	70,99	80,97	92,00	104,17	117,61
Biomasa inicial (kg)	7.500	9.701	12.548	15.845	19.696	24.484	29.820	35.836	43.066	50.348	59.462	69.430	80.397	92.494	103.395	115.126	129.059	144.252
SGR	1,78	1,78	1,62	1,52	1,52	1,38	1,29	1,29	1,18	1,18	1,10	1,04	1,00	0,88	0,85	0,83	0,81	0,86
N° final	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442	1.316.147	1.302.986	1.276.926	1.251.388	1.238.874	1.226.485	1.214.220
Peso final (gr)	6,53	8,53	10,89	13,67	17,16	21,12	25,63	31,11	37,12	44,28	52,22	61,08	70,99	80,97	92,00	104,17	117,61	133,83
Biomasa final (kg)	9.701	12.548	15.845	19.696	24.484	29.820	35.836	43.066	50.348	59.462	69.430	80.397	92.494	103.395	115.126	129.059	144.252	162.501
Temp. (°C)	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,0	8,0	8,0	8,0	7,5	7,5	7,5	7,5	8,0
Mortalidad %	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	2,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	2,00%	2,00%	1,00%	1,00%	1,00%

El peso promedio de los peces alcanza 133,83 gramos al inicio de los 15 meses de producción (1ra. quincena).

b.- Modelo de crecimiento considerando un incremento de un 2% mensual al modelo de 80% según programa de alimentación.

	Mes 6	Mes 7		Mes 8		Mes 9		Mes 10		Mes 11		Mes 12		Mes 13		Mes 14	
	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2
N° inicial	1.500.000	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442	1.316.147	1.302.986	1.276.926	1.251.388	1.238.874
Peso inicial (gr)	5,00	6,58	8,65	11,10	14,02	17,70	21,89	26,70	32,57	39,03	46,76	55,38	65,03	75,85	86,81	98,95	112,39
Biomasa inicial (kg)	7.500	9.766	12.716	16.156	20.198	25.251	30.913	37.330	45.080	52.935	62.794	73.624	85.588	98.837	110.850	123.821	139.238
SGR	1,83	1,83	1,66	1,56	1,56	1,42	1,32	1,32	1,21	1,21	1,13	1,07	1,03	0,90	0,87	0,85	0,83
N° final	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442	1.316.147	1.302.986	1.276.926	1.251.388	1.238.874	1.226.485
Peso final (gr)	6,58	8,65	11,10	14,02	17,70	21,89	26,70	32,57	39,03	46,76	55,38	65,03	75,85	86,81	98,95	112,39	127,28
Biomasa final (kg)	9.766	12.716	16.156	20.198	25.251	30.913	37.330	45.080	52.935	62.794	73.624	85.588	98.837	110.850	123.821	139.238	156.102
Temp. (°C)	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,0	8,0	8,0	8,0	7,5	7,5	7,5	7,5
Mortalidad %	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	2,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	2,00%	2,00%	1,00%	1,00%

El peso promedio de los peces alcanza 127,28 gramos al inicio de los 14 meses de producción.

Modelo de crecimiento fuente de abastecimiento perfil pozo 1 (alta temperatura):

a.- Modelo de crecimiento considerando un 80% según programa de alimentación.

	Mes 6	Mes 7		Mes 8		Mes 9		Mes 10		Mes 11		Mes 12
	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1
N° inicial	1.500.000	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442
Peso inicial (gr)	5,00	7,19	10,35	14,15	19,36	25,80	33,80	43,28	54,62	68,17	84,36	103,08
Biomasa inicial (kg)	7.500	10.681	15.212	20.601	27.899	36.807	47.730	60.516	75.596	92.467	113.289	137.036
SGR	2,42	2,42	2,09	2,09	1,91	1,80	1,65	1,55	1,48	1,42	1,34	1,27
N° final	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442	1.316.147
Peso final (gr)	7,19	10,35	14,15	19,36	25,80	33,80	43,28	54,62	68,17	84,36	103,08	124,77
Biomasa final (kg)	10.681	15.212	20.601	27.899	36.807	47.730	60.516	75.596	92.467	113.289	137.036	164.212
Temp. (°C)	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5
Mortalidad %	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	2,00%	1,00%	1,00%	1,00%

El peso promedio de los peces alcanza 124,77 gramos al inicio de los 12 meses de producción (1ra. quincena).

b.- Modelo de crecimiento considerando un incremento de un 2% mensual al modelo de 80% según programa de alimentación.

	Mes 6	Mes 7		Mes 8		Mes 9		Mes 10		Mes 11		Mes 12
	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1
N° inicial	1.500.000	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442
Peso inicial (gr)	5,00	7,26	10,54	14,53	20,03	26,41	34,83	44,88	56,97	71,50	88,32	108,46
Biomasa inicial (kg)	7.500	10.779	15.491	21.144	28.860	37.678	49.190	62.753	78.848	96.981	118.606	144.188
SGR	2,48	2,48	2,14	2,14	1,84	1,84	1,69	1,59	1,51	1,41	1,37	1,30
N° final	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442	1.316.147
Peso final (gr)	7,26	10,54	14,53	20,03	26,41	34,83	44,88	56,97	71,50	88,32	108,46	131,91
Biomasa final (kg)	10.779	15.491	21.144	28.860	37.678	49.190	62.753	78.848	96.981	118.606	144.188	173.610
Temp. (°C)	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5
Mortalidad %	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	2,00%	1,00%	1,00%	1,00%

El peso promedio de los peces alcanza 131,91 gramos al inicio de los 12 meses de producción (1ra. quincena).

Modelo de crecimiento fuente de abastecimiento perfil pozo 2 (baja temperatura):

a.- Modelo de crecimiento considerando un 80% según programa de alimentación.

	Mes 6	Mes 7		Mes 8		Mes 9		Mes 10		Mes 11		Mes 12		Mes 13	
	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2
N° inicial	1.500.000	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442	1.316.147	1.302.986	1.276.926
Peso inicial (gr)	5,00	6,78	9,19	12,12	15,70	19,87	25,15	31,35	38,31	46,82	56,47	67,47	80,01	93,85	109,60
Biomasa inicial (kg)	7.500	10.066	13.510	17.641	22.626	28.351	35.523	43.835	53.029	63.503	75.829	89.693	105.309	122.283	139.955
SGR	2,03	2,03	1,85	1,73	1,57	1,57	1,47	1,34	1,34	1,25	1,19	1,14	1,06	1,03	1,01
N° final	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442	1.316.147	1.302.986	1.276.926	1.251.388
Peso final (gr)	6,78	9,19	12,12	15,70	19,87	25,15	31,35	38,31	46,82	56,47	67,47	80,01	93,85	109,60	127,52
Biomasa final (kg)	10.066	13.510	17.641	22.626	28.351	35.523	43.835	53.029	63.503	75.829	89.693	105.309	122.283	139.955	159.578
Temp. (°C)	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5
Mortalidad %	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	2,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	2,00%	2,00%

El peso promedio de los peces alcanza 127,52 gramos al inicio de los 13 meses de producción.

b.- Modelo de crecimiento considerando un incremento de un 2% mensual al modelo de 80% según programa de alimentación.

	Mes 6	Mes 7		Mes 8		Mes 9		Mes 10		Mes 11		Mes 12		Mes 13	
	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2
N° inicial	1.500.000	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442	1.316.147	1.302.986	1.276.926
Peso inicial (gr)	5,00	6,83	9,33	12,39	16,16	20,57	25,78	32,32	39,69	48,74	59,06	70,88	83,90	98,81	115,84
Biomasa inicial (kg)	7.500	10.143	13.717	18.036	23.283	29.346	36.413	45.181	54.932	66.112	79.316	94.235	110.431	128.744	147.921
SGR	2,08	2,08	1,89	1,77	1,61	1,51	1,51	1,37	1,37	1,28	1,22	1,12	1,09	1,06	1,00
N° final	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435	1.342.870	1.329.442	1.316.147	1.302.986	1.276.926	1.251.388
Peso final (gr)	6,83	9,33	12,39	16,16	20,57	25,78	32,32	39,69	48,74	59,06	70,88	83,90	98,81	115,84	134,62
Biomasa final (kg)	10.143	13.717	18.036	23.283	29.346	36.413	45.181	54.932	66.112	79.316	94.235	110.431	128.744	147.921	168.461
Temp. (°C)	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5
Mortalidad %	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	2,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	2,00%	2,00%

El peso promedio de los peces alcanza 134,62 gramos al inicio de los 13 meses de producción.

Modelo de crecimiento fuente de abastecimiento perfil RECIRCULACIÓN:

a.- Modelo de crecimiento considerando un 80% según programa de alimentación.

	Mes 6	Mes 7		Mes 8		Mes 9		Mes 10	
	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2
N° inicial	1.500.000	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117
Peso inicial (gr)	5,00	7,95	12,15	18,13	26,65	38,26	53,27	71,62	95,07
Biomasa inicial (kg)	7.500	11.800	17.868	26.381	38.394	54.577	75.233	100.137	131.582
SGR	3,09	2,83	2,66	2,57	2,41	2,21	1,97	1,89	1,79
N° final	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435
Peso final (gr)	7,95	12,15	18,13	26,65	38,26	53,27	71,62	95,07	124,36
Biomasa final (kg)	11.800	17.868	26.381	38.394	54.577	75.233	100.137	131.582	168.683
Temp. (°C)	14,0	14,0	14,0	15,0	15,0	15,0	15,0	16,0	16,0
Mortalidad %	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	2,00%

El peso promedio de los peces alcanza 124,36 gramos al inicio de los 10 meses de producción.

b.- Modelo de crecimiento considerando un incremento de un 2% mensual al modelo de 80% según programa de alimentación.

	Mes 6	Mes 7		Mes 8		Mes 9		Mes 10	
	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2	Quincena 1	Quincena 2
N° inicial	1.500.000	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117
Peso inicial (gr)	5,00	8,04	12,43	18,72	27,78	40,26	55,36	74,98	100,23
Biomasa inicial (kg)	7.500	11.938	18.269	27.244	40.034	57.425	78.181	104.833	138.732
SGR	3,17	2,90	2,73	2,63	2,47	2,12	2,02	1,93	1,80
N° final	1.485.000	1.470.150	1.455.449	1.440.894	1.426.485	1.412.220	1.398.098	1.384.117	1.356.435
Peso final (gr)	8,04	12,43	18,72	27,78	40,26	55,36	74,98	100,23	131,21
Biomasa final (kg)	11.938	18.269	27.244	40.034	57.425	78.181	104.833	138.732	177.971
Temp. (°C)	14,0	14,0	14,0	15,0	15,0	15,0	15,0	16,0	16,0
Mortalidad %	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	2,00%

El peso promedio de los peces alcanza 131,21 gramos al inicio de los 10 meses de producción.

Resumen de resultados

En base a las proyecciones efectuadas se determinó el diferencial de crecimiento desde 5 a 120 gramos para *S. salar* en las diferentes condiciones de temperatura para las fuentes de abastecimiento de agua definidas. El mayor diferencial de tiempo observado ocurrió en la condición río 2 (baja temperatura) con 12 días de margen para llegar al peso de smolt establecido. El menor diferencial se encontró en la condición pozo 1 y vertiente 1 (alta temperatura) con 4 días de diferencial seguido de la condición de recirculación con 5 días. Estos resultados son concordantes con la fisiología propia de salmonídeos que, en su condición de poiquiloterms presentan regulación de su metabolismo y fisiología en base a la temperatura del agua. Así la expresión del diferencial de crecimiento se hace más evidente en condiciones de menor crecimiento donde el ciclo se alarga por efecto de una menor expresión de la capacidad de aumento de peso o ingesta de alimento y su correspondiente incremento.

Tabla 14: Fecha de cada condición de abastecimiento de agua para llegar desde los 5 a 120 gramos y diferencial en días de los modelos de crecimiento definidos (comparación al 2 % de crecimiento adicional mensual).

	Fecha 120 gramos	Diferencial al 2%
Rio 1	02-may	7
Rio 1+2%	25-abr	
Rio 2	05-jul	12
Rio 2+2%	23-jun	
Vert 1	23-may	4
Vert 1+2%	19-may	
Vert 2	30-jul	9
Vert 2+2%	21-jul	
Pozo 1	14-may	4
Pozo 1+2%	10-may	
Pozo 2	21-jun	5
Pozo 2+2%	16-jun	
Recirculación	01-abr	5
Recirculación+2%	27-mar	

Los diferenciales de crecimiento a los 120 gramos presentaron valores esperables al valor de la temperatura de cada condición. La primera condición en alcanzar valor de crecimiento correspondió a la modelación de recirculación + 2%, alcanzando el peso con fecha 27/03, esto producto de la estabilidad y valor alto de temperatura utilizada en condiciones de producción, llegando al peso a los 10 meses de cultivo. El menor performance de crecimiento a 120 gramos lo presentó la condición de vertiente 2 (baja temperatura) alcanzando el peso en el modelo con fecha 30/07 con 15 meses de producción desde ovas.

A continuación se presentan las curvas de crecimiento para las diferentes fuentes de abastecimiento de agua consideradas en relación a la curva de crecimiento basal establecida.

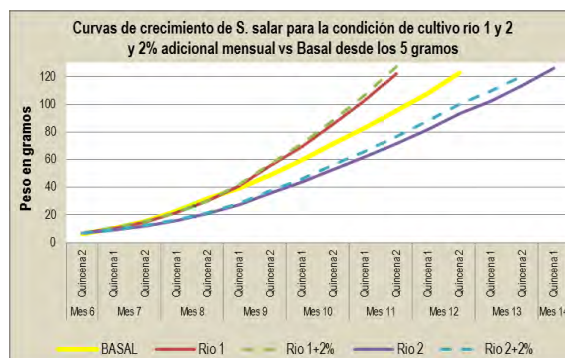


Figura 25. Crecimiento de salmones desde 5 a 120 gramos en condición de crecimiento para fuente de abastecimiento de agua Río 1 (alta temperatura) y Río 2 (baja temperatura), considerando un crecimiento en condiciones de producción modelo basal. Se comparan ambas condiciones con un crecimiento por efecto del ejercicio de un 2 % adicional por mes.

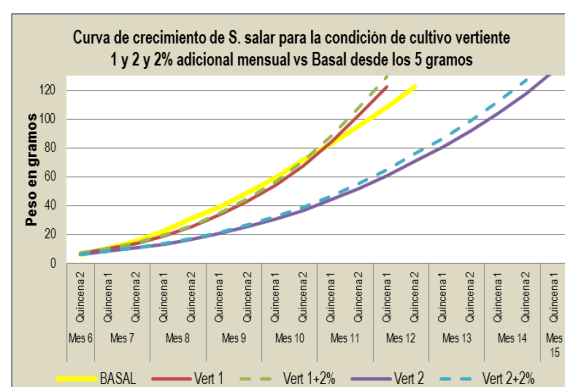


Figura 26. Crecimiento de salmones desde 5 a 120 gramos en condición de crecimiento para fuente de abastecimiento de agua Vertiente 1 (alta temperatura) y Vertiente 2 (baja temperatura), considerando un crecimiento en condiciones de producción modelo basal. Se comparan ambas condiciones con un crecimiento por efecto del ejercicio de un 2 % adicional por mes.

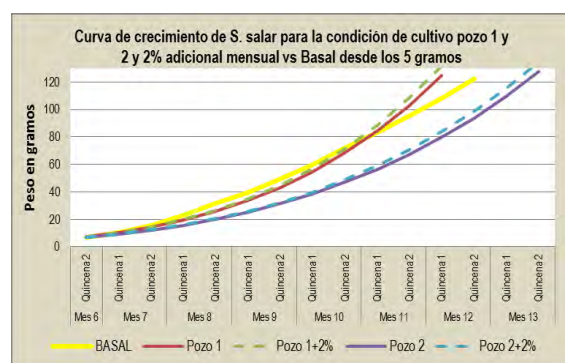


Figura 27. Crecimiento de salmones desde 5 a 120 gramos en condición de crecimiento para fuente de abastecimiento de agua Pozo 1 (alta temperatura) y Pozo 2 (baja temperatura), considerando un crecimiento en condiciones de producción modelo basal. Se comparan ambas condiciones con un crecimiento por efecto del ejercicio de un 2 % adicional por mes.

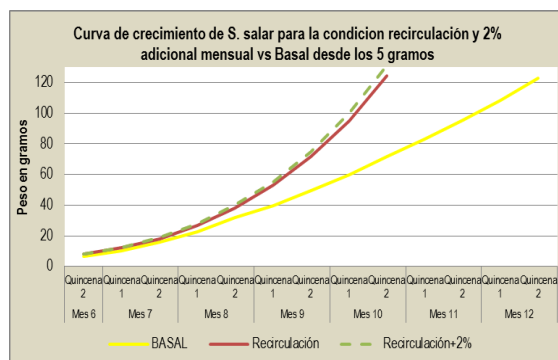


Figura 28. Crecimiento de salmones desde 5 a 120 gramos en condición de crecimiento para fuente de abastecimiento de agua Recirculación, considerando un crecimiento en condiciones de producción modelo basal. Se comparan ambas condiciones con un crecimiento por efecto del ejercicio de un 2 % adicional por mes.

En base a las curvas de crecimiento modeladas se determinó el crecimiento día en la fase final cercana a 120 gramos para determinar, de acuerdo a la fuente de abastecimiento, cuantos gramos incrementaba esta variable en base al SGR mensual. Se determinó el diferencial de crecimiento día entre el grupo con crecimiento normal y con 2% adicional obteniéndose la cantidad de gramos adicionales por día que crecía el grupo con velocidad superior por fuente de agua. Se calculó en base a este crecimiento los días adicionales requeridos por el modelo de menor crecimiento para llegar a 120 gramos comparado con el otro grupo más rápido.

Tabla 15: Crecimiento día, diferencial de crecimiento día por fuente de abastecimiento de agua y modelo de crecimiento. Diferencial de días que requiere el modelo de crecimiento para llegar a 120 gramos comparado con el crecimiento adicional de un 2% mensual.

	Crecimiento día (grs)	Diferencia crecimiento día (grs)	Diferencial días crecimiento
Río 1	1,913	0,063	7
Río 1+2%	1,976		
Río 2	1,082	0,083	12
Río 2+2%	1,165		
Vertiente 1	1,526	0,038	4
Vertiente 1+2%	1,564		
Vertiente 2	1,03	0,07	9
Vertiente 2+2%	1,1		
Pozo 1	1,497	0,07	4
Pozo 1+2%	1,567		
Pozo 2	1,195	0,057	5
Pozo 2+2%	1,252		
Recirculación	2,04	0,06	5
Recirculación+2%	2,1		

El mayor diferencial de crecimiento se observó en Río 2 (baja temperatura), creciendo 0,0083 gramos más por día por el grupo modelado como de mayor crecimiento comparado con el normal. El menor diferencial se presentó en la modelación de Vertiente 1 con 0,0038 gramos por día de mayor crecimiento respecto del normal. Esto es esperable toda vez que la

expresión de crecimiento de los peces se potencia en la medida que la temperatura del agua se hace mayor permitiendo incrementar la fisiología y metabolismo de los peces en cultivo, por ello, por el contrario, al observar el mayor diferencial en el grupo Río 2 (baja temperatura) se denota el efecto de incremento del ejercicio y metabolismo, que, además, en condiciones de menor temperatura de los grupos analizados que se hace más evidente ya que el ciclo productivo se extiende en el tiempo para llegar a los 120 gramos respecto de los demás.

En relación a la valorización productiva se considera el valor promedio de maquila para Salmón del Atlántico en el rango de 110-120 gramos aplicando un valor de crecimiento por gramo de US\$0,0075. Para el análisis de beneficio observado se incorpora el dato de sobrevivencia de peces para el grupo de mayor crecimiento multiplicado por su valor definido anteriormente, entregando el monto total por grupo de producción según cada perfil de temperatura entregada por la fuente de abastecimiento a la piscicultura.

Tabla 16: Valor en \$USD del beneficio por fuente de abastecimiento de agua. Diferencial según los días que requieren para llegar a 120 gramos y el valor promedio por gramo de pez en maquila para S. salar.

	Diferencia crecimiento día (grs)	Diferencial días crecimiento	Valor \$US gramo / pez	Nº peces a 120 grs	Valor \$US diferencial de crecimiento día
Río 1 Río 1+2%	0,063	7	0,0075	1342870	4.442 USD
Río 2 Río 2+2%	0,083	12		1276926	9.539 USD
Vertiente 1 Vertiente 1+2%	0,038	4		1329442	1.516 USD
Vertiente 2 Vertiente 2+2%	0,07	9		1238874	5.854 USD
Pozo 1 Pozo 1+2%	0,07	4		1329442	2.792 USD
Pozo 2 Pozo 2+2%	0,057	5		1276926	2.729 USD
Recirculación Recirculación+2%	0,06	5		1384117	3.114 USD

El mayor beneficio por crecimiento de un 2% de mensual adicional se presenta para aquellos perfiles de temperatura según fuente de abastecimiento de agua para pisciculturas con valores más bajos, considerando a Río 2 (baja temperatura) con un beneficio avaluado en US\$9.539 seguido de Vertiente 2 (baja temperatura) con US\$5.854 por ciclo hasta 120 gramos. El menor beneficio se observa en Vertiente 1 (alta temperatura) con un monto de US\$1.516 por ciclo a 120 gramos.

La implementación de la mejora en la condición de los peces respecto a robustez o ejercicio dependería de la capacidad de las pisciculturas de incrementar sus flujos de agua en los diversos sectores utilizados con las poblaciones de salmones en etapa de crianza. Generalmente las solicitudes de autorización de uso de agua para la operación de las pisciculturas consideran entre 1,1 a 1,3 recambios hora con un margen de seguridad de un 20

a 30%, es decir, la potencialidad de efectuar 1,3 a 1,6 recambios de agua completas por hora de funcionamiento.

La realidad no necesariamente se ve reflejada con esta realidad respecto de las solicitudes ya que, muchas veces se observan restricciones en las instalaciones debido a, 1) falta de flujo por disminución de los aportes de abastecimiento en determinadas épocas del año, 2) fallas en los flujos de agua internos de las líneas de distribución, 3) alteraciones en la calidad del agua por modificaciones ambientales durante el año, u otras relacionadas con la fuente de abastecimiento o, 4) por incremento de las densidades por aumento en la carga de peces producidos en las unidades de producción por motivos logísticos y/o productivos.

Estas situaciones asociadas a la condición productiva chilena lleva muchas veces a las diversas compañías a efectuar modificaciones en sus planes productivos trasladando peces desde una condición de riesgo (ej. alta densidad, falta de agua, otra) a condiciones de menor riesgo para salvaguardar sus activos biológicos, generándose una malla compleja de uso de infraestructura por diversas empresas y peces compartiendo agua, instalaciones, personas, equipos, enfermedades, medios de transporte, entre otros. Muchos de los factores mencionados anteriormente, no pueden ser manejados de manera óptima por las empresas salmoneeras que requieren de instalaciones para la crianza de salmones en agua dulce y efectúan procesos de arriendo o maquila para poder cumplir con sus planes productivos.

La disminución de tiempos de estadía en las pisciculturas con los beneficios estimados en la tabla presentada anteriormente produciría efectos positivos en el tiempo respecto a la eficiencia financiera de la producción de smolts en condiciones de agua dulce para la variable robustez o ejercicio. La constante evaluación de los flujos de agua en las matrices principales de las pisciculturas aseguraría la correcta implementación del incremento de flujo para, estimular o, pasivamente incrementar el nivel de ejercicio a través del nado de los peces en las diversas condiciones de cultivo, manteniendo los recambios de agua por hora adecuados para cada etapa del ciclo.

La incorporación de sensores que permiten medir la cantidad de agua que atraviesa una tubería (flujómetros o caudalímetros) será variable dependiendo de la ingeniería o piping de cada piscicultura, existiendo tantas posibilidades como diseños de salas, distribución de estanques o sistema productivo implementado por las compañías. Las unidades de medida en el sistema internacional son m^3/s , siendo otras unidades habituales l/s y l/min que es la relación entre volumen de agua y el tiempo que demora en pasar por una distancia establecida. El caudal depende de diversos factores, principalmente de la sección de tubería y la presión de suministro.

El valor promedio de equipos de diferentes proveedores y/o distribuidores y que se pueden incorporar y/o ajustar a las tuberías principales de distribución, que miden y, algunos, entregan la información *on line* a un equipo centralizado se encuentran en valores promedio de US\$3.500 por equipo.

Como se mencionó, las necesidades de equipos dependerá de las condiciones propias de las pisciculturas, considerándose en general que desde una bocatoma nacen uno o dos

entubamientos que canalizan el agua y la hacen pasar por los diversos sistemas de remoción de hojas, sólidos, gases, incorporación de oxígeno y otros para después de llegar a un estanque matriz de acumulación donde el agua se distribuye a través de 2 o 3 tuberías principales hacia los diversos sectores de producción. En general, todas las áreas de producción y las unidades individuales mínimas (estanques, bateas, incubadoras) son reguladas en sus ingresos de agua por válvulas de flujo o flautas que regulan altura de agua en estanques, que permiten modificaciones de manera constante adecuándose a los requerimientos necesarios para cada etapa de producción de los peces.

A continuación se presenta el análisis de la implementación de caudalímetros en diversas condiciones de distribución por unidad de tuberías matrices de distribución en las pisciculturas considerando la implementación entre 1 a 4 equipos.

Tabla 17: Diferencial en dólares entre el beneficio por ejercicio con crecimiento adicional de un 2% mensual en un ciclo de crianza respecto de la implementación de diversas unidades de caudalímetros por piscicultura.

	Valor beneficio	Valor caudalímetro	Diferencial beneficio / costo equipo			
			1 equipo	2 equipos	3 equipos	4 equipos
Rio 1+2%	4.442 USD	3.500 USD	942 USD	-2.558 USD	-6.058 USD	-9.558 USD
Rio 2+2%	9.539 USD		6.039 USD	2.539 USD	-961 USD	-4.461 USD
Vertiente 1+2%	1.516 USD		-1.984 USD	-5.484 USD	-8.984 USD	-12.484 USD
Vertiente 2+2%	5.854 USD		2.354 USD	-1.146 USD	-4.646 USD	-8.146 USD
Pozo 1+2%	2.792 USD		-708 USD	-4.208 USD	-7.708 USD	-11.208 USD
Pozo 2+2%	2.729 USD		-771 USD	-4.271 USD	-7.771 USD	-11.271 USD
Recirculación+2%	3.114 USD		-386 USD	-3.886 USD	-7.386 USD	-10.886 USD

En base a los resultados expresados en la tabla anterior y, considerando las condiciones de producción relacionados al largo de los ciclos para cada condición de abastecimiento de agua, se presenta la comparación del beneficio del ejercicio con un crecimiento mayor del 2% adicional mensual en base al tiempo requerido para pasar de 5 a 120 gramos versus la utilización de 2 o 3 equipos de medición que permita observar e implementar el incremento de caudal en las diversas unidades de crianza dependiente de la etapa en que se encuentren los activos biológicos.

Tabla 18: Duración de ciclo de producción desde 5 a 120 gramos, cantidad de ciclos por año, según condición de fuente de abastecimiento de agua. Relación al valor de compra de equipos caudalímetros para ajustar el gasto y beneficio de crecimiento del 2% por ejercicio a \$0 en ciclos y meses. Obs.: ciclos incluyen 45 días de no uso por descanso, condición ambiental, sanitaria, desinfección u otra.

	Duración ciclo (meses)	Ciclos por año	Valor 2 equipos (US\$)	Ciclos para valor 0	Meses para valor 0	Valor 3 equipos (US\$)	Ciclos para valor 0	Meses para valor 0
Río 1+2%	5,3	1,8	7000	1,58	8,4	10.500	2,4	12,5
Río 2+2%	7,5	1,3		0,73	5,5		1,1	8,3
Vertiente 1+2%	5,8	1,6		4,62	26,8		6,9	40,2
Vertiente 2+2%	8,3	1,2		1,20	9,9		1,8	14,9
Pozo 1+2%	5,7	1,7		2,51	14,3		3,8	21,4
Pozo 2+2%	7,3	1,4		2,57	18,7		3,8	28,1
Recirculación+2%	4,4	2,0		2,25	9,9		3,4	14,8

En aquellas fuentes de abastecimiento de agua en donde el beneficio de mayor crecimiento se expresa de manera más evidente en cuanto al valor en dólares por incremento de crecimiento en gramos/día (Río 2 y Vertiente 2 - baja temperatura), la amortización de la compra de equipos se efectúa en menor cantidad de meses. Así para la compra de 2 equipos en la fuente Río 2, por ejemplo, esto se produce a los 5,5 meses del primer ciclo de producción de smolts de 120 gramos y, para el caso de compra de 3 equipos, esto se produce a los 0,8 meses del segundo ciclo de producción de smolts (incluyendo al 1er. ciclo). En la medida que las temperaturas de abastecimiento se van incrementando el diferencial de crecimiento de los peces por efecto del ejercicio se hace menos evidente y por ende la amortización de la compra de equipos se extiende en el tiempo. En la medida que las pisciculturas son capaces de producir mayor cantidad de ciclos de peces por año la amortización se ve favorecida como por ejemplo en las pisciculturas de recirculación.

La evaluación económica basada en la Tasa Interna de Retorno considerando las variables de tiempo en 3 años y una tasa de descuento del 10% para las inversiones consideradas en 2 o 3 equipos se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 19: Tasa interna de retorno según las diversas fuentes de abastecimiento para las inversiones de pisciculturas en 2 o 3 equipos caudalímetros implementados para incrementar el ejercicio en peces incrementando en 2% el crecimiento mensual.

	TIR	
	2 equipos	3 equipos
Rio 1+2%	156%	105%
Rio 2+2%	232%	161%
Vertiente 1+2%	39%	15%
Vertiente 2+2%	138%	92%
Pozo 1+2%	93%	57%
Pozo 2+2%	73%	42%
Recirculación+2%	123%	80%

Todas las evaluaciones entregan TIR positivas para la tasa de rentabilidad exigida a la inversión obteniéndose resultados que permiten aceptar la inversión para los escenarios establecidos. Los mayores valores se encuentran en la condición de Río 1 y 2 (alta y baja temperatura), seguido de Vertiente 2 (baja temperatura).

Referencias

- Adams SM, Brown AM, Goede RW (1993) A quantitative health assessment index for rapid evaluation of fish condition in the field. *Transactions of the American Fisheries Society* 122(1): 63-73
- Anttila K, Jaevilehto M, Manttari S (2008) The swimming performance of brown trout and whitefish: the effects of exercise on Ca²⁺ handling and oxidative capacity of swimming muscles. *J Comp Physiol B* 178: 465-475
- Anttila K, Jørgensen S, Casselman M, Timmerhaus G, Farrell, AF, Takle H (2014) Association between swimming performance, cardiorespiratory morphometry and thermal tolerance in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Frontiers in Marine Science* doi: 10.3389/fmars.2014.00076
- Castro V, Grisdale-Helland B, Helland SJ, *et al.* (2011) Aerobic training stimulates growth and promotes disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 160(2): 278-290
- Castro V, Grisdale-Helland B, Helland SJ, *et al.* (2013) Cardiac molecular acclimation mechanisms in response to swimming-induced exercise in Atlantic salmon. *Plos One* 8(1): e55056. doi:10.1371/journal.pone.0055056
- Castro V, Grisdale-Helland B, Jørgensen S, *et al.* (2013b) Disease resistance is related to inherent swimming performance in Atlantic salmon. *BMC Physiology* 13(1): 1-12
- Castro V, Meixner D, Ibieta P, Hausdorf MA, Tapia V, Venegas C (2017) Estandarización de metodologías para la evaluación de la calidad, bienestar y robustez de smolts de salmon del Atlántico. Informe Final Proyecto 15BPE-47217, Programa Bienes Públicos Estratégicos para la Competitividad, CORFO. 288 pp.
- Claireaux G, McKenzie DJ, Genge AG, Chatelier A, Aubin J, Farrell AP (2005) Linking swimming performance, cardiac pumping ability and cardiac anatomy in rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* 208: 1775-1784
- Cousins KL, Farrell AP, Sweeting RM, Vesely DL, Keen JE (1997) Release of atrial natriuretic factor prohormone peptides 1–30, 31–67 and 99–126 from freshwater and seawater acclimated perfused trout (*Oncorhynchus mykiss*) hearts. *J. Exp. Biol.* 200: 1351-1362
- Davie PS, Wells RMG, Tetens V (1986) Effects of sustained swimming on rainbow trout muscle structure, blood oxygen transport, and lactate dehydrogenase isozymes: Evidence for increased aerobic of white muscle. *J Exp Zool* 237: 159-171
- Davison W. (1997) The Effects of exercise training on teleost fish, a review of recent literature. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 117(1): 67-75
- Farrell AP, Johansen JA, Steffensen JF, Moyes CD, West TG, *et al.* (1990) Effects of exercise training and coronary ablation on swimming performance, heart size, and cardiac enzymes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Can J Zool* 68: 1174-1179

- Farrell AP, Johansen JA, Suarez RK (1991) Effects of exercise-training on cardiac performance and muscle enzymes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol Biochem* 9: 303-312
- Fast MD, Ross NW, Mustafa A, Sims DE, Johnson SC, Convoy GA, Speare DJ, Johnson G, Burja JF (2002a). Susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Atlantic salmon *Salmo salar* and coho salmon *Oncorhynchus kisutch* to experimental infection with sea lice *Lepeophtheirus salmonis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 52: 57-68.
- Fast MD, Sims DE, Burka JF, Mustafa A, Ross NW (2002b). Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 132: 645-657.
- Finstad OW, Falk k, Lovoll M, Evensen O, Rimstad E (2012). Immunohistochemical detection of piscine reovirus (PRV) in hearts of Atlantic salmon coincide with the course of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI). *Veterinary Research*, 43: 27
- Gallaugh PE, Thorarensen H, Kiessling A, Farrell AP (2001) Effects of high intensity exercise training on cardiovascular function, oxygen uptake, internal oxygen transport and osmotic balance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during critical speed swimming. *J Exp Biol* 204: 2861- 2872
- Gamperl AK, Farrell AP (2004) Cardiac plasticity in fishes: environmental influences and intraspecific differences. *J Exp Biol* 207: 2539-2550
- Gleeson M (2007) Immune function in sport and exercise. *Journal of Applied Physiology* 103: 693-699
- Heckmann BL, Zhang X, Xie X, Liu J (2013) The G0/G1 switch gene 2 (G0S2): regulating metabolism and beyon., *Biochimica et biophysica acta* 1831: 276-281
- Hochachka PW (1961) The effect of physical training on oxygen debt and glycogen reserves in trout. *Can J Zool* 39: 767-776
- Hoyle I, Oidtmann B, Ellis T, Turnbull J, Nikolaidis J, Knowles TG (2007) A validated macroscopic key to assess fin damage in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 270: 142-148
- Jobling M, Baardvik BM, Christiansen JS & Jørgensen E H (1993) The effects of prolonged exercise training on growth performance and production parameters in fish. *Aquaculture International* 1(2): 95-111
- Knapp M, Gorski J (2017) The skeletal and heart muscle triacylglycerol lipolysis revisited. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society* 68: 3-11
- Krasnov A, Timmerhaus G, Afanasyev S, Jorgensen SM (2011) Development and assessment of oligonucleotide microarrays for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comparative biochemistry and physiology. Part D, Genomics & proteomics* 6: 31-38
- Martínez-Rubio L, Morais S, Evensen Ø, Wadsworth S, Vecino JG, Ruohonen K, Bell JG, Tosher DR (2013). Effect of functional feeds on fatty acid and eicosanoid metabolism in liver and head

kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar*) with experimentally induced Heart and Skeletal Muscle Inflammation (2013). *Fish and Shellfish Immunology*, 34: 1533-1545.

Mathur N, Pedersen BK (2008) Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation. *Mediat Inflamm*: doi:10.1155/2008/109502

Mitchell SO, Baxter EJ, Holland C, Rodger HD (2012). Development of a novel histopathological gill scoring protocol for assessment of gill health during a longitudinal study in marine-farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture International* 20:813-825.

Palstra AP, Planas JV (2011) Fish under exercise. *Fish physiology and biochemistry* 37: 259-272

Pan J, Baker KM (2007) Retinoic acid and the heart, *Vitamins and hormones* 75: 257-283

Person-Le Ruyet, J, Le Bayon N, Gros S (2007) How to assess fin damage in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*? *Aquatic Living Resources* 20: 191-195

Pettersen JM, Bracke MBM, Midtlyng PJ, Folkedal O, Stien LH, Steffanak H, Kristiansen TS (2013) Salmon welfare index model 2.0: An extended model for overall welfare assessment of caged Atlantic salmon, based on a review of selected welfare indicators and intended for fish health professionals. *Reviews in Aquaculture*: doi.org/10.1111/raq.12039

Rozas-Serri M, Peña A, Arriagada G, Enriquez R, Maldonado L (2017) Comparison of gene expression in post-smolts Atlantic salmon challenged by LF-89-like *Piscirickettsia salmonis* isolates reveals differences in the immune response associated with pathogenicity. *Journal of Fish Diseases* DOI: 10.1111/jfd.12756

Sehring IM, Jahn C, Weidinger G (2016) Zebrafish fin and heart: what's special about regeneration?. *Current opinion in genetics & development* 40: 48-56

Sharma V, Dogra N, Saikia M, Khullar (2017) Transcriptional regulation of endothelial-to-mesenchymal transition in cardiac fibrosis: role of myocardin-related transcription factor A and activating transcription factor 3, *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 95: 1263-1270

Stien LH, Bracke MBM, Folkedal O, Nilsson J, Oppedal F, Torgersen T, Kittilsen S, Midtlyng PJ, Vindas MA, Øverli Ø, Kristiansen TS (2013) Salmon Welfare Index Model (SWIM 1.0): a semantic model for overall welfare assessment of caged Atlantic salmon: review of the selected welfare indicators and model presentation. *Reviews in Aquaculture*: doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01083

Thorarensen H, Gallagher PE, Kiessling AK, Farrell AP (1993) Intestinal blood-flow in swimming chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* and the effects of hematocrit on blood-flow distribution. *J Exp Biol* 179: 115-129

Tucker VA (1970) Energetic cost of locomotion in animals. *Comp Biochem Physiol* 1970, 34: 841-846

Zhou H, Li N, Yuan Y, Jin YG, Guo H, Deng W, Tang QZ (2018) Activating transcription factor 3 in cardiovascular diseases: a potential therapeutic target. *Basic research in cardiology* 113: 37

Anexo 1



Veterinary Certificate

Nº de Certificado/
Certificate number:

Country-initials			Initials (vet.)		Serialnumber		Year	
I	C	E	G	J	0	8	1	7



CERTIFICADO SANITARIO PARA OVAS Y GAMETOS DE SALMÓNIDOS DESTINADAS A CHILE

SANITARY CERTIFICATE FOR SALMONID EGGS AND GAMETES DESTINED TO CHILE

I. Aspectos generales/General aspects:

Autoridad oficial/Official Authority: Icelandic Food and Veterinary Authority, Veterinary services	País de origen/Country of Origin: ISLANDIA
Exportador/Exporter: Stofnfiskur Ltd.	Dirección/Address: Staðarberg 2-4 221 Hafnarfjörður Islandia Teléfono - Fax/Telephone - Fax: (+354) 564 6300 / (+354) 564 6301 Dirección electrónica/e-mail address: fiskur@stofnfiskur.is
Consignatario/Consignee: EWOS Chile Alimentos Ltda	Dirección/Address: c/o Mr. Alberto Jimenez Cargill Innovation Center, Bahaia Colaco Colaco Rural, Tenth Reg. CHILE Teléfono - Fax/Telephone - Fax: (+ 56) (9) 7387 5812 Dirección electrónica/e-mail address:

II. Descripción de la mercancía/Description of commodity:

Especie/Species: Salmón Atlántica/Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i> L.)
Cantidad (Nº de ovas/l y Litros/Quantity (Nº eggs/l and Liters): 6.000/l and 2,5 litros ovas (totally 15.000 ovas)
Centro de cultivo de origen/Farm of Origin: Vogavík (approval nº: FE-1075 / IS-36076)



Means of transport: KEF-JFK-SCL: Flight FI 615/LA 533 with arrival in Santiago on **July 20th 2017.**
Air Waybill No.: 108-2821-2704.

III. Declaración Zoosanitaria/Sanitary attestation:

El infrascrito certifica que las ovas o gametos anteriormente descritos cumplen con los siguientes requisitos / The undersigned certify that eggs or gametes described above satisfy the following requirements:

- Las ovas o gametos se encuentran libres de las siguientes enfermedades y de sus agentes causales, conforme al procedimiento descrito en:**

The eggs or gametes are free of the following diseases and their causal agents in accordance with the procedure described in:

ENFERMEDAD DISEASE									
Niveles Level	VHS	IHN	EHN	SAV	PMCV	ISAV		IPNV	BKD
						Supresión en la HPR	HPR0		
País libre Country free of			Si Yes						
Compartimento libre Compartment free of	Si Yes	Si Yes		Si Yes	Si Yes	Si Yes		Si Yes	Si Yes
Chequeo individual de reproductores Individual screening							Si Yes		

- En el centro de cultivo de origen de los reproductores y en el de incubación, no se registró signo de enfermedad de etiología desconocida ni caso alguno de mortalidad no explicada en los últimos ses meses.**

At the farm of origin of the broodstock and at the hatchery, no sign of disease of unknown etiology was detected in the last 6 months.

- Las aguas que abastecen al centro de incubación sólo son procedentes de fuentes o pozos naturales o artificiales sin poblaciones naturales de peces o son sometidas a algún tratamiento que asegura la destrucción de agentes patógenos causantes de las enfermedades indicadas en los punto 1.**

The water supply to the hatchery only originates from natural or artificial sources or wells without natural fish populations or is subject to certain treatment that guarantees the destruction of pathogenic agents that cause diseases indicated in number 1.

- Existe una barrera natural o artificial que impide la migración de los peces de las secciones inferiores del río hasta el centro de incubación o hasta su centro de aprovisionamiento de agua, según corresponda.**

There is a natural or artificial barrier that prevents the migration of fish from the lower river sections to the hatchery or to its water supply center, whichever applies.

5. Las ovas fueron desinfectadas de acuerdo a los procedimientos indicados en el Manual de Pruebas Diagnósticas de para los Animales Acuáticos de la Organización Mundial de Sanidad Animal, en las siguientes oportunidades:

The eggs were disinfected according to the procedures described in the Manual of the Diagnostic Tests for Aquatic Animals, World Organization for Animal Health, in the following opportunities:

- a. En el centro de incubación de origen, inmediatamente después del endurecimiento y antes de ser dispuestas en agua corriente libre de agentes patógenos; y

At the hatchery of origin, immediately following hardening and prior to their disposal in running water free from pathogenic agents; and,

- b. Dentro de las 48 horas previas al embarque.

Within 48 hours prior to shipment.

IV. Observaciones:

Los centros de cultivo de Stofnfiskur HF denominados **Kalmanstjörn** y **Vogavík** son abastecidos exclusivamente por agua dulce, agua salobre y agua salada bombeada de pozos profundos, libres de patógenos y que no contienen poblaciones de peces silvestres.

Nombre:

GÍSLI JÓNSSON

Name:

Profesión:

Veterinary Officer for Fish Diseases

Profession:

Institución:

Icelandic Food and Veterinary Authority
- Veterinary services -

Institution:

Lugar de expedición:

Selfoss, Islandia

Place of issue:

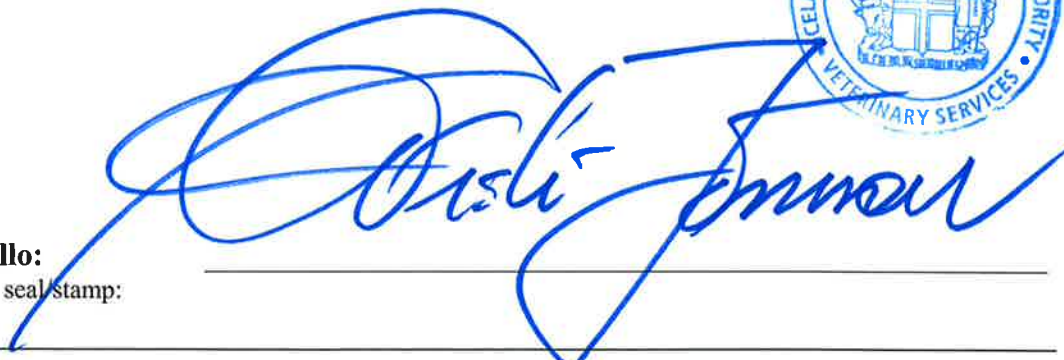
Fecha:

July 17th 2017

Date:

Firma y Sello:

Signature and seal/stamp:





Iceland, July 17th 2017

Ref.: 1701013

ICE GJ 08/17

EWOS CHILE ALIMENTOS LTDA

C/O MR. ALBERTO JIMENEZ

Cargill Innovation Center, Bahaia Colaco

Colaco Rural, Tenth Reg.

Chile

**Subject: Certificate of specific viral and bacterial analyses performed
on parent fish**

Following group of brood fish is composed by Real-time RT-PCR negative screened individuals for the causal agents of *Infectious salmon anaemia* (ISAV), *Pancreas disease* (PD/SAV), *Infectious pancreatic necrosis* (IPNV), *Heart and skeletal muscle inflammation* (PRV), *Cardiomyopathy syndrome* (CMS/PMCV/Totivirus) and *Bacterial kidney disease* (BKD).

Mating list

Shipment: Cargill Innovation

Date of inc.		Females	Males	Innlagt (Kg)	Est.av.no.
18.05.2017		V13-1b1: 777	HV12-2a2: 23		0
		V13-1b1: 778	HV12-2a2: 23		0
		V13-1b1: 779	HV12-2a2: 23		0
		V13-1b1: 780	HV12-2a2: 23		0
		V13-1b1: 781	HV12-2a2: 23		0
		V13-1b1: 782	HV12-2a2: 23		0

Respectfully;



Gisli Jónsson
Veterinary Officer for Fish Diseases



INFORME ENSAYOS DE LABORATORIO

Datos del Cliente:

Empresa : Ewos Chile Alimentos Ltda.
 Dirección : Parque Industrial Escuadrón, Km. 20
 Contacto : Alberto Jimenez
 Programa : Servicios Diagnósticos

Nombre Centro : Cic Colaco
 Código Centro : NO APLICA
 Ubicación : No informado
 Zona Sernapesca : No informado

Datos de la Muestra:

N° Recepción : 69629
 Lugar Análisis : PUERTO MONTT
 Estado Informe : FINAL
 Especie : Salar
 Estadío : Alevín

Tipo Muestra : Pez completo
 Tipo Muestreo : Azar
 N° Muestras : 8
 Fecha Muestreo : 24/10/2017
 Fecha Recepción : 24/10/2017
 Hora Recepción : 18:39
 Fecha Análisis : 24/10/2017
 Fecha Informe : 26/10/2017

Tipo Agua : Agua Mar

Lote : ST 1703

Contenedor : ST 1703

Morfometría:

Contenedor	N° Pez	Peso (g)	Long (cm)	FC
ST 1703	1	0,61	4,00	0,95
ST 1703	2	0,71	4,30	0,89
ST 1703	3	0,56	4,00	0,88
ST 1703	4	0,87	4,50	0,95
ST 1703	5	0,64	4,10	0,93
ST 1703	6	0,57	4,00	0,89
ST 1703	7	0,88	4,50	0,97
ST 1703	8	1,00	4,80	0,90
Promedio:		0,73	4,28	0,92

Exámenes convencionales:

Técnica	Tejido	Resultado	Intensidad	Total	Pos	Neg
RT-PCR-IPNV	Órganos internos	Negativo	NA	4	0	4
RT-PCR-ISAV TaqMan (Snow)	Órganos internos	Negativo	NA	4	0	4
RT-PCR-Flavobacterium psychrophilum	Órganos internos	Negativo	NA	4	0	4
RT-PCR-Piscirickettsia salmonis	Órganos internos	Negativo	NA	4	0	4
RT-PCR-Renibacterium salmoninarum	Órganos internos	Negativo	NA	4	0	4
RT-PCR-PRV L1 (Palacios)	Órganos internos	Negativo	NA	4	0	4

INFORME ENSAYOS DE LABORATORIO

■ Positivo ■ Negativo ■ Pendiente

Legenda

NA : No Aplica

NI : No Informado

Tabla CT:

Técnica	Pool	Tejido	Resultado	CT
RT-PCR-IPNV	1	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-IPNV	2	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-IPNV	3	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-IPNV	4	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-ISAV TaqMan (Snow)	1	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-ISAV TaqMan (Snow)	2	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-ISAV TaqMan (Snow)	3	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-ISAV TaqMan (Snow)	4	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-Flavobacterium psychrophilum	1	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-Flavobacterium psychrophilum	2	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-Flavobacterium psychrophilum	3	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-Flavobacterium psychrophilum	4	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-Piscirickettsia salmonis	1	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-Piscirickettsia salmonis	2	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-Piscirickettsia salmonis	3	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-Piscirickettsia salmonis	4	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-Renibacterium salmoninarum	1	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-Renibacterium salmoninarum	2	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-Renibacterium salmoninarum	3	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-Renibacterium salmoninarum	4	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-PRV L1 (Palacios)	1	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-PRV L1 (Palacios)	2	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-PRV L1 (Palacios)	3	Órganos internos	Negativo	no Ct
RT-PCR-PRV L1 (Palacios)	4	Órganos internos	Negativo	no Ct

INFORME ENSAYOS DE LABORATORIO

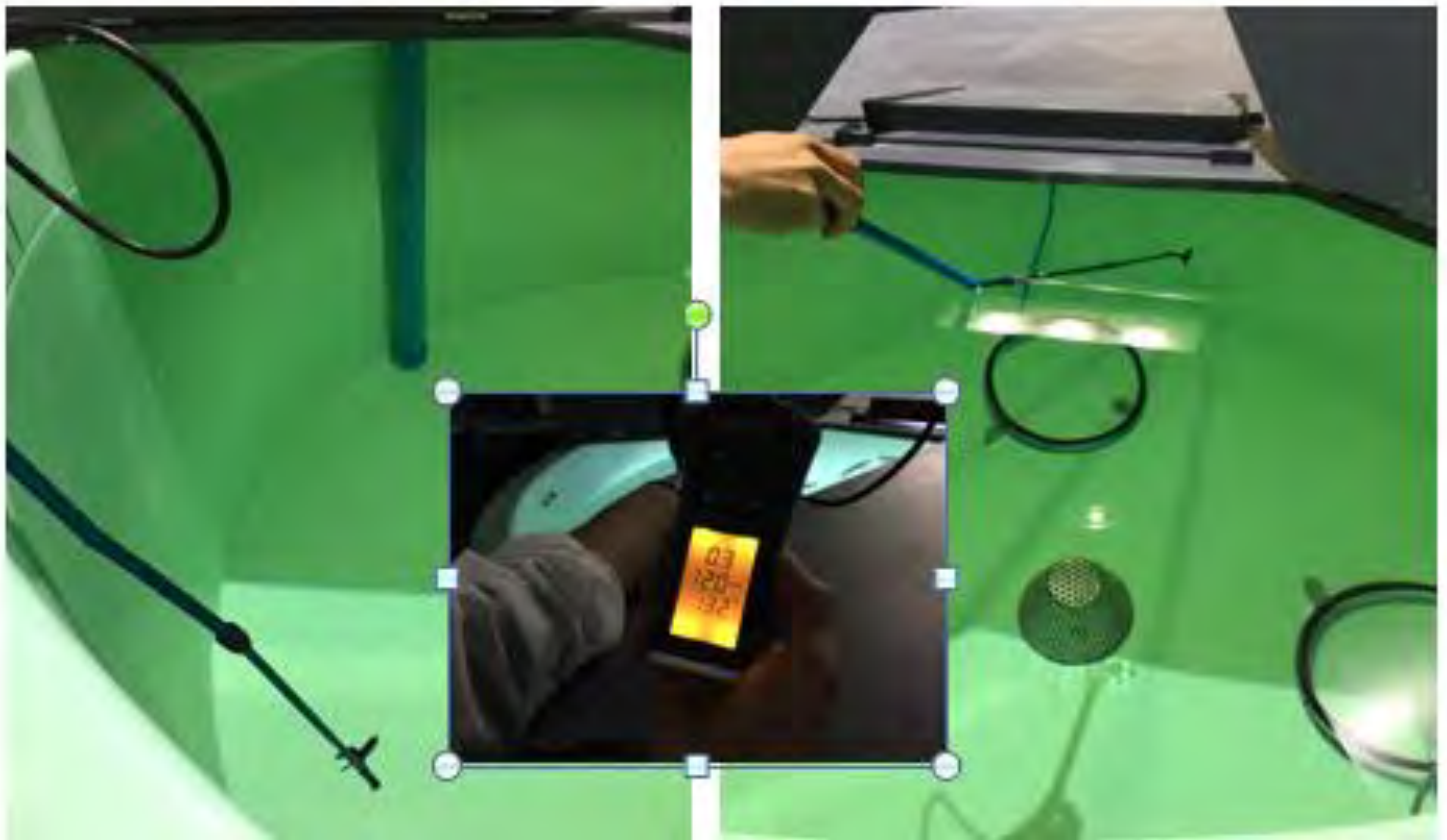
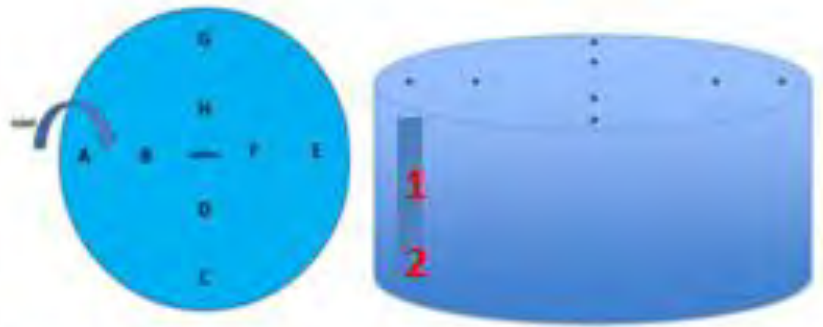
FIN DEL CASO: Este documento no puede ser reproducido por ningún medio, tanto parcial como total, sin autorización escrita de ADL diagnostic Chile Ltda. Los resultados expresados en el presente informe sólo se limitan a la presente muestra y no necesariamente reflejan el estado sanitario de la población.



Claudia Cardenas
Encargado Gestión de Muestras (GEM)
PUERTO MONTT



Harry Bohle
Jefe Laboratorio
PUERTO MONTT



Monitoreo y medición de velocidades en distintas coordemadas dentro de estanques
Sala esmoltificación CIC

Anexo 3

INFORME DE ENSAYO N° 0318-12085

SEÑOR : Germán Arismendi
EMPRESA : VESO Chile
CENTRO : CIC Colaco
FONO : 65 2321141
DIRECCIÓN: Km. 57, Camino Pargua

Análisis solicitado : Na⁺/K⁺ ATPasa branquial
Nombre Grupo : ST 1703-04
Estanque/Jaula : SM1
Fecha muestreo : 3 de mayo de 2018
Fecha de Recepción: 3 de mayo de 2018

Muestra	Longitud (cm)	Peso (g)	Condición (K)	Observación	Actividad Específica Na ⁺ /K ⁺ ATPasa (U/mg)
1	19,0	87,9	0,013	Leves Manchas Parr	14,2
2	18,0	74,3	0,013	Leves Manchas Parr	14,8
3	18,1	74,7	0,013	Leves Manchas Parr	14,2
4	19,4	88,6	0,012	Leves Manchas Parr	14,8
5	18,2	69,4	0,012	Leves Manchas Parr	13,9
X DS	18,54 0,62	78,98 8,72			14,40 0,41

Método de Análisis: PL2
Procedimiento de análisis de ATPasa

Método de Muestreo: PL1
Procedimiento de muestreo

Los resultados sólo están relacionados con los ítemes ensayados.

Fecha de Ejecución de Análisis: 4 de mayo de 2018.



Mónica Ojeda Quembosque
Jefe Laboratorio

INFORME DE ENSAYO N° 0318-12085

SEÑOR : Germán Arismendi
EMPRESA : VESO Chile
CENTRO : CIC Colaco
FONO : 65 2321141
DIRECCIÓN: Km. 57, Camino Pargua

Análisis solicitado : Na⁺/K⁺ ATPasa branquial
Nombre Grupo : ST 1703-04
Estanque/Jaula : SM6
Fecha muestreo : 3 de mayo de 2018
Fecha de Recepción: 3 de mayo de 2018

Muestra	Longitud (cm)	Peso (g)	Condición (K)	Observación	Actividad Específica Na ⁺ /K ⁺ ATPasa (U/mg)
1	19,8	98,2	0,013	Leves Manchas Parr	15,0
2	18,7	83,8	0,013	Leves Manchas Parr	14,1
3	18,1	75,9	0,013	Leves Manchas Parr	13,5
4	19,2	83,8	0,012	Leves Manchas Parr	13,1
5	18,3	75,0	0,012	Leves Manchas Parr	14,1
X DS	18,82 0,69	83,34 9,30			13,95 0,74

Método de Análisis: PL2
Procedimiento de análisis de ATPasa

Método de Muestreo: PL1
Procedimiento de muestreo

Los resultados sólo están relacionados con los ítemes ensayados.

Fecha de Ejecución de Análisis: 4 de mayo de 2018.



Mónica Ojeda Quembosque
Jefe Laboratorio

INFORME DE ENSAYO N° 0318-12102

SEÑOR : Germán Arismendi
EMPRESA : Cargill
CENTRO : CIC Colaco
FONO : 65 2321141
DIRECCIÓN: Km. 57, Camino Pargua

Análisis solicitado : Na⁺/K⁺ ATPasa branquial
Nombre Grupo : ST 1703
Estanque/Jaula : SM 1
Fecha muestreo : 11 de mayo de 2018
Fecha de Recepción: 11 de mayo de 2018

Muestra	Longitud (cm)	Peso (g)	Condición (K)	Observación	Actividad Específica Na ⁺ /K ⁺ ATPasa (U/mg)
1	17,0	57,6	0,012	Plateado	15,6
2	18,5	76,2	0,012	Plateado	15,0
3	19,0	80,8	0,012	Plateado	15,0
4	17,5	65,6	0,012	Plateado	16,0
5	19,0	80,8	0,012	Plateado	16,0
X DS	18,20 0,91	72,20 10,25			15,53 0,49

Método de Análisis: PL2
Procedimiento de análisis de ATPasa

Método de Muestreo: PL1
Procedimiento de muestreo

Los resultados sólo están relacionados con los ítemes ensayados.

Fecha de Ejecución de Análisis: 14 de mayo de 2018.



Mónica Ojeda Quemposque
Jefe Laboratorio

INFORME DE ENSAYO N° 0318-12102

SEÑOR : Germán Arismendi
EMPRESA : Cargill
CENTRO : CIC Colaco
FONO : 65 2321141
DIRECCIÓN: Km. 57, Camino Pargua

Análisis solicitado : Na⁺/K⁺ ATPasa branquial
Nombre Grupo : ST 1703
Estanque/Jaula : SM 6
Fecha muestreo : 11 de mayo de 2018
Fecha de Recepción: 11 de mayo de 2018

Muestra	Longitud (cm)	Peso (g)	Condición (K)	Observación	Actividad Específica Na ⁺ /K ⁺ ATPasa (U/mg)
1	19,5	88,6	0,012	Plateado	16,7
2	18,0	73,6	0,013	Plateado	16,5
3	19,5	88,2	0,012	Plateado	16,0
4	18,5	74,6	0,012	Plateado	16,1
5	19,2	79,4	0,011	Plateado	16,0
X DS	18,94 0,67	80,88 7,21			16,28 0,33

Método de Análisis: PL2
Procedimiento de análisis de ATPasa

Método de Muestreo: PL1
Procedimiento de muestreo

Los resultados sólo están relacionados con los ítemes ensayados.

Fecha de Ejecución de Análisis: 14 de mayo de 2018.



Mónica Ojeda Quembosque
Jefe Laboratorio

INFORME DE ENSAYO N° 0318-12102

SEÑOR : Germán Arismendi
EMPRESA : Cargill
CENTRO : CIC Colaco
FONO : 65 2321141
DIRECCIÓN: Km. 57, Camino Pargua

Análisis solicitado : Na⁺/K⁺ ATPasa branquial
Nombre Grupo : ST 1703
Estanque/Jaula : SM 8
Fecha muestreo : 11 de mayo de 2018
Fecha de Recepción: 11 de mayo de 2018

Muestra	Longitud (cm)	Peso (g)	Condición (K)	Observación	Actividad Específica Na ⁺ /K ⁺ ATPasa (U/mg)
1	20,5	96,6	0,011	Plateado	17,0
2	21,0	104,4	0,011	Plateado	16,5
3	19,0	80,8	0,012	Plateado	17,1
4	19,7	91,6	0,012	Plateado	17,3
5	19,5	88,0	0,012	Plateado	15,3
X DS	19,94 0,80	92,28 8,89			16,64 0,79

Método de Análisis: PL2
Procedimiento de análisis de ATPasa

Método de Muestreo: PL1
Procedimiento de muestreo

Los resultados sólo están relacionados con los ítemes ensayados.

Fecha de Ejecución de Análisis: 14 de mayo de 2018.



Mónica Ojeda Quembosque
Jefe Laboratorio

I.- DATOS DEL CLIENTE

Empresa : Sustainable Products SPA
Dirección : Itata 1081, Edificio Río Itata, depto. 102, Puerto Varas
Contacto : Vicente Castro

II.- DATOS DE LA(S) MUESTRA(S)

Caso	:	M-13115 a M-13116	Tipo de Agua	:	Dulce
Centro de cultivo	:	Veso Chile	Tipo Producción	:	P. Flujo Abierto
Lote / Grupo	:	VCC_18.00032_S2	Salinidad	:	5 ppt
Identificación	:	Estanque CO – EX	Fecha y hora de muestreo	:	03.05.2018 16:30
N° y Tipo de Muestras	:	9 Órganos en RNA later	Muestreado por	:	Cliente
Tipo de Muestreo	:	Azar	Procedimiento muestreo	:	No Informado
Producto / Especie	:	<i>Salmo salar</i>	Fecha y hora recepción	:	03.05.2018 17:36
Estadío Productivo	:	Pre-Smolt	Fecha y hora Inicio	:	04.05.2018 09:45
Fotoperiodo	:	Verano (semana 3)	Fecha y hora término	:	08.05.2018 17:35
Régimen Horas Luz	:	Luz/Oscuridad (24:0)	Fecha de emisión informe	:	09.05.2018
Temperatura del Agua	:	13°C			
Análisis Solicitados	:	9 Smoltmeter™			

III.- RESULTADOS

Tabla 1. Resultados de expresión RT-qPCR para los genes SAD, SAM y COT, respectivamente, en los peces individuales y promedio por estanque.

Nº Caso	Estanque	Long (cm)	Peso (g)	Expresión relativa RT-PCR			SAM / SAD	Estado
				SAD	SAM	COT		
M-13115-1	CO	18.0	74.3	0.29	3.76	3.26	12.97	Smolt
M-13115-2		18.1	74.7	0.24	3.82	3.07	15.88	Smolt
M-13115-3		19.4	88.6	0.11	3.10	3.45	28.20	Smolt
M-13115-4		18.2	69.4	0.07	3.31	3.43	46.94	Smolt
Promedio		18.4	76.8	0.18	3.50	3.30	19.68	Smolt

Nº Caso	Estanque	Long (cm)	Peso (g)	Expresión relativa RT-PCR			SAM / SAD	Estado
				SAD	SAM	COT		
M-13116-1	EX	19.8	98.2	0.34	3.63	3.61	10.69	Smolt
M-13116-2		18.7	83.8	0.71	3.90	3.12	5.53	Smolt
M-13116-3		18.1	75.9	0.15	3.26	3.49	21.90	Smolt
M-13116-4		19.2	83.0	0.21	3.64	3.75	17.50	Smolt
M-13116-5		18.3	75.0	0.26	2.94	3.09	11.18	Smolt
Promedio		18.8	83.2	0.33	3.47	3.41	10.43	Smolt

Alevín: individuos adaptados para sobrevivencia en agua dulce.

Presmolt: individuos en estado de desarrollo de capacidad osmo-rregulatoria óptima.

Smolt: individuos en estado de capacidad osmo-rregulatoria óptima.

"Estos Resultados corresponden sólo a las muestras analizadas y señaladas en este informe. Este documento no debe ser reproducido total ni parcialmente sin la autorización escrita de Pathovet Ltda."

Smolt*: individuos en estado de disminución de capacidad osmo-rregulatoria óptima.

Reversión: individuos con pérdida significativa de la capacidad osmo-rregulatoria óptima.

Postsmolt: individuos adaptados para sobrevivencia en agua mar.

Abreviaturas: Subunidad o Isoforma agua dulce (SAD); Subunidad o Isoforma agua mar (SAM); Cotransportador (COT); RT: Retrotranscripción; PCR: Reacción en cadena de polimerasa.

Metodología: PV-I-BM 018: SmoltMeter

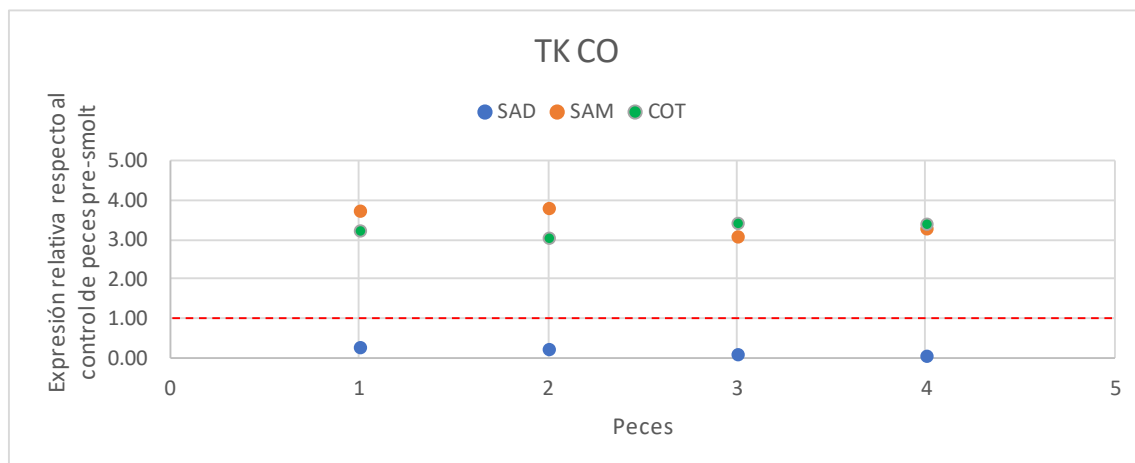


Figura 1. Nivel de mRNA de los genes que codifican para SAD, SAM y COT en cada uno de los peces del estanque CO, relativo al nivel de expresión del grupo de peces presmolt (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina.

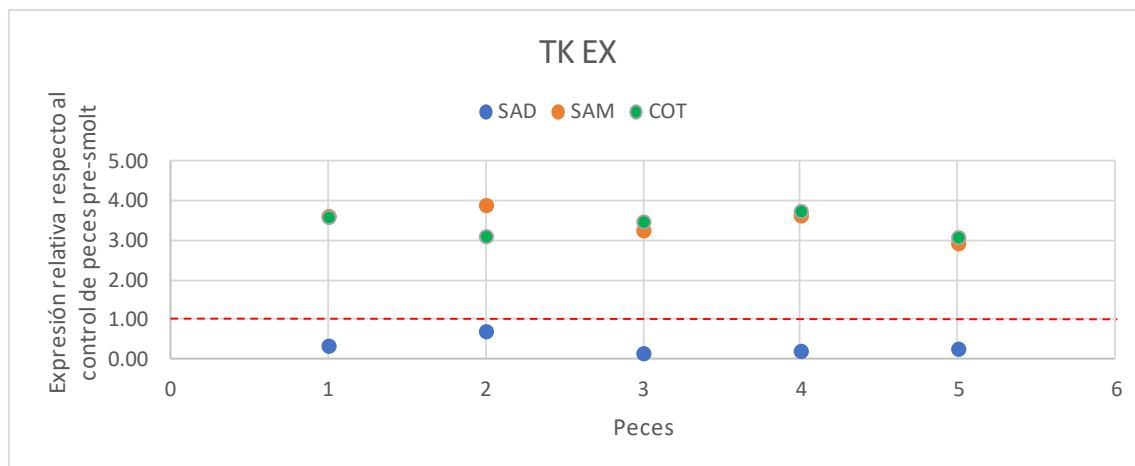


Figura 2. Nivel de mRNA de los genes que codifican para SAD, SAM y COT en cada uno de los peces del estanque EX, relativo al nivel de expresión del grupo de peces presmolt (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina.

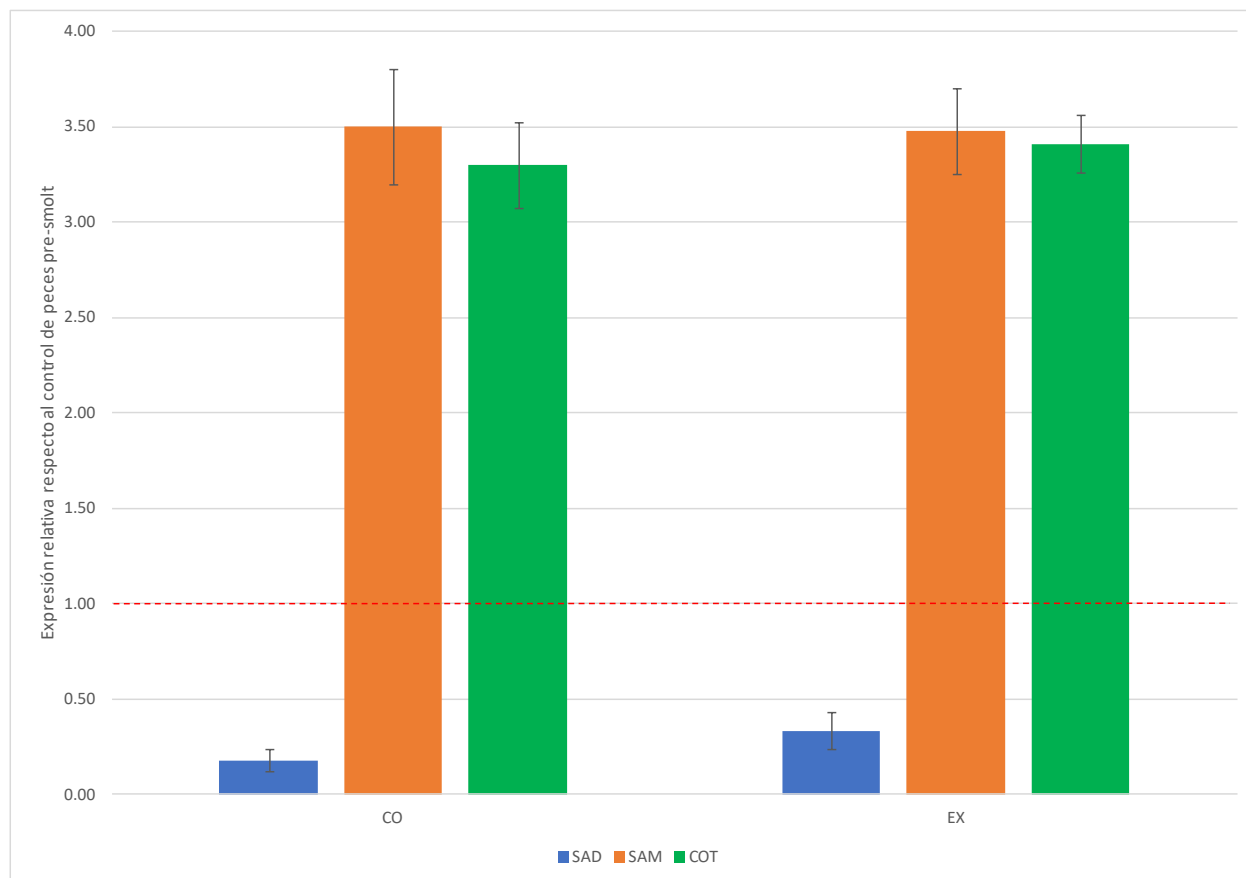


Figura 3. Nivel de mRNA de los genes que codifican para SAD, SAM y COT relativo al nivel de expresión del grupo de peces presmolt (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de los peces de los estanques CO y EX).

IV.- COMENTARIOS E INTERPRETACIONES

Antecedentes generales

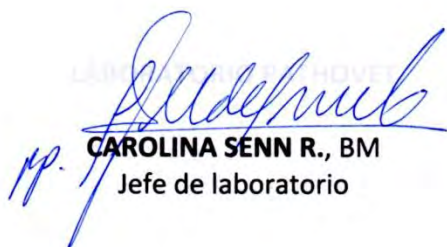
Previo al traslado al mar, los smolt de salmón del Atlántico deberían cumplir los siguientes criterios:

1. SAD < 1
2. SAM > 1
3. COT > 1
4. SAM / SAD > 2

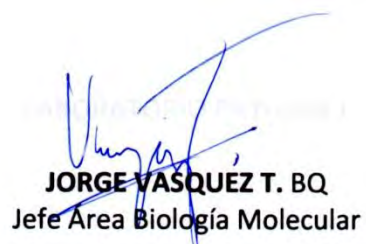
Resultados

TK-CO: El 100% de los peces son Smolt, individuos con una capacidad osmorregulatoria óptima.

TK-EX: El 100% de los peces son Smolt, individuos con una capacidad osmorregulatoria óptima.



CAROLINA SENN R., BM
Jefe de laboratorio



JORGE VASQUEZ T. BQ
Jefe Area Biología Molecular

Anexo 4

HEALTH ASSESMENT INDEX HAI /S1

[illegible]

VCC-18.00032
 S1_12.02.2018
 CIC Hatchery
 12.02.2018; 9:00

	Indicadores PEZ																		
	Ojos	Corazon	Org. Abd.	Branquias	Operculo	Musc. Esq.	Vacun	Def vert	Aleta	Piel	K	Emaciad	Madur.	Higado	Bazo	Estom	Ciego	Intest	Riñ
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1

VCC-18.00032
S1_12.02.2018
CIC Hatchery
12.02.2018; 9:00

General					
ID	Pez	Tank	Peso	Largo	K
1	3		36,4	14,5	1,19
2	3		25,0	13,0	1,14
3	3		30,6	13,5	1,24
4	3		33,0	14,0	1,20
5	3		29,6	13,0	1,35
6	3		33,0	13,5	1,34
7	3		29,6	13,5	1,20
8	3		26,0	12,5	1,33
9	3		30,0	13,5	1,22
10	3		29,4	13,0	1,34
11	3		29,0	13,0	1,32
12	3		22,8	12,5	1,17

Aletas									
Dorsal	Caudal	Anal	Pect I	Pect D	Pelvic I	Pelvic D	Dorsal (mm)	Anal (mm)	Pect I (mm)
1	1	2	1	1	1	1	17	13	16
1	1	2	2	1	1	2	17	13	18
1	1	1	3	2	2	2	15	31	10
2	1	1	2	3	1	1	10	11	14
1	1	1	2	2	2	2	11	13	17
1	1	2	2	2	2	1	16	10	19
1	1	1	2	2	1	2	16	11	15
1	1	1	1	1	1	1	15	14	18
1	1	1	3	1	1	1	15	11	12
1	1	2	1	1	1	1	16	13	17
2	1	2	3	1	1	1	16	12	13
2	1	2	2	1	1	1	16	11	18

FIN INDEX		
Dorsal index	Anal index	Pect index
11,7	9,0	11,0
13,1	10,0	13,8
11,1	23,0	7,4
7,1	7,9	10,0
8,5	10,0	13,1
11,9	7,4	14,1
11,9	8,1	11,1
12,0	11,2	14,4
11,1	8,1	8,9
12,3	10,0	13,1
12,3	9,2	10,0
12,8	8,8	14,4

11,310,211,8

11,1

Para ROBUST				
General				
ID	Pez	Tank	Peso	Largo
1	3		32,2	14,5
2	3		31,6	13,0
3	3		25,4	13,5
4	3		29,2	14,0
5	3		31,0	13,0
6	3		27,0	13,5
7	3		31,0	13,5
8	3		28,2	12,5
9	3		22,8	13,5
10	3		25,6	13,0
11	3		28,0	13,0
12	3		24,0	12,5

I. DATOS DEL CLIENTE

Empresa: Sustainable Products SPA (Veso Chile)
Dirección: Itata 1081, Edificio Río Itata, depto. 102, Puerto Varas
Contacto: Vicente Castro

II. DATOS DE LAS MUESTRAS

Caso	: M-11921	Tipo de Agua	: Dulce
Centro de cultivo	: Veso Chile	Fecha y hora de muestreo	: 12.02.2018 11:00
Producto / Especie	: <i>Salmo salar</i>	Muestreado por	: Cliente
Lote / Grupo	: VCC_18.00032_S1	Procedimiento de muestreo	: No informado
Identificación	: Estanque 3	Fecha y hora recepción	: 12.02.2018 17:18
Estadio productivo	: Pre-Smolt	Fecha y hora Inicio	: 13.02.2018 17:29
Tipo de Muestreo	: Azar	Fecha y hora término	: 14.02.2018 18:55
Nº y Tipo de Muestras	: 11 Sangre en Heparina	Fecha emisión de informe	: 14.02.2018
Nº y Tipo de Análisis	: 3 Pooles Bioplasma®Stress		

Acreditado por INN, Acreditación LE 1366

III. RESULTADOS

M-11921 Tk-3	Bioplasma® Stress		
	CRT **	GLU	LACT
1 [1 a 3]	1,8	5,2	2,8
2 [5 a 8]	3,5	4,1	4,1
3 [9 a 12]	1,2	4,1	4,4
Media	2,1	4,4	3,8
Mediana	1,8	4,1	4,1
Desv. Estándar	1,2	0,6	0,8
Rangos de referencia <i>Salmo salar</i> (Pre-smolt)			
Mínimo	< 43	1,3	0,4
Máximo		11,2	7,1
Unidades	ng/mL	mmol/L	mmol/L

* Valores fuera de rangos de referencia validados por Laboratorio Pathovet.

** Ensayos no incluidos en el alcance de acreditación.

Metodologías:

PV-I-PC-002: Determinación de parámetros bioquímicos mediante Cobas c311 (Acreditación LE 1366)

PV-I-PC-003: Determinación de parámetros hormonales mediante Cobas e411. **

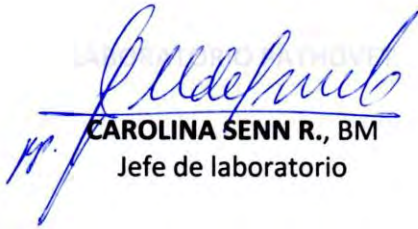
Parámetro		LD	LC	Lsup	Unidad
GLU	Glucosa	0,11	NI	41,6	mmol/l
LCT	Lactato	0,2	NI	15,5	mmol/l
CRT	Cortisol **	0,54	NI	634	ng/ml

Abreviaturas: LD: límite de Detección, LC: límite de cuantificación, Lsup: límite superior del test, NI: No informado

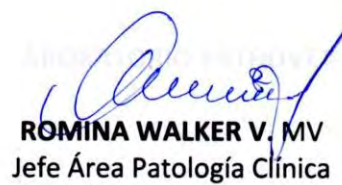
IV. COMENTARIOS

Todos los parámetros analizados se encuentran dentro de su intervalo de referencia para peces pre-smolt de *Salmo salar*.

Pool 1, conformado por tres peces, ya que el tubo N° 4 no contenía muestra.



CAROLINA SENN R., BM
Jefe de laboratorio



ROMINA WALKER V. MV
Jefe Área Patología Clínica

I.- Datos del Cliente

Empresa : Sustainable Products SPA
Dirección : Itata 1081, Edificio Río Itata, depto. 102, Puerto Varas
Contacto : Vicente Castro

II.- Datos de la(s) muestra(s)

Caso	: M-11920	Tipo de Agua	: Dulce
Centro de cultivo	: Veso Chile	Tipo de Muestreo	: Azar
Lote / Grupo	: VCC_18.00032_S1	Fecha y hora de muestreo	: 12.02.2018 11:00
Identificación	: Estanque 3	Muestreado por	: Cliente
Tipo de Muestras	: Órganos en Formalina 10%	Procedimiento muestreo	: No informado
N°de Muestras	: 48	Fecha y hora recepción	: 12.02.2018 17:18
Producto / Especie	: <i>Salmo salar</i>	Fecha y hora Inicio	: 13.02.2018 11:00
Estadío Productivo	: Pre-Smolt	Fecha y hora término	: 20.02.2018 12:10
Análisis Solicitados	: Histología Rutina H&E Corte y Tinción	Fecha de emisión informe	: 20.02.2018

III.- Resultados

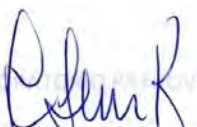
1.- Tabla de Resultados

N° CASO PATHOVET	IDENTIFICACIÓN	N° LÁMINAS OBTENIDAS	FECHA DE ENTREGA
M-11920	VCC_18.00032_S1_Pez01 a Pez12_Corazón	12	20.02.2018
	VCC_18.00032_S1_Pez01 a Pez12_Piel	12	20.02.2018
	VCC_18.00032_S1_Pez01 a Pez 12_Higado	12	20.02.2018
	VCC_18.00032_S1_Pez01 a Pez12_Branquia	12	20.02.2018

2.- Metodologías Utilizadas

PV-I-AP-001: Procesamiento y Diagnóstico Histológico (Acreditado por INN, Acreditación LE 1365)

PV-I-AP-002: Tinción de Rutina con Hematoxilina – Eosina (Acreditado por INN, Acreditación LE 1365)



CAROLINA SENN R., BM
Jefe de laboratorio



RICARDO ILDEFONSO C., MV. TM
Gerente Técnico

HEALTH ASSESMENT INDEX HAI /S3

Pez	Examen Externo						Examen Interno							
	Piel	Aletas	Ojos	Branquias	Deformidades		Hígado	Riñón	Corazón	Estómago	Intestino	Ciegos pilóricos	Bazo	Grasa Visceral
	0 a 3	0 a 3	0 o 3	0 o 3	0, 2 o 3		0 o 3	0 o 3	0 o 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 o 3	0 a 4
1	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	2
2	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	2
3	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	2
4	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	2
5	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	2
6	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	2
7	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	2
8	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	2
9	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	2
10	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	3
11	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	3
12	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	2
13	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	3
14	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	3
15	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	3
16	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	3
17	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	2
18	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	2
19	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	2
20	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	3
21	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	2
22	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	2
23	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	3
24	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	2

VCC-18.00032
S3_15.05.2018
CIC Hatchery
15.05.2018; 9:00

[illegible]

VCC-18.00032
S3_15.05.2018
CIC Hatchery

General				
ID Pez	Tank	Peso	Largo	K
1	1	98,0	19,7	1,28
2	1	87,4	19,5	1,18
3	1	80,7	18,7	1,23
4	1	96,7	19,5	1,30
5	1	92,5	19,8	1,19
6	1	81,8	19,0	1,19
7	1	85,6	19,5	1,15
8	1	93,9	20,0	1,17
9	1	85,0	18,9	1,26
10	1	92,9	19,7	1,22
11	1	81,3	18,7	1,24
12	1	69,3	18,2	1,15
13	6	85,1	18,7	1,30
14	6	93,4	19,5	1,26
15	6	93,5	19,5	1,26
16	6	83,3	18,8	1,25
17	6	95,1	20,0	1,19
18	6	108,7	20,5	1,26
19	6	107,2	20,7	1,21
20	6	81,7	18,5	1,29
21	6	97,2	20,3	1,16
22	6	94,0	19,8	1,21
23	6	83,6	19,3	1,16
24	6	82,0	18,9	1,21

Aletas													
Dorsal	Caudal	Anal	Pect I	Pect D	Pelvic I	Pelvic D	Dorsal (mm)	Anal (mm)	Pect I (mm)	Dorsal index	Anal index	Pectoral index	
2	1	2	1	1	1	1	24	15	29	12,2	7,6	14,7	
2	1	1	3	1	2	2	21	15	23	10,8	7,7	11,8	
2	1	2	2	1	1	1	23	18	26	12,3	9,6	13,9	
2	1	1	3	2	1	1	25	17	21	12,8	8,7	10,8	
2	1	2	3	2	1	1	21	19	23	10,6	9,6	11,6	
2	1	1	2	2	1	1	22	17	24	11,6	8,9	12,6	
1	1	1	3	2	1	1	22	16	25	11,3	8,2	12,8	
1	1	1	1	1	1	1	25	18	27	12,5	9,0	13,5	
2	1	1	3	2	1	1	20	18	21	10,6	9,5	11,1	
2	1	1	2	2	1	1	20	15	25	10,2	7,6	12,7	
2	1	1	2	2	1	1	19	17	24	10,2	9,1	12,8	
3	1	1	2	1	1	1	22	12	22	12,1	6,6	12,1	
2	1	2	2	2	1	1	23	18	24	12,3	9,6	12,8	
1	2	2	2	2	1	1	23	18	26	11,8	9,2	13,3	
1	1	1	1	1	1	1	25	19	29	12,8	9,7	14,9	
2	1	1	3	3	1	1	20	18	21	10,6	9,6	11,2	
2	1	2	3	2	1	1	23	18	24	11,5	9,0	12,0	
2	1	2	2	2	1	1	22	17	26	10,7	8,3	12,7	
2	1	1	2	2	2	1	26	21	27	12,6	10,1	13,0	
1	1	1	1	1	1	1	23	18	25	12,4	9,7	13,5	
2	1	1	2	3	2	1	1	22	19	21	10,8	9,4	10,3
1	1	1	1	2	2	1	1	23	17	27	11,6	8,6	13,6
1	1	1	1	3	3	1	1	23	18	26	11,9	9,3	13,5
2	1	1	1	2	1	1	1	23	18	29	12,2	9,5	15,3

Average Fin index p-value ttest
11,5 0,0569

11,5
10,1
11,9
10,8
10,6
11,1
10,8
11,7
10,4
10,2
10,7
10,3
11,6
11,5
12,5
10,5
10,8
10,6
11,9
11,9
10,2
11,3
11,6
12,3

VCC-18.00032
S3_15.05.2018
CIC Hatchery

Para ROBUST				
General				
ID Pez	Tank	Peso	Largo	K
1	1	71,6	18,0	1,23
2	1	83,2	19,0	1,21
3	1	103,1	20,3	1,23
4	1	86,9	19,3	1,21
5	1	89,0	19,5	1,20
6	1	85,8	19,0	1,25
7	1	100,4	20,5	1,17
8	1	80,2	19,3	1,12
9	1	71,3	17,8	1,26
10	1	90,1	19,5	1,22
11	1	73,8	18,4	1,18
12	1	75,9	18,3	1,24
13	6	125,4	21,5	1,26
14	6	93,1	20,0	1,16
15	6	99,0	20,3	1,18
16	6	92,1	19,5	1,24
17	6	104,3	20,3	1,25
18	6	85,6	19,0	1,25
19	6	85,5	19,6	1,14
20	6	96,1	20,0	1,20
21	6	81,4	19,8	1,05
22	6	92,9	19,5	1,25
23	6	104,9	20,8	1,17
24	6	82,3	18,9	1,22

Control 11,4 8,5 12,5 10,8
Exercise 11,8 9,3 13,0 11,4

I. DATOS DEL CLIENTE

Empresa : Veso Chile
Dirección : Camino a Pargua Km. 57, Calbuco
Contacto : Vicente Castro

II. DATOS DE LAS MUESTRAS

Caso	: M-13321 a M-13322	Tipo de Agua	: Dulce
Centro de cultivo	: Veso Chile	Fecha y hora de muestreo	: 15.05.2018 12:00
Producto / Especie	: <i>Salmo salar</i>	Muestreado por	: Cliente
Lote / Grupo	: VCC_18.00032_S3	Procedimiento de muestreo	: No Informado
Identificación	: Estanque SM01-SM06	Fecha y hora recepción	: 15.05.2018 16:27
Estadio productivo	: Smolt	Fecha y hora Inicio	: 16.05.2018 12:00
Tipo de Muestreo	: Azar	Fecha y hora término	: 17.05.2018 11:54
N° y Tipo de Muestras	: 24 Muestras de Plasma	Fecha emisión de informe	: 17.05.2018
N° y Tipo de Análisis	: 24 Bioplasma®Stress		

Acreditado por INN, Acreditación LE 1366

III. RESULTADOS

M-13321 TK SM01		Bioplasma® Stress	
	CRT **	GLU	LACT
1	11,4	7,3	3,2
2	< 10,1	7,9	3,1
3	79	8,1	4,6
4	14	7,1	4,4
5	35	7,5	2,7
6	37	7,3	3,6
7	43	7,4	4,1
8	50	7,5	4,2
9	32	7,9	3,2
10	51	8,0	3,3
11	95	7,6	3,9
12	43	8,5	3,9
Mediana	42,8	7,6	3,6
Media	44,6	7,9	3,2
Desv. Estándar	24,7	0,4	0,8
Intervalo de referencia <i>Salmo salar</i> (smolt)			
Mínimo	< 43	1,3	0,4
Máximo		11,2	7,1
Unidades	ng/mL	mmol/L	mmol/L

M-13322 TK SM06		Bioplasma® Stress	
	CRT **	GLU	LACT
1	32	8,1	3,1
2	28	7,3	3,3
3	16	8,3	4,1
4	28	8,2	3,6
5	42	8,3	3,2
6	64	8,7	3,8
7	62	8,9	3,7
8	74	8,1	4,4
9	23	7,1	2,6
10	37	8,2	3,1
11	57	8,0	3,9
12	64	8,7	4,2
Mediana	39,3	8,2	3,5
Media	43,8	8,1	3,3
Desv. Estándar	19,4	0,5	0,5
Intervalo de referencia <i>Salmo salar</i> (smolt)			
Mínimo	< 43	1,3	0,4
Máximo		11,2	7,1
Unidades	ng/mL	mmol/L	mmol/L

* Valores fuera de rangos de referencia validados por Laboratorio Pathovet.

** Ensayos no incluidos en el alcance de acreditación.

Metodologías:

PV-I-PC-002: Determinación de parámetros bioquímicos mediante Cobas c311 (Acreditación LE 1366)

PV-I-PC-007: Determinación de parámetros hormonales con Immulite 1000. **

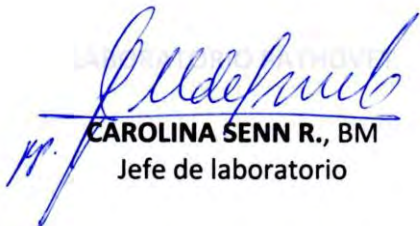
"Estos Resultados corresponden sólo a las muestras analizadas y señaladas en este informe. Este documento no debe ser reproducido total ni parcialmente sin la autorización escrita de Pathovet Ltda."

Parámetro		LD	LC	Lsup	Unidad
GLU	Glucosa	0,11	NI	41,6	mmol/l
LCT	Lactato	0,2	NI	15,5	mmol/l
CRT	Cortisol **	0,54	NI	634	ng/ml

Abreviaturas: LD: Límite de Detección, LC: límite de cuantificación, Lsup: límite superior del test, NI: No informado

IV. COMENTARIOS

Todos los parámetros analizados se encuentran dentro de su intervalo de referencia para peces smolt de la especie *Salmo salar*.



CAROLINA SENN R., BM
Jefe de laboratorio



ROMINA WALKER V., MV
Jefe Área Patología Clínica

I.- DATOS DEL CLIENTE

Empresa : Veso Chile SpA
Dirección : Camino Pargua Km. 57, Calbuco
Contacto : Vicente Castro

II.- DATOS DE LA(S) MUESTRA(S)

Caso	:	M-13319 a M-13320	Tipo de Agua	:	Dulce
Centro de cultivo	:	Veso Chile	Tipo de Muestreo	:	Azar
Lote / Grupo	:	VCC-18.00032_S3	Fecha y hora de muestreo	:	15.05.2018 12:00
Identificación	:	SM01 (01 al 12), SM06 (01 al 12)	Muestreado por	:	Cliente
Tipo de Muestras	:	Órganos en Formalina 10%	Procedimiento muestreo	:	No informado
N° de Muestras	:	96 Órganos	Fecha y hora recepción	:	15.05.2018 16:27
Producto / Especie	:	<i>Salmo salar</i>	Fecha y hora Inicio	:	16.05.2018 17:00
Estadío Productivo	:	Smolt	Fecha y hora término	:	18.05.2018 18:45
Análisis Solicitados	:	96 Procesamiento Histológico con Tinción H&E	Fecha de emisión informe	:	22.05.2018

III.- RESULTADOS

1.- Tabla de Resultados

N° CASO PATHOVET	IDENTIFICACIÓN	N° LÁMINAS OBTENIDAS	FECHA DE ENTREGA
M-13319	VCC_18.00032_S3_ SM01-01 al 12_ Sk-Gi-He-Li	24	22.05.2018
M-13220	VCC_18.00032_S3_ SM06-01 al 12_ Sk-Gi-He-Li	24	22.05.2018

2.- Metodologías Utilizadas

PV-I-AP-001: Procesamiento y Diagnóstico Histológico (Acreditado por INN, Acreditación LE 1365)

PV-I-AP-002: Tinción de Rutina con Hematoxilina – Eosina (Acreditado por INN, Acreditación LE 1365)



CAROLINA SENN R., BM
Jefe de laboratorio



RICARDO ILDEFONSO C., MV. TM
Gerente Técnico

Anexo 6

I.- DATOS DEL CLIENTE

Empresa : Veso Chile
Dirección : Camino a Pargua Km. 57, Calbuco
Contacto : Vicente Castro

II.- DATOS DE LA(S) MUESTRA(S)

Caso	: M-13532 a M-13533 (T0)	Fecha y hora de muestreo (T0)	: 15.05.2018 12:00
	M-13846 a M-13847 (T1)	Fecha y hora de muestreo (T1)	: 03.07.2018 14:00
	M-13964 a M-13965 (T2)	Fecha y hora de muestreo (T2)	: 17.07.2018 15:00
Centro de cultivo	: Veso Chile	Tipo de Agua	: Dulce/Mar
Lote / Grupo	: VCC_18.00032_S3	Muestreado por	: Cliente
Identificación	: Estanque SM01 – SM06 (T0)	Procedimiento muestreo	: No informado
	Grupo LM-RM (T1 Y T2)	Fecha y hora recepción (T0)	: 31.05.2018 14:30
N° y Tipo de Muestras	: 48 Órganos en RNA Later	Fecha y hora recepción (T1)	: 04.07.2018 08:40
Tipo de Muestreo	: Azar	Fecha y hora recepción (T2)	: 18.07.2018 09:00
Producto / Especie	: <i>Salmo salar</i>	Fecha y hora Inicio	: 01.06.2018 15:00
Estadío Productivo	: Smolt	Fecha y hora término	: 31.07.2018 16:00
Análisis Solicitados	: 48 InmunoGen IFNa+IL8	Fecha de emisión informe	: 06.08.2018
	48 InmunoGen IFNg+IL2		
	48 InmunoGen IL1b+IL10		
	48 InmunoGen IL15+IL18		
	48 InmunoGen MHCI+MHCII		
	48 InmunoGen IgM+IgT		
	48 InmunoGen ELF1a+Bactina		
	48 INNATAGEN IL10-IL12b		
	48 InmunoGen CD4+CD8		
	32 RT-qPCR 16SrRNA <i>Piscirickettsia salmonis</i> [Tiempo 1 y 2]		

III.- RESULTADOS

Tabla 1. Resultados de expresión relativa RT-PCR con respecto al Control T0 (M-13532) para los genes CD4, CD8, INF γ , INF α , IL-10, IL-12, IgM e IgT para la condición Estudio (RM) y control (T0) por individuo y estanque.

Nº Caso	Estanque (TK)	Expresión Relativa RT-PCR							
		CD4	CD8	INF γ	INF α	IL-10	IL-12	IgM	IgT
M-13533-1	Estudio SM06 (T0)	1.08	0.86	0.83	1.02	1.03	0.80	1.25	0.98
M-13533-2		0.66	1.06	1.04	1.20	1.08	0.59	0.85	0.83
M-13533-3		1.09	1.33	1.61	1.15	1.37	0.92	1.11	0.68
M-13533-4		1.11	1.24	1.26	1.13	0.90	1.07	1.71	0.76
M-13533-5		0.62	0.88	1.03	1.23	0.81	0.76	1.04	0.93
M-13533-6		1.10	0.68	0.71	0.80	0.69	1.02	0.71	0.55
M-13533-7		0.98	0.76	1.28	0.90	1.07	1.10	0.63	0.67
M-13533-8		0.79	1.18	1.19	0.90	1.04	1.73	1.37	1.30
M-13847-1	Grupo RM Estudio (T1)	1.95	0.31	21.63	0.52	6.82	0.75	1.06	0.33
M-13847-2		0.78	0.47	23.14	1.93	3.54	1.36	3.06	0.68
M-13847-3		1.20	0.21	21.83	0.68	19.33	0.40	0.65	0.21
M-13847-4		0.31	0.20	22.13	0.52	12.21	0.54	1.09	0.18
M-13847-5		1.43	0.86	17.56	1.44	2.11	0.80	0.42	0.14
M-13847-6		1.63	0.85	11.76	0.83	5.32	0.56	1.73	0.36
M-13847-7		0.47	0.14	12.25	0.74	1.97	0.51	0.61	0.14
M-13847-8		0.79	0.30	28.13	1.29	3.80	0.68	0.59	0.23
M-13965-1	Grupo RM Estudio (T2)	2.01	0.37	6.66	0.58	4.26	1.45	2.65	0.38
M-13965-2		2.76	0.36	16.61	0.68	5.53	0.71	3.32	0.65
M-13965-3		1.15	0.64	5.75	0.83	3.23	1.10	2.98	0.71
M-13965-4		4.78	0.88	16.64	0.99	96.81	1.58	3.80	0.63
M-13965-5		0.86	1.05	3.35	1.02	1.18	4.08	1.84	0.80
M-13965-6		2.19	0.35	17.46	1.35	34.59	0.36	6.85	0.95
M-13965-7		1.23	0.70	2.99	1.17	1.82	3.17	0.78	0.48
M-13965-8		0.75	1.27	2.12	1.33	2.01	1.17	8.54	0.91
M-13532-1	Control SM01 (T0)	1.19	1.10	0.90	0.66	0.63	1.12	1.05	1.25
M-13532-2		1.13	1.07	1.10	1.32	2.72	1.41	0.95	1.22
M-13532-3		0.95	0.74	1.20	0.93	0.69	1.17	0.62	0.88
M-13532-4		1.06	1.38	1.26	1.49	1.13	0.71	1.69	1.20
M-13532-5		1.09	1.03	0.96	0.91	0.98	1.00	0.87	0.94
M-13532-6		0.84	1.04	0.87	0.73	0.49	1.00	0.95	0.64
M-13532-7		0.75	0.94	0.78	0.74	0.74	0.60	0.79	0.67
M-13532-8		0.99	0.70	0.91	1.22	0.63	0.98	1.08	1.19

INFORME CONSOLIDADO DE ANALISIS

AREA BIOLOGÍA MOLECULAR

Código informe: BM-6689

Tabla 2. Resultados de expresión relativa RT-PCR con respecto al Control T0 (M-13532) para los genes, IL-8, IL-2, IL-15, IL-18, IL-1b, MHC I y MHC II para la condición Estudio (RM) y control (T0) por individuo y estanque.

Nº Caso	Estanque (TK)	Expresión Relativa RT-PCR						
		IL-8	IL-2	IL-15	IL-18	IL-1b	MHC I	MHC II
M-13533-1	Estudio SM06 (T0)	0.56	1.15	1.17	1.32	0.64	1.02	1.25
M-13533-2		0.67	0.86	1.16	0.87	0.94	1.16	1.76
M-13533-3		1.06	1.54	1.93	1.45	1.08	1.06	1.56
M-13533-4		0.61	1.09	1.83	1.69	1.06	1.25	1.17
M-13533-5		0.57	0.81	1.37	1.39	1.09	1.19	1.36
M-13533-6		0.63	1.01	1.00	0.98	0.74	1.09	1.77
M-13533-7		0.80	0.99	1.27	1.23	0.77	0.98	1.45
M-13533-8		0.64	1.26	2.02	1.52	0.35	1.45	1.30
M-13847-1	Grupo RM Estudio (T1)	6.44	0.38	1.09	1.10	6.56	4.98	2.31
M-13847-2		8.79	0.46	1.85	1.46	2.83	5.29	2.85
M-13847-3		5.05	0.18	1.06	1.10	5.48	2.58	1.31
M-13847-4		4.22	0.25	0.73	0.64	8.64	2.60	1.78
M-13847-5		4.83	0.27	0.92	0.58	1.37	3.08	3.08
M-13847-6		7.28	0.37	1.28	1.35	2.09	3.76	3.81
M-13847-7		7.01	0.14	0.63	0.66	3.34	2.29	1.43
M-13847-8		7.23	0.27	0.86	0.53	2.59	3.99	3.36
M-13965-1	Grupo RM Estudio (T2)	3.67	0.31	1.34	1.12	4.03	5.05	2.47
M-13965-2		3.97	0.26	1.02	0.91	4.46	5.85	2.57
M-13965-3		3.33	0.36	1.76	1.58	2.46	4.68	2.18
M-13965-4		7.72	0.33	1.41	1.97	8.47	5.01	1.45
M-13965-5		1.55	0.38	1.95	1.05	0.89	5.30	2.95
M-13965-6		6.01	0.35	1.30	1.64	5.71	5.82	1.36
M-13965-7		2.36	0.37	1.68	0.93	1.16	4.23	2.29
M-13965-8		1.89	0.37	1.55	1.29	1.73	4.10	1.95
M-13532-1	Control SM01 (T0)	0.69	1.15	0.90	0.84	0.71	1.01	0.82
M-13532-2		2.27	0.83	1.18	1.40	1.96	1.24	0.93
M-13532-3		0.84	0.90	1.09	1.18	0.97	0.98	1.06
M-13532-4		1.20	1.21	1.21	1.25	0.98	1.02	1.20
M-13532-5		1.01	1.05	0.75	0.73	1.11	1.10	1.01
M-13532-6		0.29	1.04	1.01	0.77	0.79	0.82	0.91
M-13532-7		0.67	0.79	0.91	1.00	0.75	0.70	0.90
M-13532-8		1.02	1.02	0.95	0.82	0.72	1.13	1.17

INFORME CONSOLIDADO DE ANALISIS

AREA BIOLOGÍA MOLECULAR

Código informe: BM-6689

Tabla 3. Resultados de expresión relativa RT-PCR con respecto al Control T0 (M-13532) para los genes CD4, CD8, INF γ , INF α , IL-10, IL-12, IgM e IgT para la condición control (LM) por individuo y estanque.

Nº Caso	Estanque (TK)	Expresión Relativa RT-PCR							
		CD4	CD8	INF γ	INF α	IL-10	IL-12	IgM	IgT
M-13846-1	Grupo LM Control (T1)	0.60	0.18	9.15	1.28	4.10	0.46	0.96	0.42
M-13846-2		0.69	0.34	21.05	1.40	7.55	0.89	2.33	0.48
M-13846-3		0.51	0.30	3.72	0.71	1.44	0.47	1.74	0.41
M-13846-4		0.59	0.25	26.18	1.61	4.02	0.62	2.21	0.37
M-13846-5		0.89	0.27	25.68	0.75	13.16	0.33	1.11	0.21
M-13846-6		0.66	0.16	16.17	0.58	6.98	0.32	0.50	0.14
M-13846-7		0.53	0.29	21.12	0.92	2.78	0.40	1.15	0.25
M-13846-8		0.95	0.44	23.24	1.92	3.39	1.33	1.93	0.60
M-13964-1	Grupo LM Control (T2)	1.11	0.29	7.10	0.70	1.70	0.77	2.22	0.40
M-13964-2		2.62	0.31	15.30	0.46	48.10	0.47	1.25	0.26
M-13964-3		1.32	0.33	11.66	0.85	2.65	0.44	4.84	0.60
M-13964-4		3.23	0.22	6.53	0.56	10.92	1.22	2.70	0.44
M-13964-5		0.86	0.47	1.29	0.38	0.99	0.36	1.29	0.50
M-13964-6		0.93	0.63	2.94	1.36	1.72	1.22	1.24	0.95
M-13964-7		0.78	0.68	2.59	0.69	1.22	1.07	1.18	0.75
M-13964-8		3.04	0.45	23.87	0.53	32.92	1.00	2.01	0.42
M-13532-1	Control SM01 (T0)	1.19	1.10	0.90	0.66	0.63	1.12	1.05	1.25
M-13532-2		1.13	1.07	1.10	1.32	2.72	1.41	0.95	1.22
M-13532-3		0.95	0.74	1.20	0.93	0.69	1.17	0.62	0.88
M-13532-4		1.06	1.38	1.26	1.49	1.13	0.71	1.69	1.20
M-13532-5		1.09	1.03	0.96	0.91	0.98	1.00	0.87	0.94
M-13532-6		0.84	1.04	0.87	0.73	0.49	1.00	0.95	0.64
M-13532-7		0.75	0.94	0.78	0.74	0.74	0.60	0.79	0.67
M-13532-8		0.99	0.70	0.91	1.22	0.63	0.98	1.08	1.19

Tabla 4. Resultados de expresión relativa RT-PCR con respecto al Control T0 (M-13532) para los genes, IL-8, IL-2, IL-15, IL-18, IL-1b, MHC I y MHC II para la condición control (LM) por individuo y estanque.

Nº Caso	Estanque (TK)	Expresión Relativa RT-PCR						
		IL-8	IL-2	IL-15	IL-18	IL-1b	MHC I	MHC II
M-13846-1	Grupo LM Control (T1)	7.44	0.20	0.79	0.84	3.69	1.96	0.99
M-13846-2		10.46	0.29	1.46	1.50	5.15	2.80	1.36
M-13846-3		2.30	0.32	1.16	0.93	0.47	1.38	1.85
M-13846-4		7.92	0.19	1.47	1.05	3.84	4.58	1.78
M-13846-5		5.47	0.36	0.96	0.91	4.04	2.85	1.29
M-13846-6		5.48	0.09	0.72	0.59	5.45	2.27	1.15
M-13846-7		5.73	0.41	1.00	0.71	5.05	3.15	2.03
M-13846-8		6.75	0.48	1.80	1.01	3.51	3.69	2.47
M-13694-1	Grupo LM Control (T2)	3.27	0.29	1.01	0.82	1.30	3.79	2.58
M-13694-2		2.67	0.28	0.76	0.81	3.27	4.02	1.26
M-13694-3		5.04	0.17	0.91	0.80	2.10	3.63	1.97
M-13694-4		6.04	0.18	1.06	1.44	7.08	4.61	1.38
M-13694-5		0.54	0.24	0.73	0.80	0.61	1.49	1.12
M-13694-6		1.95	0.47	2.14	1.17	0.53	4.74	2.99
M-13694-7		1.12	0.39	1.28	1.37	0.68	2.84	1.88
M-13694-8		9.50	0.23	1.01	1.33	8.47	5.49	1.37
M-13532-1	Control SM01 (T0)	0.69	1.15	0.90	0.84	0.71	1.01	0.82
M-13532-2		2.27	0.83	1.18	1.40	1.96	1.24	0.93
M-13532-3		0.84	0.90	1.09	1.18	0.97	0.98	1.06
M-13532-4		1.20	1.21	1.21	1.25	0.98	1.02	1.20
M-13532-5		1.01	1.05	0.75	0.73	1.11	1.10	1.01
M-13532-6		0.29	1.04	1.01	0.77	0.79	0.82	0.91
M-13532-7		0.67	0.79	0.91	1.00	0.75	0.70	0.90
M-13532-8		1.02	1.02	0.95	0.82	0.72	1.13	1.17

Abreviaturas: Cluster de diferenciación 4 (CD4); Cluster de diferenciación 8 (CD8) Interferón gamma (INF γ); Interferón alfa (INF α); Interleuquina 10 (IL-10); Interleuquina 12 (IL-12); Inmunoglobulina M (IgM); Inmunoglobulina T (IgT); Interleuquina 8 (IL-8); Interleuquina 2 (IL-2); Interleuquina 15 (IL-15); Interleuquina 18 (IL-18); Interleuquina 1 beta (IL-1 β); Complejo mayor de histocompatibilidad 1 (MHC I); Complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II).

Tabla 5. Resultados de valores Ct y cantidad relativa por RT-qPCR para 16S rRNA *Piscirickettsia salmonis* por individuo.

Nº Caso	Estanque	Tiempo	Ct	Cantidad Relativa
13846-1	LM	1	27.1	250585
13846-2			27.7	156030
13846-3			33.1	3738
13846-4			27.7	156831
13846-5			24.2	1789070
13846-6			24.8	1185317
13846-7			26.1	495514
13846-8			30.0	32049
13847-1	RM	1	26.4	388534
13847-2			31.0	16215
13847-3			23.3	3399079
13847-4			24.2	1781915
13847-5			29.2	57582
13847-6			29.9	34100
13847-7			28.1	126366
13847-8			27.2	224988
13964-1	LM	2	31.0	16944
13964-2			22.1	7643272
13964-3			28.6	83994
13964-4			23.4	3161526
13964-5			32.6	5410
13964-6			35.9	537
13964-7			35.8	608
13964-8			21.1	15588307
13965-1	RM	2	28.5	94728
13965-2			25.0	1070904
13965-3			28.0	130005
13965-4			22.5	6134650
13965-5			30.6	22205
13965-6			22.0	8611256
13965-7			26.5	383769
13965-8			34.1	1962

Metodologías

PV-I-BM-013: RT-qPCR Respuesta Inmune Humoral

PV-I-BM-014: RT-qPCR Respuesta Inmune Celular

PV-I-BM-015: RT-qPCR Respuesta Inmune Innata

Diagramas y Gráficas

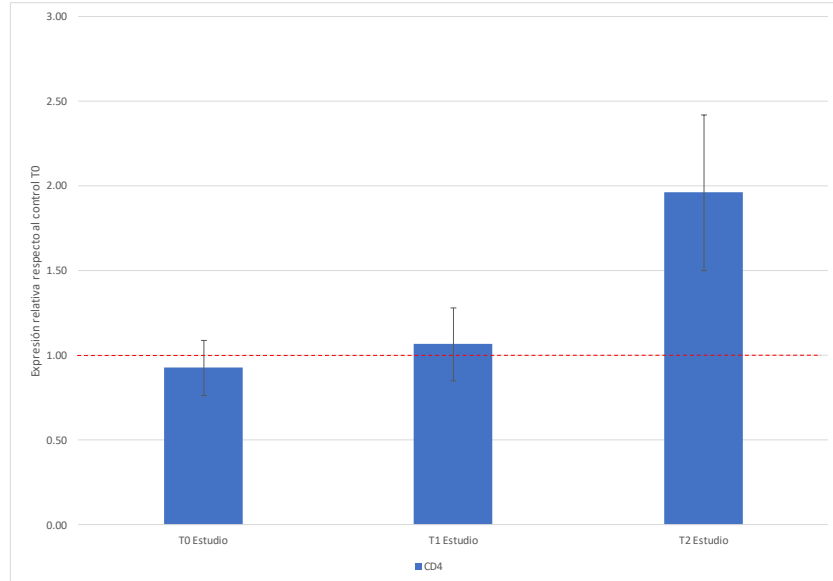


Figura 1. Nivel de mRNA del gen que codifica para CD4, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Estudio (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

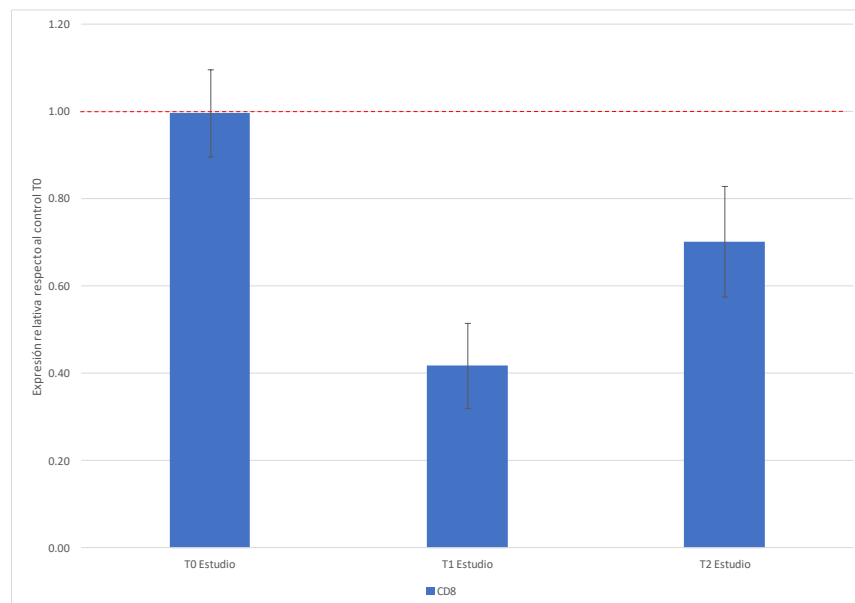


Figura 2. Nivel de mRNA del gen que codifica para CD8, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Estudio (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

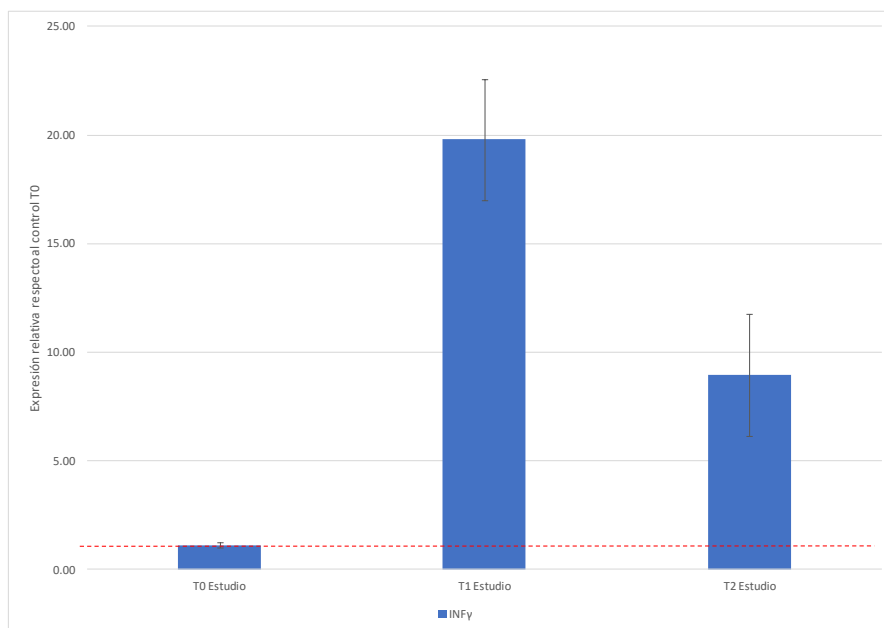


Figura 3. Nivel de mRNA del gen que codifica para INF γ , relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Estudio (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

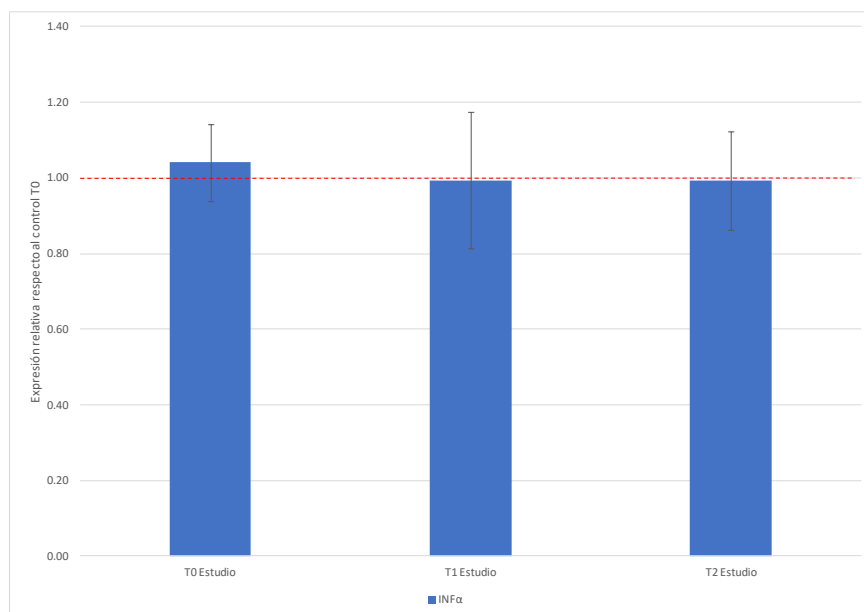


Figura 4. Nivel de mRNA del gen que codifica para INF α , relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Estudio (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

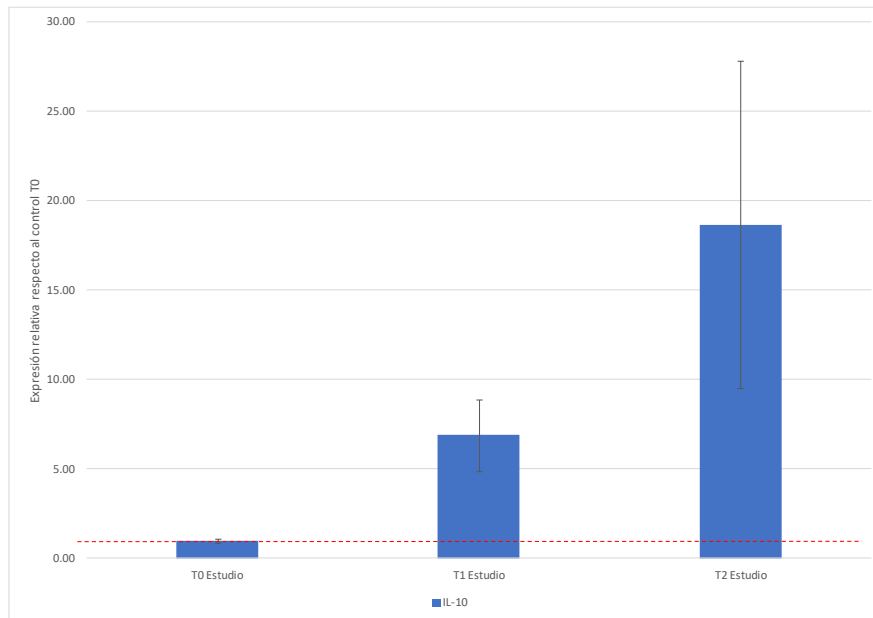


Figura 5. Nivel de mRNA del gen que codifica para IL-10, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Estudio (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

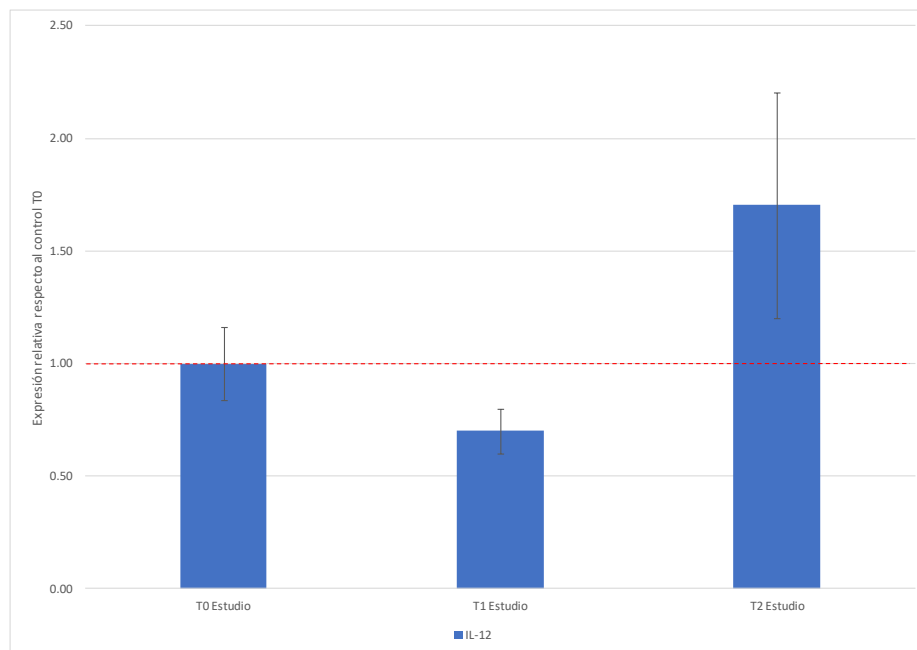


Figura 6. Nivel de mRNA del gen que codifica para IL-12, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Estudio (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

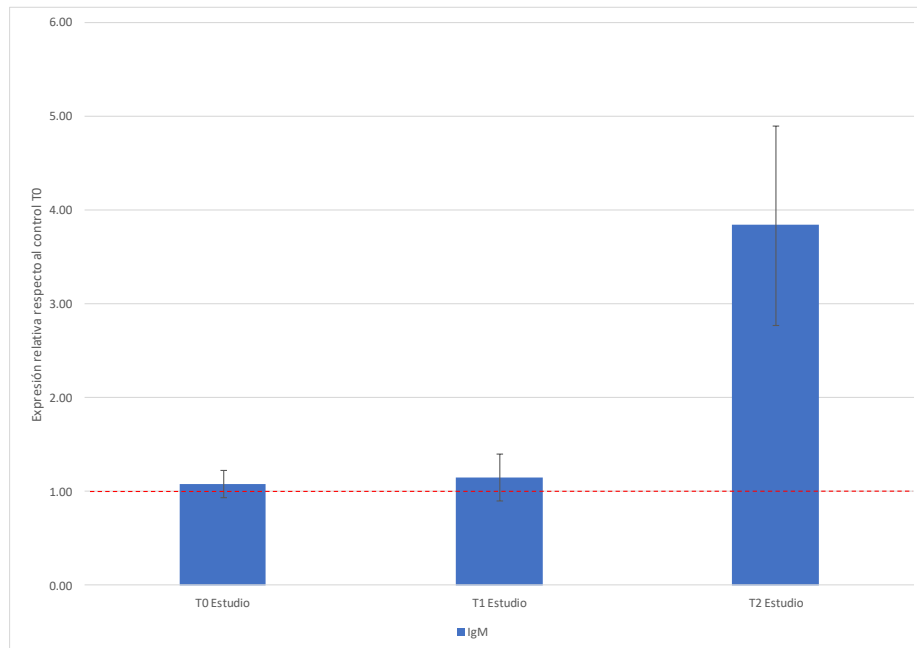


Figura 7. Nivel de mRNA del gen que codifica para IgM, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Estudio (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

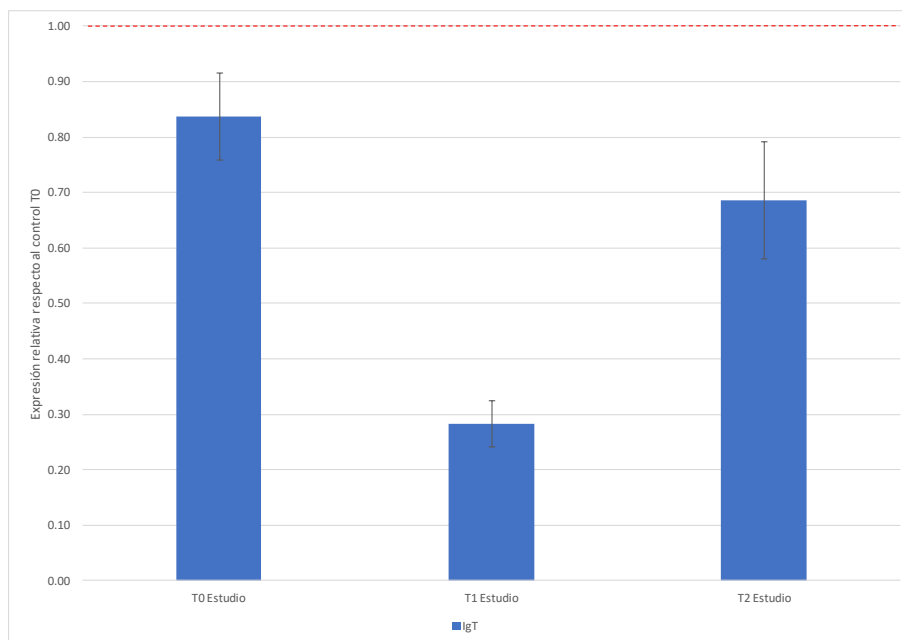


Figura 8. Nivel de mRNA del gen que codifica para IgT, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Estudio (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

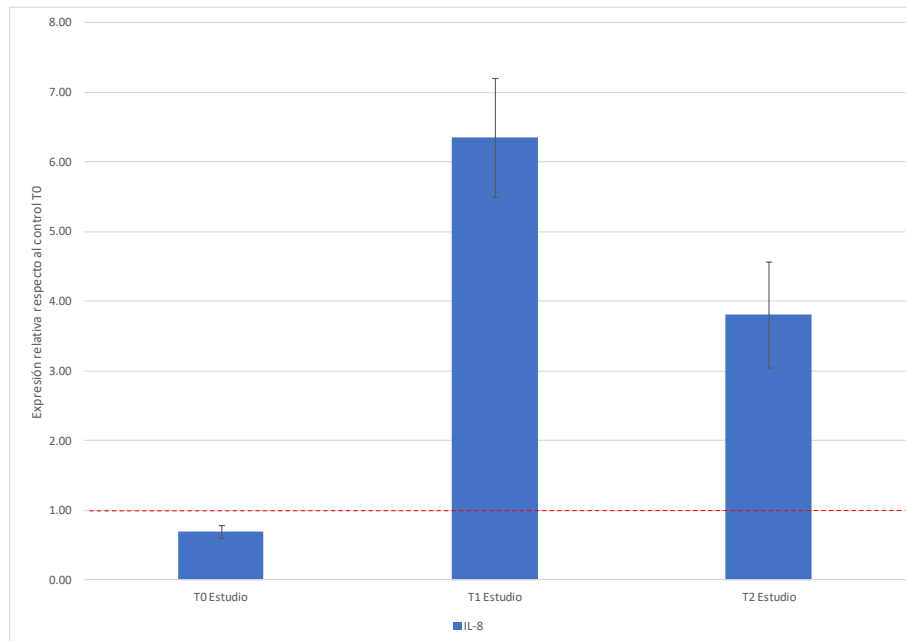


Figura 9. Nivel de mRNA del gen que codifica para IL-8, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Estudio (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

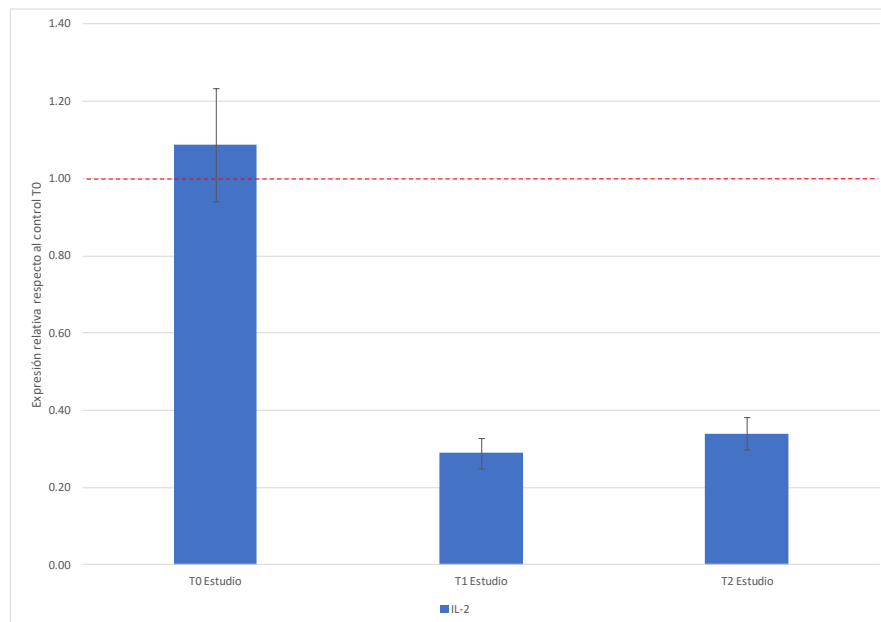


Figura 10. Nivel de mRNA del gen que codifica para IL-2, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Estudio (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

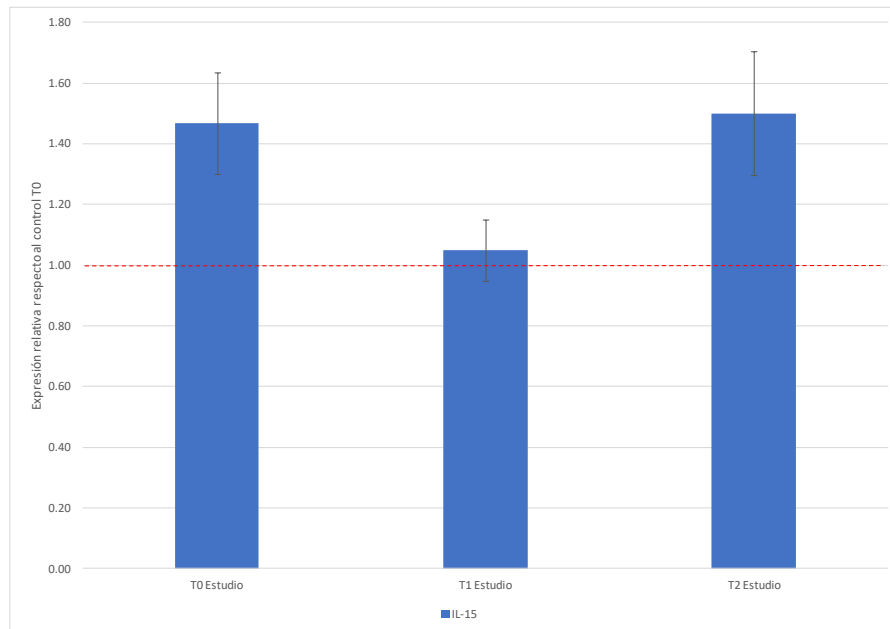


Figura 11. Nivel de mRNA del gen que codifica para IL-15, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Estudio (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

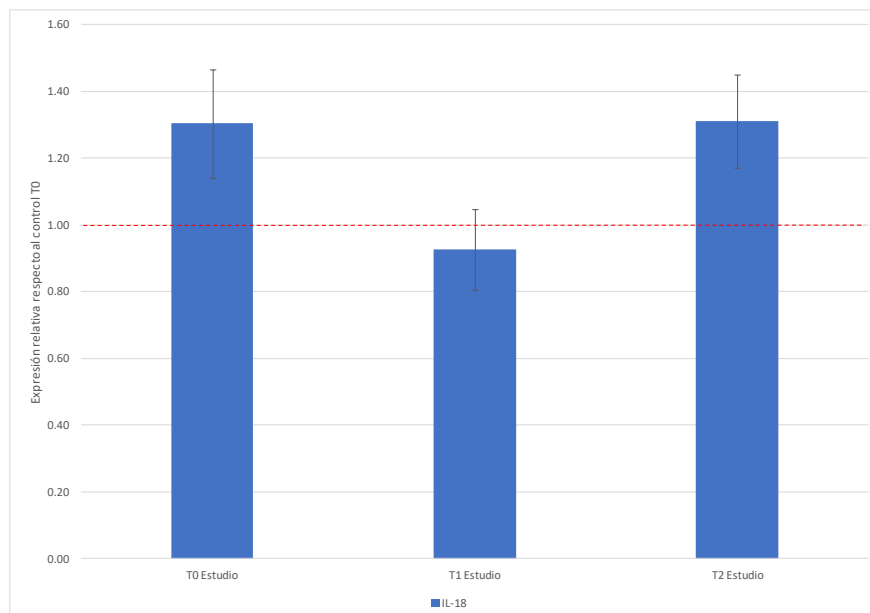


Figura 12. Nivel de mRNA del gen que codifica para IL-18, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Estudio (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

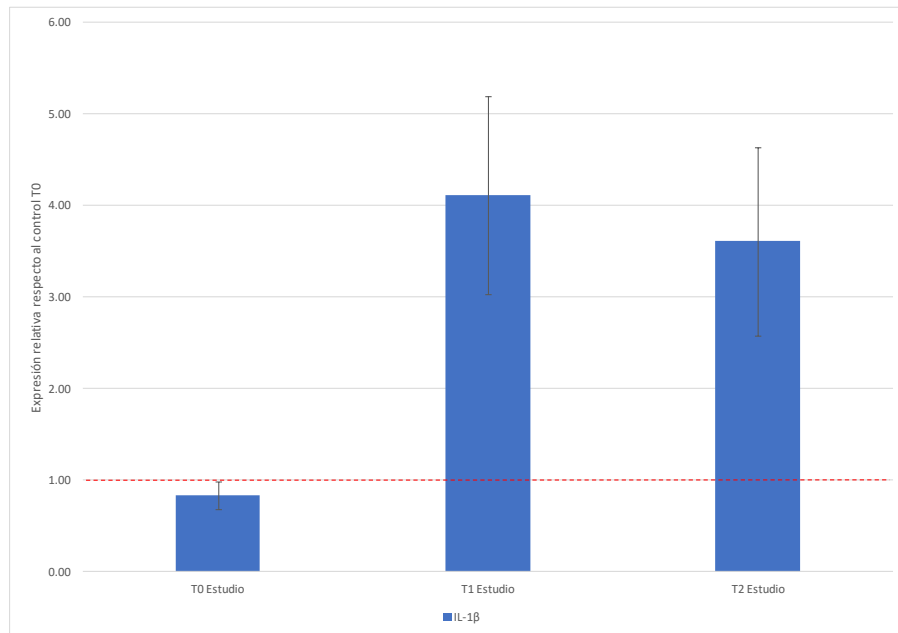


Figura 13. Nivel de mRNA del gen que codifica para IL-1 β , relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Estudio (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

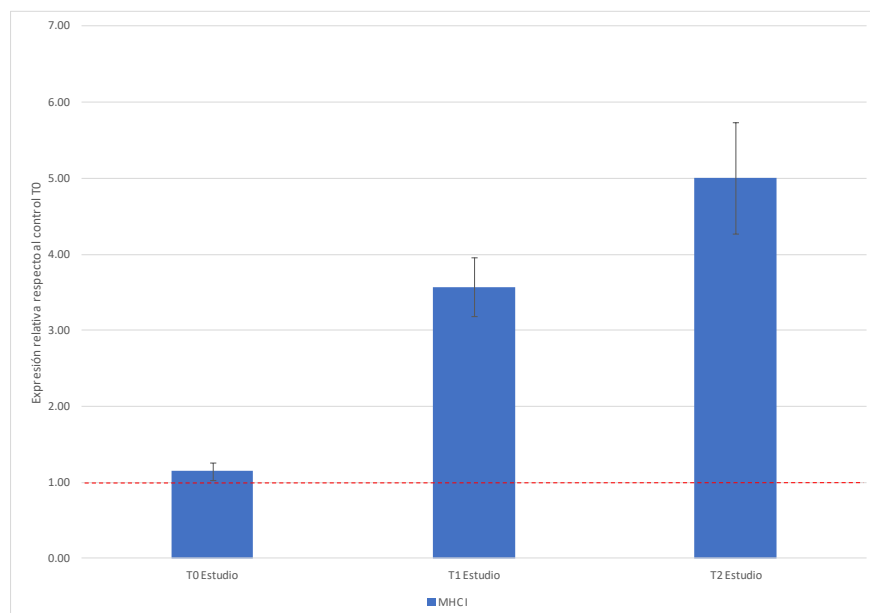


Figura 14. Nivel de mRNA del gen que codifica para MHC I, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Estudio (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

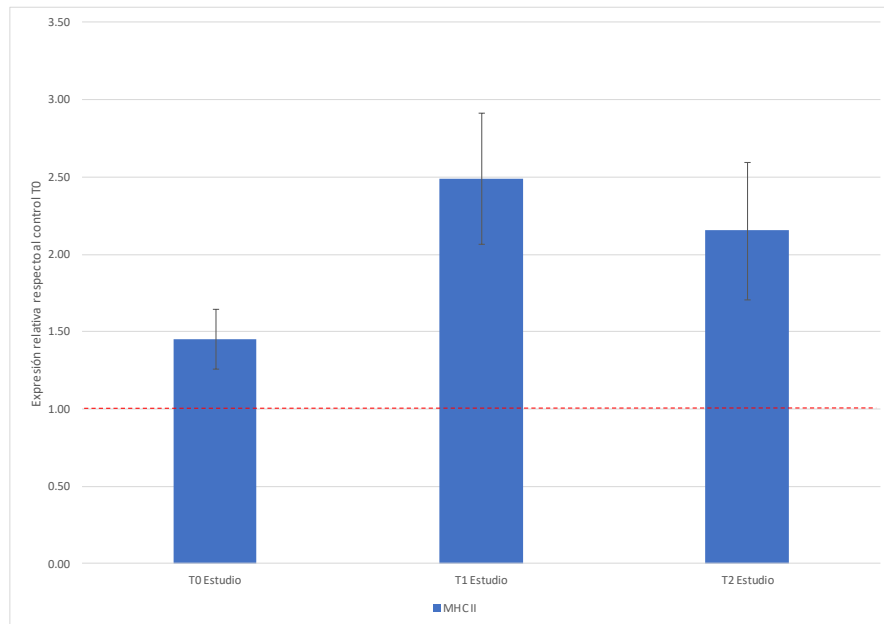


Figura 15. Nivel de mRNA del gen que codifica para MHC II, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Estudio (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

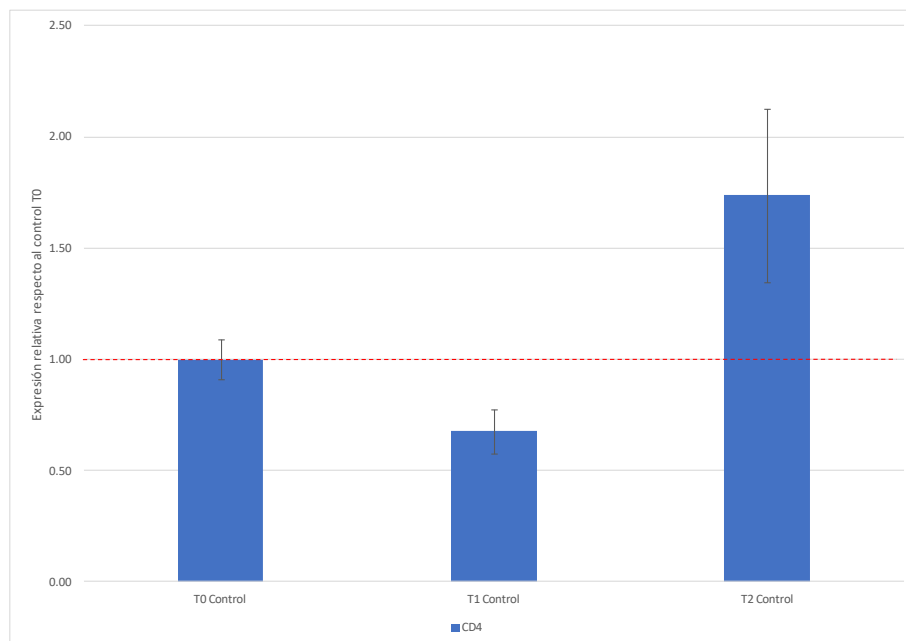


Figura 16. Nivel de mRNA del gen que codifica para CD4, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Control (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

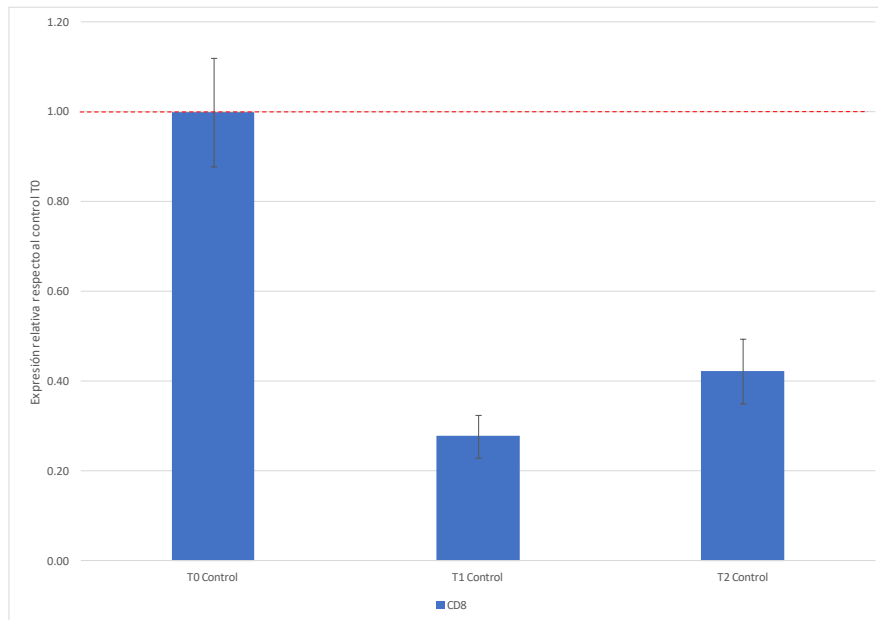


Figura 17. Nivel de mRNA del gen que codifica para CD8, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Control (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

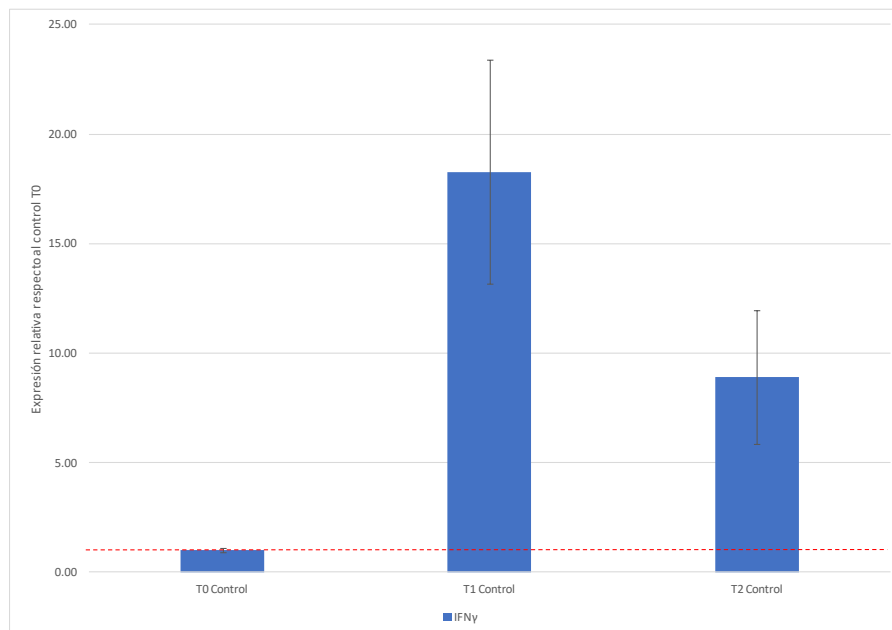


Figura 18. Nivel de mRNA del gen que codifica para IFN γ , relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Control (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

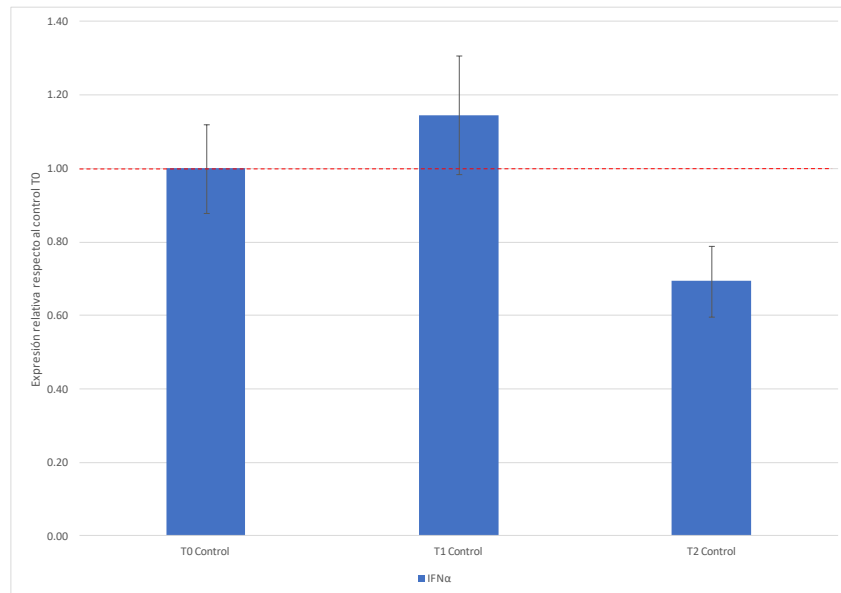


Figura 19. Nivel de mRNA del gen que codifica para IFN α , relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Control (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

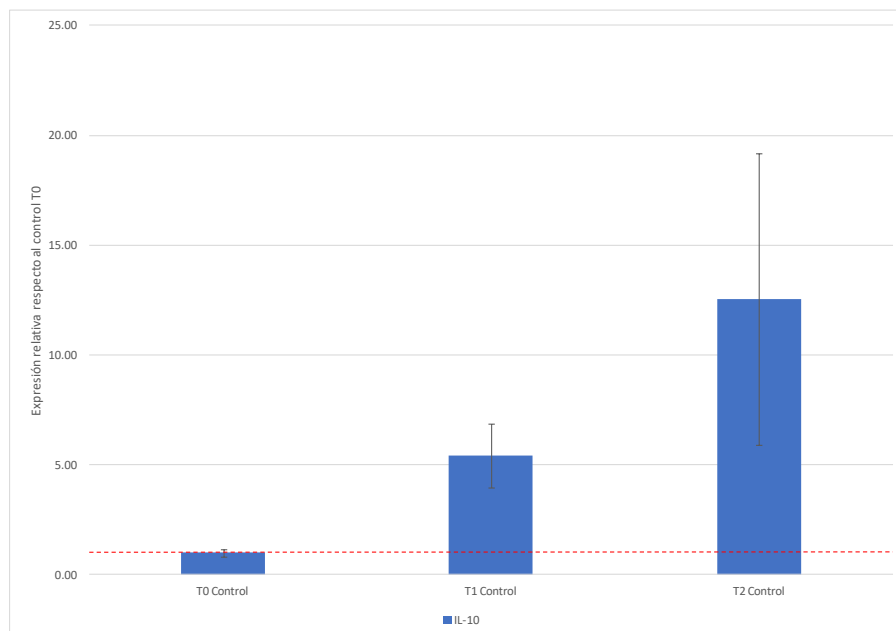


Figura 20. Nivel de mRNA del gen que codifica para IL-10, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Control (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

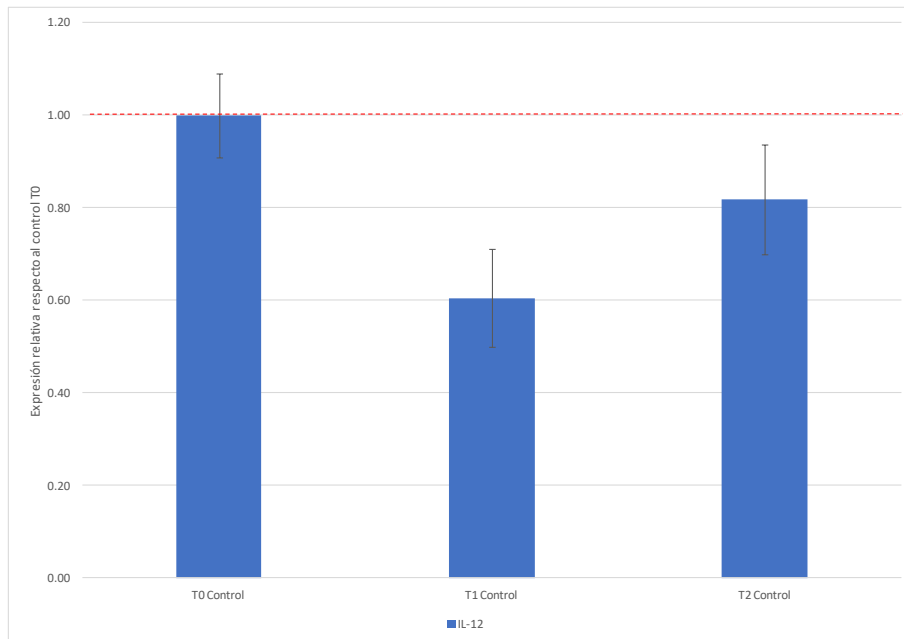


Figura 21. Nivel de mRNA del gen que codifica para IL-12, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Control (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

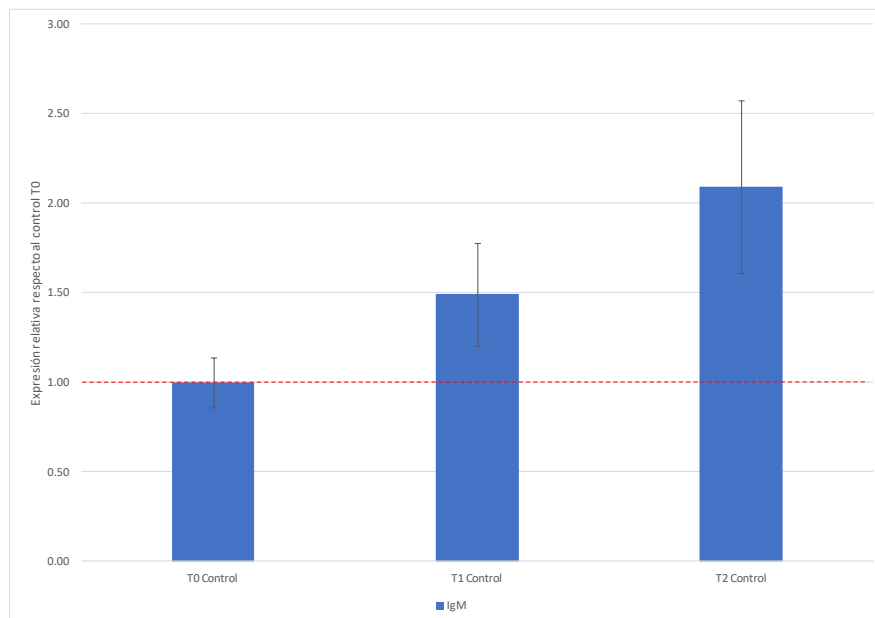


Figura 22. Nivel de mRNA del gen que codifica para IgM, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Control (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

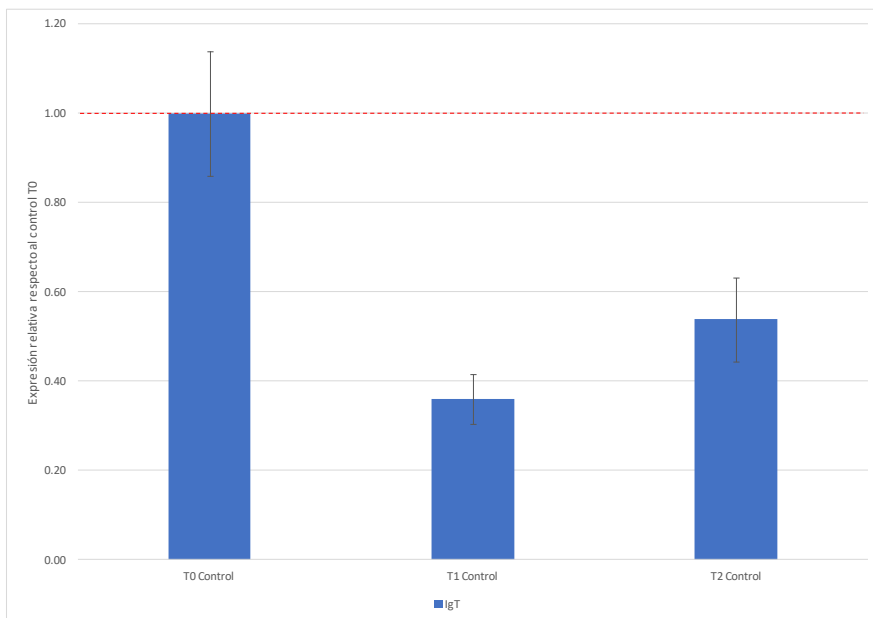


Figura 23. Nivel de mRNA del gen que codifica para IgT, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Control (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

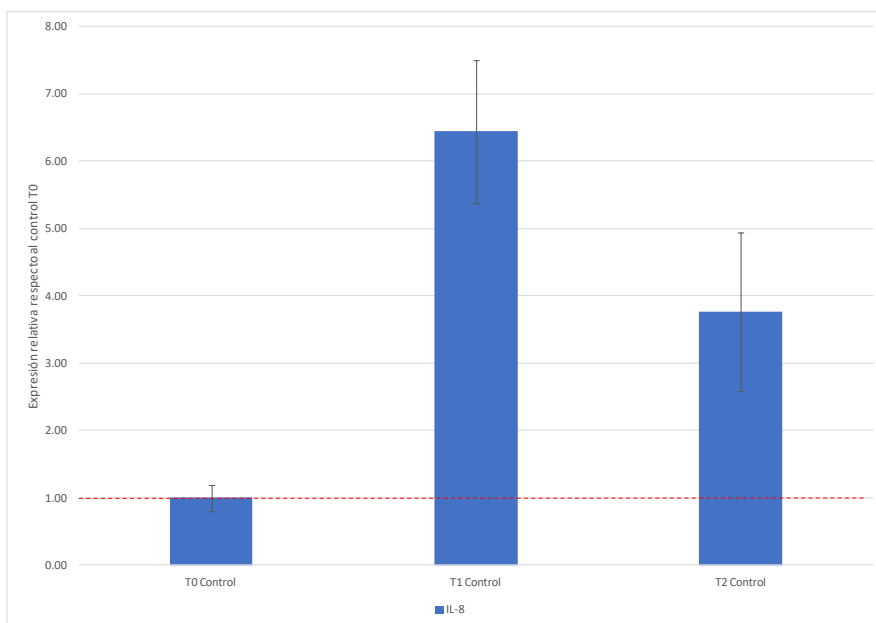


Figura 24. Nivel de mRNA del gen que codifica para IL-8, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Control (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

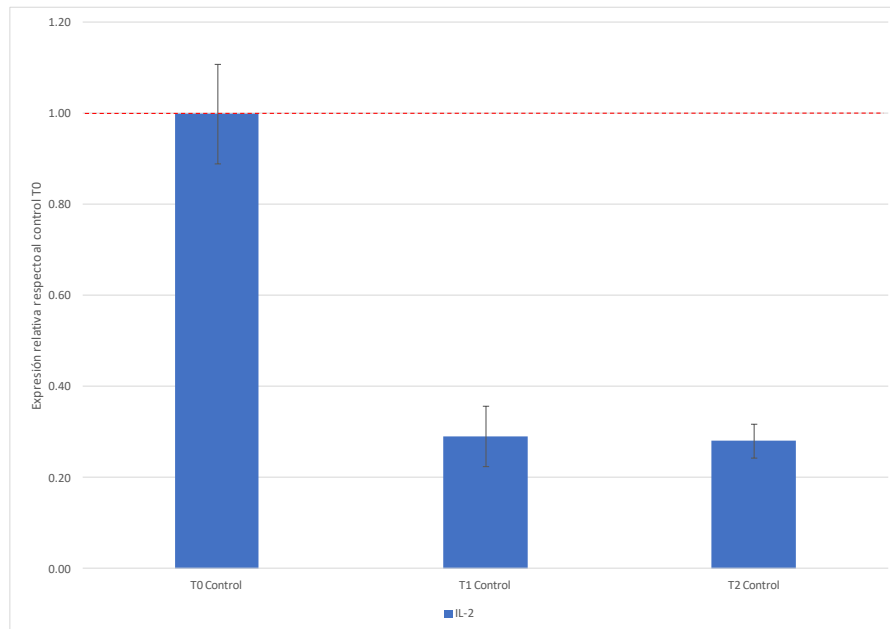


Figura 25. Nivel de mRNA del gen que codifica para IL-2, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Control (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

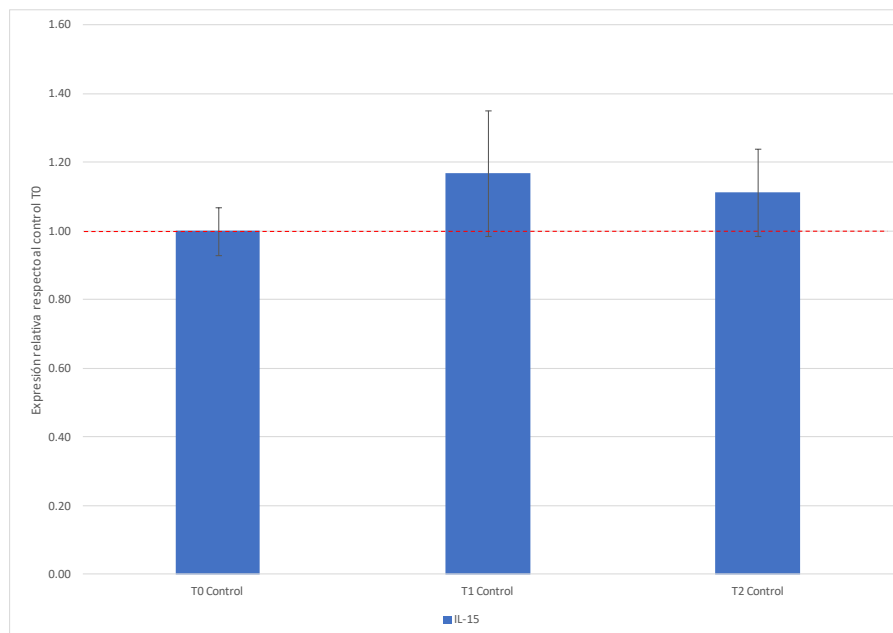


Figura 26. Nivel de mRNA del gen que codifica para IL-15, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Control (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

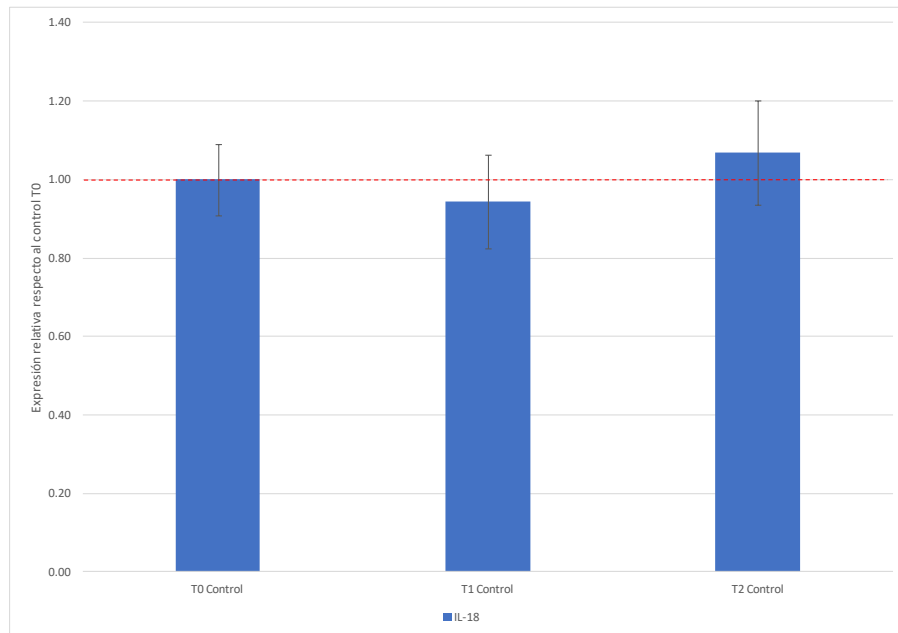


Figura 27. Nivel de mRNA del gen que codifica para IL-18, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Control (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

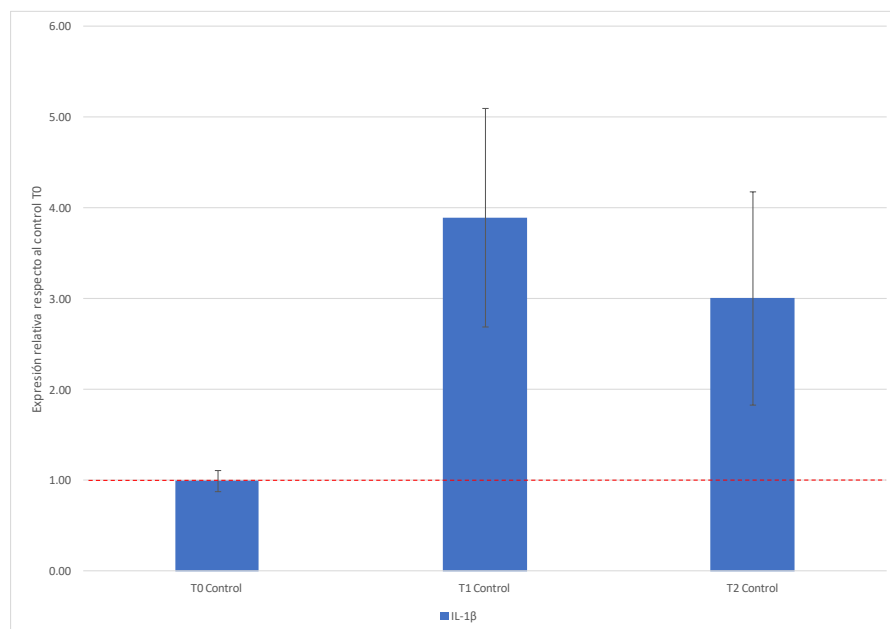


Figura 28. Nivel de mRNA del gen que codifica para IL-1 β , relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Control (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

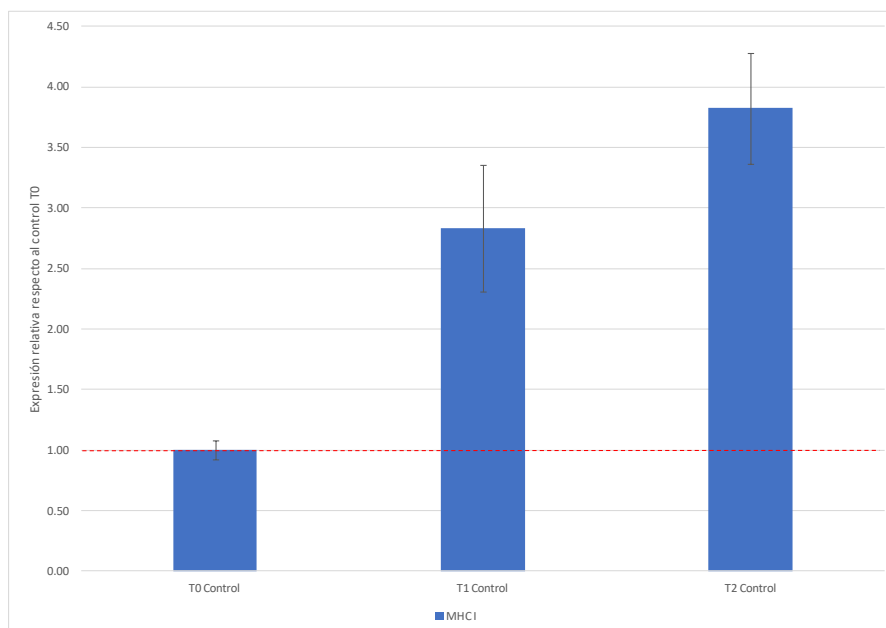


Figura 29. Nivel de mRNA del gen que codifica para MHC I, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Control (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

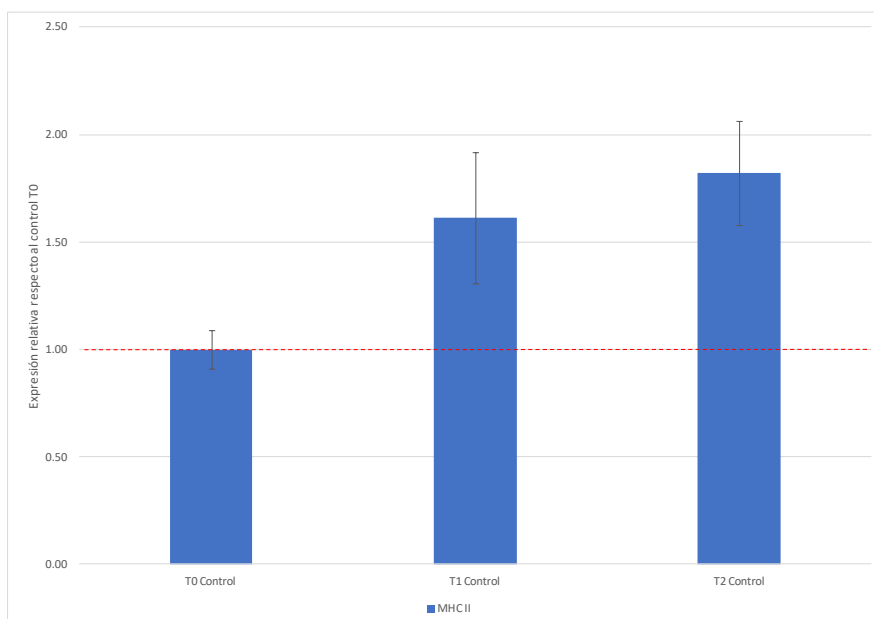


Figura 30. Nivel de mRNA del gen que codifica para MHC II, relativo al nivel de expresión de un grupo de peces control T0 (SM01) en cada tiempo analizado para la condición Control (expresión relativa = 1, marcada con línea discontinua de color rojo) y normalizado con la expresión de los genes de referencia ELF-1 α y β -Actina. Los datos son mostrados como promedio $\pm$ error estándar (líneas negras de las barras; cada barra indica el promedio de la expresión de 8 peces por estanque y por tiempo).

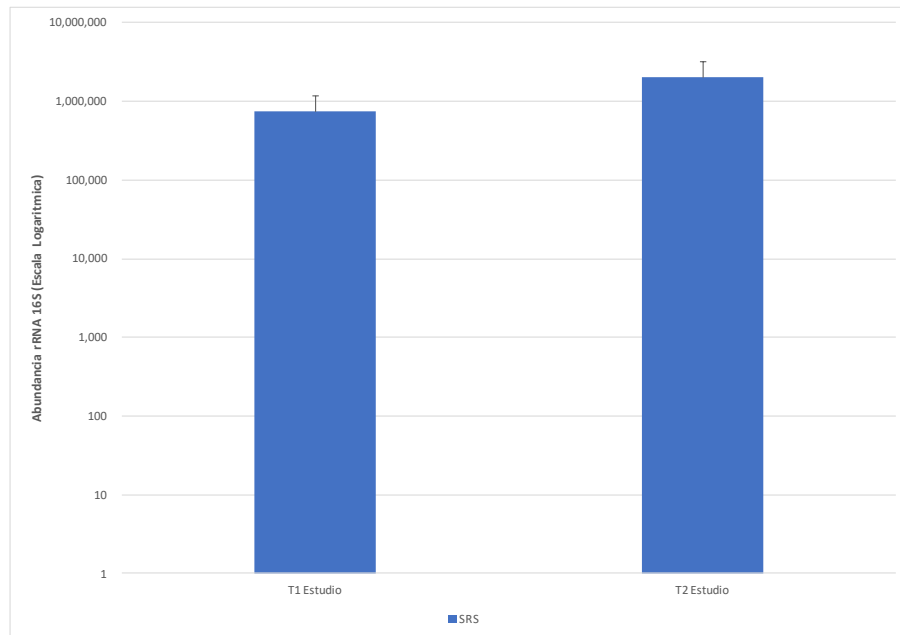


Figura 31. Carga bacteriana de *Piscirickettsia salmonis* en peces desafiados durante dos etapas de infección (T1 y T2) en condición Estudio. Abundancia de rRNA 16S de *P. salmonis* en riñón. Cada barra representa el promedio de la cantidad relativa (Log_{10}) del transcrito de 8 individuos y su error estándar.

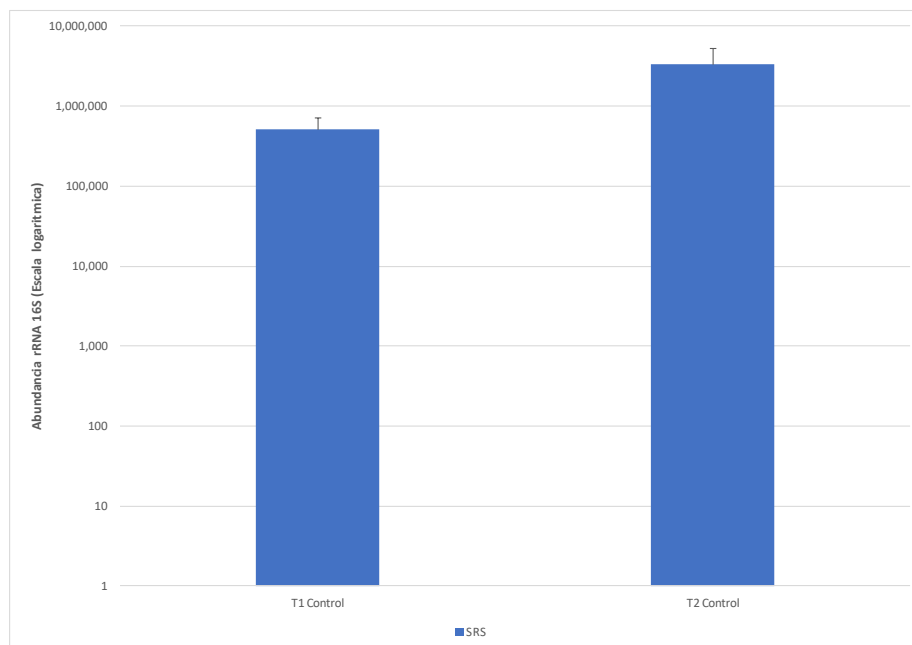


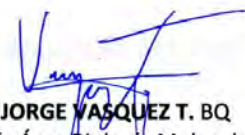
Figura 32. Carga bacteriana de *Piscirickettsia salmonis* en peces desafiados durante dos etapas de infección (T1 y T2) en condición Control. Abundancia de rRNA 16S de *P. salmonis* en riñón. Cada barra representa el promedio de la cantidad relativa (Log_{10}) del transcrito de 8 individuos y su error estándar.

IV.- COMENTARIOS E INTERPRETACIONES

- Se observa una disminución significativa ($P < 0,001$, prueba de t, T0 vs T1) de la expresión de CD4 en T1 en el grupo Control y no en el grupo Estudio.
- CD8 disminuye significativamente ($P < 0,001$, prueba de t) su expresión en ambos grupos.
- IFN γ aumenta significativamente su expresión en T1 ($P < 0,001$, prueba de t) en ambos grupos, indicando la inducción de una respuesta inmune adaptativa de tipo celular.
- La respuesta de IFN α no se modifica significativamente.
- IL-10 parece aumentar su expresión progresivamente en los grupos Control y Estudio de forma idéntica.
- IL-12 parece disminuir su expresión en T1 en ambos grupos y aumentar significativamente ($P < 0,05$, prueba de t, T2 vs T1) solo en grupo Estudio en T2 lo que puede indicar que solo en este grupo la respuesta inmune celular se mantiene.
- IgM aumenta su expresión significativamente en T2, principalmente en grupo Estudio ($P < 0,01$, prueba de t, T2 vs T0), indicando la inducción de una respuesta inmune adaptativa de tipo humoral.
- La expresión de IgT se correlaciona inversamente con la expresión de IgM, sugiriendo una respuesta inmune humoral sistémica más que en mucosas.
- IL-8 e IL-1b aumentan su expresión indicando una respuesta inflamatoria que ocurre en ambos grupos.
- La respuesta de IL-2 es idéntica en ambos grupos bajando su expresión.
- IL-15 no muestra cambios significativos, IL-18 tampoco.
- MHCI aumenta de forma similar en ambos grupos al igual que MHCII.
- La carga de *P. salmonis* parece aumentar con el tiempo más en el grupo Control que en el grupo Estudio.



CAROLINA SENN R., BM
Jefe de laboratorio



JORGE VÁSQUEZ T. BQ
Jefe Área Biología Molecular

VCC-18.00032

S4_28.06.2018

CR#1

General				
ID Pez	Marca	Peso	Largo	K
1	LM	174,0	25,0	1,11
2	LM	127,0	22,0	1,19
3	LM	166,0	24,0	1,20
4	LM	142,0	23,0	1,17
5	RM	188,0	25,0	1,20
6	RM	197,0	25,5	1,19
7	LM	227,0	26,5	1,22
8	LM	197,0	25,5	1,19
9	RM	174,0	24,5	1,18
10	LM	227,0	26,0	1,29
11	RM	219,0	27,0	1,11
12	RM	195,0	25,0	1,25
13	LM	189,0	25,0	1,21
14	LM	190,0	24,5	1,29
15	RM	180,0	25,0	1,15
16	RM	149,0	23,5	1,15
17	RM	186,0	25,0	1,19
18	RM	134,0	22,5	1,18
19	RM	216,0	25,5	1,30
20	LM	190,0	25,0	1,22
21	LM	146,0	23,0	1,20
22	RM	177,0	24,5	1,20
23	RM	157,0	23,0	1,29
24	LM	177,0	24,5	1,20

Aletas							
Dorsal	Caudal	Anal	Pect I	Pect D	Pelvic I	Pelvic D	Dorsal (mm)
3	2	3	2	1	2	2	27
2	2	1	4	2	2	1	26
1	1	2	3	3	1	1	28
3	2	2	3	2	1	2	27
3	2	1	3	4	1	1	26
1	1	1	1	2	2	1	30
1	2	2	2	3	3	2	24
2	1	2	4	1	1	2	26
3	2	2	1	2	1	1	27
3	2	2	3	1	2	2	27
4	2	3	3	1	2	1	30
1	1	1	3	1	1	1	30
2	2	1	1	2	1	1	23
2	2	2	2	1	2	2	30
1	1	2	3	2	2	1	29
1	3	2	3	2	1	1	27
1	1	1	2	1	1	1	30
1	1	2	2	2	1	1	27
1	1	2	2	2	1	1	27
2	3	2	1	1	1	1	30
2	2	2	2	3	1	1	26
1	2	1	3	1	1	1	26
3	2	3	2	1	2	1	24
2	2	2	3	1	2	1	27

Anal (mm)	Pectl I (mm)	Dorsal index	Anal index	Pectoral index
21	30	10,8	8,4	12,0
20	24	11,8	9,1	10,9
21	29	11,7	8,8	12,1
19	27	11,7	8,3	11,7
22	30	10,4	8,8	12,0
22	32	11,8	8,6	12,5
24	33	9,1	9,1	12,5
23	24	10,2	9,0	9,4
23	31	11,0	9,4	12,7
23	32	10,4	8,8	12,3
24	32	11,1	8,9	11,9
24	31	12,0	9,6	12,4
24	32	9,2	9,6	12,8
23	31	12,2	9,4	12,7
21	29	11,6	8,4	11,6
22	27	11,5	9,4	11,5
24	33	12,0	9,6	13,2
20	29	12,0	8,9	12,9
22	30	10,6	8,6	11,8
22	32	12,0	8,8	12,8
21	31	11,3	9,1	13,5
20	22	10,6	8,2	9,0
21	30	10,4	9,1	13,0
22	27	11,0	9,0	11,0

Average Fin index p-value ttest

10,4
10,6
10,8
10,6
10,4
11,0
10,2
9,5
11,0
10,5
10,6
11,3
10,5
11,4
10,5
10,8
11,6
11,3
10,3
11,2
11,3
9,3
10,9
10,3

0,3895

HEALTH ASSESMENT INDEX HAI

Pez	Marca	Examen Externo						Examen Interno								Individual score	SD	CV
		Piel	Aletas	Ojos	Branquias	Deformidades		Hígado	Riñón	Corazón	Estómago	Intestino	Ciegos pilóricos	Bazo	Grasa Visceral			
		0 a 3	0 a 3	0 o 3	0 o 3	0, 2 o 3		0 o 3	0 o 3	0 o 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 o 3	0 a 4			
1	LM	1	1	0	0	0		3	0	0	0	0	0	3	1	80	25,4203787	
2	LM	1	1	0	0	0		3	3	0	0	0	0	3	1	110		
3	LM	2	1	0	0	0		3	0	0	0	0	0	3	1	90		
4	LM	1	1	0	0	0		3	3	0	0	0	0	3	1	110		
7	LM	1	1	0	0	0		3	3	0	0	0	0	0	2	80		
8	LM	1	1	3	0	0		3	3	0	0	0	0	0	2	110		
10	LM	1	1	3	0	0		2	3	0	0	1	0	1	2	120		
13	LM	1	1	0	0	0		1	0	0	0	0	0	2	2	50		
14	LM	1	1	0	0	0		2	3	0	0	0	0	2	2	90		
20	LM	1	1	0	0	0		0	3	0	0	0	0	2	1	70		
21	LM	1	1	0	0	0		3	3	0	0	0	0	2	1	100		
24	LM	1	1	3	0	0		3	3	0	0	0	0	3	1	140		
5	RM	1	1	0	0	0		3	3	0	0	0	0	3	1	110		
6	RM	1	1	0	0	0		3	3	0	0	0	0	3	1	110		
9	RM	2	1	3	0	0		3	3	0	0	0	0	3	2	150		
11	RM	1	1	0	1	0		2	3	0	0	0	0	3	2	110		
12	RM	1	1	0	0	0		2	3	0	0	0	0	3	2	100		
15	RM	2	1	3	0	0		2	3	3	0	0	0	2	2	160		
16	RM	1	1	3	0	0		3	3	0	0	0	0	2	2	130		
17	RM	1	1	3	0	0		3	3	0	0	0	0	2	1	130		
18	RM	1	1	3	0	0		3	3	0	0	0	0	2	2	130		
19	RM	1	1	3	0	0		3	0	0	0	0	0	2	2	100		
22	RM	1	1	3	0	0		3	3	0	0	0	0	2	1	130		
23	RM	1	1	3	0	0		3	0	0	0	0	0	2	1	100		

I. DATOS DEL CLIENTE

Empresa : Sustainable Products SpA (Veso Chile)
Dirección : Camino a Pargua km 57, Calbuco
Contacto : Vicente Castro

II. DATOS DE LAS MUESTRAS

Caso	: M-13844 a M-13845	Tipo de Agua	: Mar
Centro de cultivo	: Veso Chile	Fecha y hora de muestreo	: 03.07.2018 14:00
Producto / Especie	: <i>Salmo salar</i>	Muestreado por	: Cliente
Lote / Grupo	: VCC_18.00032_S4	Procedimiento muestreo	: No informado
Identificación	: Grupo LM-RM	Fecha y hora recepción	: 04.07.2018 08:40
Estadio productivo	: Smolt	Fecha y hora Inicio	: 04.07.2018 11:30
Tipo de Muestreo	: Dirigido	Fecha y hora término	: 05.07.2018 18:17
N° y Tipo de Muestras	: 22 Muestras de Plasma	Fecha emisión de informe	: 05.07.2018
N° y Tipo de Análisis	: 22 Bioplasma®Stress		

Acreditado por INN, Acreditación LE 1366

III. RESULTADOS

M-13844		Bioplasma® Stress	
Grupo LM	CRT **	GLU	LCT
1	59,4	3,5	2,5
2	77,9	3,4	2,5
3	17,8	5,8	3,6
4	18,2	3,8	3,2
5	83,3	3,7	3,0
6	106	3,4	5,5
7	27,8	4,2	3,0
8	< 10,1	6,4	3,0
9	< 10,1	5,2	5,0
11	60,5	2,5	5,7
12	47,5	3,9	5,7
Mediana	59,4*	3,8	2,9
Media	55,4	3,5	2,5
Desv. Estándar	30,6	1,4	0,6
Intervalo de referencia <i>Salmo salar</i> (Smolt)			
Mínimo	< 43	1,3	0,4
Máximo		11,2	7,1
Unidades	ng/mL	mmol/L	mmol/L

M-13845		Bioplasma® Stress	
Grupo RM	CRT **	GLU	LCT
1	63,4	3,4	4,6
2	36,2	4,2	4,0
3	67,4	3,3	5,4
4	< 10,1	6,1	4,2
5	< 10,1	3,6	3,6
6	16,0	3,0	4,1
7	< 10,1	3,9	3,6
8	98,9	2,9	5,6
9	15,6	5,0	3,5
11	< 10,1	4,8	5,5
12	21,1	5,4	5,6
Mediana	36,2	3,9	4,7
Media	45,5	3,4	4,6
Desv. Estándar	31,9	0,5	0,7
Intervalo de referencia <i>Salmo salar</i> (Smolt)			
Mínimo	< 43	1,3	0,4
Máximo		11,2	7,1
Unidades	ng/mL	mmol/L	mmol/L

* Valores fuera de rangos de referencia validados por Laboratorio Pathovet.

** Ensayos no incluidos en el alcance de acreditación.

Metodologías:

PV-I-PC-007: Determinación de parámetros hormonales con Immulite 1000. **

"Estos Resultados corresponden sólo a las muestras analizadas y señaladas en este informe. Este documento no debe ser reproducido total ni parcialmente sin la autorización escrita de Pathovet Ltda."

Parámetro		LD	LC	Lsup	Unidad
GLU	Glucosa	0,11	NI	41,6	mmol/l
LCT	Lactato	0,2	NI	15,5	mmol/l
CRT	Cortisol **	10,1	NI	498,2	ng/ml

Abreviaturas: LD: límite de Detección, LC: límite de cuantificación, Lsup: límite superior del test, NI: No informado

IV. COMENTARIOS

M-13844

Hipercortisolemia leve, la cual se asocia a una respuesta primaria a estrés agudo.

M-13845

Los parámetros analizados se encuentran dentro de su intervalo de referencia para peces smolt de *Salmo salar*.



CAROLINA SENN R., BM
Jefe de laboratorio



ROMINA WALKER V. MV
Jefe Área Patología Clínica

I.- DATOS DEL CLIENTE

Empresa : Sustainable Products SpA (Veso Chile)
Dirección : Camino Pargua Km. 57, Calbuco
Contacto : Vicente Castro

II.- DATOS DE LA(S) MUESTRA(S)

Caso	: M-13842 a M-13843	Tipo de Agua	: Mar
Centro de cultivo	: Veso Chile	Tipo de Muestreo	: Dirigido
Lote / Grupo	: VCC_18.00032_S4	Fecha y hora de muestreo	: 03.07.2018 14:00
Identificación	: Grupo LM-RM	Muestreado por	: Cliente
Tipo de Muestras	: Órganos en Formalina 10%	Procedimiento muestreo	: No informado
N° de Muestras	: 48 Órganos	Fecha y hora recepción	: 04.07.2018 08:40
Producto / Especie	: <i>Salmo salar</i>	Fecha y hora Inicio	: 04.06.2018 15:00
Estadío Productivo	: Smolt	Fecha y hora término	: 06.07.2018 13:00
Análisis Solicitados	: 48 Procesamiento Histológico Órganos con Tinción	Fecha de emisión informe	: 06.07.2018

III.- RESULTADOS

1.- Tabla de Resultados

N° CASO PATHOVET	IDENTIFICACIÓN	N° LÁMINAS OBTENIDAS	FECHA DE ENTREGA
M-13842	Grupo LM (1 al 12)	24 (Riñón-Hígado)	06.07.2018
M-13843	Grupo RM (1 al 12)	24 (Riñón-Hígado)	06.07.2018

2.- Metodologías Utilizadas

PV-I-AP-001: Procesamiento y Diagnóstico Histológico (Acreditado por INN, Acreditación LE 1365)

PV-I-AP-002: Tinción de Rutina con Hematoxilina – Eosina (Acreditado por INN, Acreditación LE 1365)



CAROLINA SENN R., BM
Jefe de laboratorio



RICARDO ILDEFONSO C., MV. TM
Gerente Técnico

VCC-18.00032
S4_28.06.2018
CR#1

Pez	Marca	Indicadores PEZ																		
		Ojos	Corazon	Org. Abd.	Branquias	Operculo	Musc. Esq.	Vacun	Def vert	Aleta	Piel	K	Emaciad	Maduro	Higado	Bazo	Estom.	Ciego	Intest	Riñ
1	LM	1	1	2	1	1	1		1	1	1		1	1	2	3	1	1	1	1
2	LM	1	1	2	1	1	1		1	1	1		1	1	2	3	1	1	1	2
3	LM	1	1	1	1	1	1		1	1	3		1	1	2	3	1	1	1	2
4	LM	1	1	1	1	1	1		1	1	1		1	1	2	3	1	1	1	2
5	RM	1	1	2	1	1	1		1	1	1		1	1	2	3	1	1	1	2
6	RM	1	1	2	1	2	1		1	1	2		1	1	2	3	1	1	1	2
7	LM	1	1	1	1	1	1		1	1	1		1	1	2	3	1	1	1	2
8	LM	3	1	2	1	1	1		1	2	2		1	1	2	3	1	1	1	2
9	RM	1	1	1	1	1	1		1	2	1		1	1	2	3	1	1	1	2
10	LM	3	1	1	1	1	1		1	1	2		1	1	2	3	1	1	1	2
11	RM	1	1	1	1	1	1		1	2	2		1	1	2	3	1	1	1	2
12	RM	1	1	1	1	1	1		1	2	2		1	1	2	3	1	1	1	2
13	LM	1	1	1	1	1	1		1	2	2		1	1	1	3	1	1	1	1
14	LM	1		2	1	1	1		1	2	2		1	1	2	3	1	1	1	2
15	RM	1	2	2	1	1	1		1	2	2		1	1	2	3	1	1	1	2
16	RM	1	1	2	1	1	1		1	2	2		1	1	2	3	1	1	1	2
17	RM	1	1	2	1	1	1		1	2	2		1	1	2	3	1	1	1	2
18	RM	1	1	2	1	1	1		1	2	2		1	1	2	3	1	1	1	2
19	RM	3	1	2	1	1	1		1	2	2		1	1	2	3	1	1	1	1
20	LM	1	1	2	1	1	1		1	2	2		1	1	2	3	1	1	1	2
21	LM	3	1	2	1	1	1		1	2	2		1	1	2	3	1	1	1	2
22	RM	3	1	2	1	1	1		1	2	3		1	1	2	3	1	1	1	2
23	RM	3	1	2	1	1	1		1	2	2		1	1	2	3	1	1	1	1
24	LM	3	1	2	1	1	1		1	2	2		1	1	2	3	1	1	1	2

Anexo 8

I. DATOS DEL CLIENTE

Empresa : Sustainable Products SpA (Veso Chile)
Dirección : Camino a Pargua km 57, Calbuco
Contacto : Vicente Castro

II. DATOS DE LAS MUESTRAS

Caso	: M-13962 a M-13963	Tipo de Agua	: Mar
Centro de cultivo	: Veso Chile	Fecha y hora de muestreo	: 17.07.2018 15:00
Producto / Especie	: <i>Salmo salar</i>	Muestreado por	: Cliente
Lote / Grupo	: VCC_18.00032_S5	Procedimiento muestreo	: No informado
Identificación	: Grupo LM-RM	Fecha y hora recepción	: 18.07.2018 09:00
Estadio productivo	: Smolt	Fecha y hora Inicio	: 18.07.2018 11:36
Tipo de Muestreo	: Azar	Fecha y hora término	: 18.07.2018 17:26
N° y Tipo de Muestras	: 20 Muestras de Plasma	Fecha emisión de informe	: 18.07.2018
N° y Tipo de Análisis	: 20 Bioplasma®Stress		

Acreditado por INN, Acreditación LE 1366

III. RESULTADOS

M-13962	Bioplasma® Stress		
LM	CRT **	GLU	LACT
1	83,7	4,3	2,5
2	184	2,3	4,2
3	38,4	4,1	2,9
4	168	3,8	7,0
5	107	6,3	4,1
6	51,8	5,1	3,0
7	107	5,5	3,0
8	134	3,6	4,3
9	84,8	1,4	10,8
10	173	5,0	4,5
11	51,8	1,2	12,3
Mediana	107 *	4,1	3,2
Media	108	4,1	2,9
Desv. Estándar	51,5	1,1	0,9
Intervalo de referencia <i>Salmo salar</i> (Smolt)			
Mínimo	< 73,1	1,3	0,4
Máximo		11,2	7,1
Unidades	ng/mL	mmol/L	mmol/L

M-13963	Bioplasma® Stress		
RM	CRT **	GLU	LACT
1	83,7	5,4	4,8
2	53,3	3,7	4,8
3	95,7	5,3	6,1
4	252	4,3	4,8
5	85,1	4,4	4,4
6	102	3,8	5,1
7	60,1	4,0	4,3
8	97,8	5,5	3,4
9	125	4,3	5,2
Mediana	95,7 *	4,3	5,2
Media	106	5,3	4,8
Desv. Estándar	58,8	0,9	0,8
Intervalo de referencia <i>Salmo salar</i> (Smolt)			
Mínimo	< 73,1	1,3	0,4
Máximo		11,2	7,1
Unidades	ng/mL	mmol/L	mmol/L

* Valores fuera de rangos de referencia validados por Laboratorio Pathovet.

** Ensayos no incluidos en el alcance de acreditación.

"Estos Resultados corresponden sólo a las muestras analizadas y señaladas en este informe. Este documento no debe ser reproducido total ni parcialmente sin la autorización escrita de Pathovet Ltda."

Metodologías:

PV-I-PC-002: Determinación de parámetros bioquímicos mediante Cobas c311 (Acreditación LE 1366)

PV-I-PC-007: Determinación de parámetros hormonales con Immulite 1000. **

Parámetro		LD	LC	Lsup	Unidad
GLU	Glucosa	0,11	NI	41,6	mmol/l
LCT	Lactato	0,2	NI	15,5	mmol/l
CRT	Cortisol **	10,1	NI	498,2	ng/ml

Abreviaturas: LD: límite de Detección, LC: límite de cuantificación, Lsup: límite superior del test, NI: No informado

IV. COMENTARIOS

M-13962 y M-13963

Aumento en la mediana de la concentración de cortisol. La hipercortisolemia se asocia a una respuesta primaria frente a estrés agudo, por ejemplo, en transporte, manejo, vacunación, etc.

La mediana de la concentración de lactato y glucosa se encuentra dentro de sus intervalos de referencia para peces smolt de *Salmo salar*.



CAROLINA SENN R., BM
Jefe de laboratorio



ROMINA WALKER V. MV
Jefe Área Patología Clínica

CR#1

		General		
ID Pez	Marca	Peso	Largo	K
1	LM	161,0	24,5	1,09
2	LM	174,0	24,5	1,18
3	LM	157,0	24,0	1,14
4	LM	152,0	23,5	1,17
5	LM	161,0	24,0	1,16
6	LM	260,0	26,0	1,48
7	LM	184,0	25,0	1,18
8	LM	186,0	25,5	1,12
9	LM	208,0	26,0	1,18
10	LM	139,0	23,5	1,07
11	LM	142,0	23,0	1,17
12				
13	RM	136,0	23,0	1,12
14	RM	150,0	23,0	1,23
15	RM	188,0	25,0	1,20
16	RM	155,0	24,0	1,12
17	RM	245,0	27,0	1,24
18	RM	172,0	24,5	1,17
19	RM	64,0	17,5	1,19
20	RM	163,0	24,0	1,18
21	RM	186,0	26,0	1,06
22				
23				
24				

[illegible]

S5_17.07.2018

[illegible]

VCC-18.00032
S5_17.07.2018
CR#1

[illegible]

Anexo 9

VCC-18.00032
S6_31.07.2018
CR#1

General				
ID Pez	Marca	Peso	Largo	K
1	LM	232,0	27,0	1,18
2	LM	177,0	24,5	1,20
3	LM	219,0	26,5	1,18
4	LM	201,0	26,5	1,08
5	LM	233,0	26,5	1,25
6	LM	225,0	27,5	1,08
7	LM	195,0	26,0	1,11
8	LM	292,0	29,0	1,20
1	RM	240,0	26,5	1,29
2	RM	224,0	27,0	1,14
3	RM	296,0	29,0	1,21
4	RM	327,0	29,0	1,34
5	RM	182,0	25,5	1,10
6	RM	278,0	28,5	1,20
7	RM	198,0	26,0	1,13
8	RM	236,0	26,0	1,34

Aletas									
Dorsal	Caudal	Anal	Pect I	Pect D	Pelvic I	Pelvic D	Dorsal (mm)	26	Pectl I (mm)
1	1	2	1	1	1	1	31	21	35
3	3	2	3	2	2	1	27	25	30
1	1	2	2	1	1	1	30	25	31
2	2	3	3	1	1	1	30	22	31
1	2	2	3	3	1	2	31	25	36
1	1	2	1	1	2	1	33	27	32
1	2	2	2	2	1	1	31	27	30
2	1	2	2	2	1	1	37	30	35
1	1	1	1	1	1	2	30	25	33
4	2	3	2	1	3	2	36	24	32
2	2	2	3	2	1	1	36	27	35
2	2	3	3	2	1	2	35	27	34
3	1	2	3	3	2	2	26	21	29
1	2	3	3	1	2	1	32	26	29
1	1	2	2	1	1	1	31	24	31
2	1	3	2	2	1	1	30	27	36

VCC-18.00032

S5_17.07.2018



HEALTH ASSESMENT INDEX HAI

Pez	Marca	Examen Externo						Examen Interno								Individual score	SD	CV
		Piel	Aletas	Ojos	Branquias	Deformidades		Hígado	Riñón	Corazón	Estómago	Intestino	Ciegos pilóricos	Bazo	Grasa Visceral			
		0 a 3	0 a 3	0 o 3	0 o 3	0, 2 o 3		0 o 3	0 o 3	0 o 3	0 a 3	0 a 3	0 a 3	0 o 3	0 a 4			
1	LM	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	3	2	30	22,8486066	
2	LM	1	1	0	0	0		0	0	0	0	0	0	3	2	50		
3	LM	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	3	2	30		
4	LM	0	0	3	0	0		0	0	0	0	0	0	3	2	60		
5	LM	0	1	0	0	0		0	0	0	0	0	0	3	2	40		
6	LM	0	1	0	0	0		3	0	0	0	0	0	3	2	70		
7	LM	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	3	2	30		
8	LM	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	3	3	30		
																0		
1	RM	0	1	0	0	0		0	0	0	0	0	0	3	2	40		
2	RM	0	1	0	0	0		3	3	0	0	0	0	3	2	100		
3	RM	0	1	0	0	0		0	0	0	0	0	0	3	2	40		
4	RM	0	1	3	0	0		0	0	0	0	0	0	3	2	70		
5	RM	1	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	3	2	40		
6	RM	0	1	0	0	0		0	0	0	0	0	0	3	2	40		
7	RM	0	0	0	0	0		3	0	0	0	0	0	3	2	60		
8	RM	0	1	3	0	0		0	0	0	0	0	0	3	2	70		

VCC-18.00032
 S5_17.07.2018
 CR#1

Pez	Marca	Indicadores PEZ																		
		Ojos	Corazon	Org. Abd.	Branquias	Operculo	Musc. Esq.	Vacun	Def vert	Aleta	Piel	K	Emaciad	Maduro	Higado	Bazo	Estom.	Ciego	Intest	Riñ
1	LM	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
2	LM	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1
3	LM	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
4	LM	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
5	LM	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
6	LM	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1
7	LM	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
8	LM	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
1	RM	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
2	RM	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	2
3	RM	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
4	RM	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
5	RM	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
6	RM	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
7	RM	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1
8	RM	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1

I. DATOS DEL CLIENTE

Empresa : Sustainable Products SpA (Veso Chile)
Dirección : Camino a Pargua km 57, Calbuco
Contacto : Vicente Castro

II. DATOS DE LAS MUESTRAS

Caso	: M-14080 a M-14081	Tipo de Agua	: Mar
Centro de cultivo	: Veso Chile	Fecha y hora de muestreo	: 31.07.2018 16:00
Producto / Especie	: <i>Salmo salar</i>	Muestreado por	: Cliente
Lote / Grupo	: VCC_18.00032_S6	Procedimiento muestreo	: No informado
Identificación	: Grupo LM – Grupo RM	Fecha y hora recepción	: 01.08.2018 09:00
Estadio productivo	: Post-Smolt	Fecha y hora Inicio	: 01.08.2018 15:00
Tipo de Muestreo	: Azar	Fecha y hora término	: 01.08.2018 17.45
N° y Tipo de Muestras	: 16 Muestras de Sangre	Fecha emisión de informe	: 01.08.2018
N° y Tipo de Análisis	: 16 Bioplasma®Stress		

Acreditado por INN, Acreditación LE 1366

III. RESULTADOS

M -14080 GRUPO LM	Bioplasma® Stress		
	CRT **	GLU	LCT
1	17,2	33,1	10,2
2	180	5,3	4,6
3	115	5,3	3,9
4	63,0	4,6	5,2
5	107	6,5	3,8
6	386	7,3	3,3
7	246	4,6	4,4
8	108	6,1	4,9
Mediana	111 *	5,7	4,5
Media	165	5,7	4,3
Desv. Estándar	125	10,4	2,4
Rangos de referencia <i>Salmo salar</i> (Post-smolt)			
Mínimo	0,5		0,4
		< 11,3	
Máximo	105		7,1
Unidades	ng/mL	mmol/L	mmol/L

M -14081 GRUPO RM	Bioplasma® Stress		
	CRT **	GLU	LCT
1	< 10,1	5,7	4,0
2	131	3,7	3,9
3	50,0	6,0	3,5
4	< 10,1	5,5	3,5
5	240	< 0,1	< 0,2
6	116	5,4	3,3
7	171	4,7	3,9
8	53,3	5,0	3,1
Mediana	116 *	5,4	3,5
Media	139	5,2	3,5
Desv. Estándar	70,2	0,8	0,3
Rangos de referencia <i>Salmo salar</i> (Post-smolt)			
Mínimo	0,5		0,4
		< 11,3	
Máximo	105		7,1
Unidades	ng/mL	mmol/L	mmol/L

* Valores fuera de rangos de referencia validados por Laboratorio Pathovet.

** Ensayos no incluidos en el alcance de acreditación.

"Estos Resultados corresponden sólo a las muestras analizadas y señaladas en este informe. Este documento no debe ser reproducido total ni parcialmente sin la autorización escrita de Pathovet Ltda."

Metodologías:

PV-I-PC-002: Determinación de parámetros bioquímicos mediante Cobas c311 (Acreditación LE 1366)

PV-I-PC-007: Determinación de parámetros hormonales con Immulite 1000. **

Parámetro		LD	LC	Lsup	Unidad
GLU	Glucosa	0,11	NI	41,6	mmol/l
LCT	Lactato	0,2	NI	15,5	mmol/l
CRT	Cortisol **	10,1	NI	498,2	ng/ml

Abreviaturas: LD: límite de Detección, LC: límite de cuantificación, Lsup: límite superior del test, NI: No informado

IV. COMENTARIOS

Hipercortisolemia, lo cual se relaciona con una respuesta primaria al estrés, en ambos grupos.

Las medianas de glucosa y lactato se encuentran dentro del intervalo de referencia para peces post-smolt de *Salmo salar*.



CAROLINA SENN R., BM
Jefe de laboratorio



ROMINA WALKER V. MV
Jefe Área Patología Clínica



Coordinación técnica

y administrativa: Claudia Venegas Morales

Investigadores: Vicente Castro del Río
Pablo Ibieta Hillerns

Institución

Ejecutora: VESO Chile SpA

Financiamiento: Programa para la Gestión
Sanitaria en la Acuicultura
Fondo de Inversión Estratégica FIE

