

Posible susceptibilidad de *Oncorhynchus kisutch* a adquirir piscirickettsiosis en la fase de engorda debido al estrés fisiológico que le produce la alimentación a saciedad

Félix Garcías¹, Julio Mendoza², Juan Carvajal³

¹ Aquatic Health Chile
Casilla 457, Puerto Varas (Chile)
e-mail: fgarcias@rdc.cl

² Stolt Sea Farm Chile
Casilla 537, Puerto Montt (Chile)

³ Centro de Investigación y Desarrollo i-mar
Universidad de los Lagos, Casilla 557, Puerto Montt (Chile)

Resumen

Entre diciembre de 2000 y septiembre de 2001, de un centro de engorda de salmón coho ubicado en el estuario Reloncaví, se obtuvo el peso y factor de condición de 832 salmones. Además se enviaron a los laboratorios de Aquatic Health 142 muestras de mortalidad para el análisis microbiológico, obtención del índice gonadosomático (IGS), hepatosomático (IHS) y para la determinación del sexo. Las muestras sólo entregaron diagnósticos positivos de SRS. El hecho de que hasta junio de 2001 (primeras etapas del ciclo) los salmones de mortalidad fueran más gordos (mayor factor de condición) que los de muestreos, y que en los salmones infectados con SRS los IHS fueran más grandes que en los no infectados, sugiere la posible influencia de un estrés fisiológico provocado por la alimentación a saciedad que los hizo más susceptibles a adquirir SRS. De hecho, en esta misma etapa del ciclo, al considerar sólo a los salmones de mortalidad, los infectados presentaron mayores pesos. Que el 67% del total de individuos con diagnóstico positivo de SRS fueran hembras. Que los IGS de las hembras sean mayores que los IGS de los machos, y que sólo en éstas, la pendiente de la relación IGS v/s peso sea negativa y significativamente distinta de cero sugieren que, en las primeras etapas del ciclo, las hembras serían más susceptibles a adquirir SRS debido a que en estas etapas, además del potencial estrés fisiológico, y en proporción a las etapas finales, podría haber una alta cantidad de energía destinada al crecimiento y desarrollo gonadal y una baja cantidad de energía destinada a mantener las defensas del sistema inmunológico. De hecho, el mayor porcentaje de hembras murió en las primeras etapas del ciclo.

Palabras clave: *Oncorhynchus kisutch*, SRS, *Piscirickettsia salmonis*, IGS, IHS

Summary

Posible susceptibility to piscirickettsiosis of *Oncorhynchus kisutch* during growth phase due to physiological stress caused by feeding to satiety

From December 2000 to September 2001, in a coho salmon cages site located at the Reloncaví estuary, 832 live samples of *Oncorhynchus kisutch* and 142 coho salmon coming from mortality samples, were obtained for examination of body weight and condition factor. All the samples were subsequently sent to the laboratories of Aquatic Health in order to perform the following analysis: microbiological, gonadosomatic index (GSI), hepatosomatic index (HSI) and sex determination. The samples only gave positive diagnoses to SRS. The fact that until June of 2001 (first phases of the cycle) the mortality salmon were fatter (greater factor of condition) than those coming from live sampling. The fact that in the salmon infected with SRS the HSI were greater than in not infected, strongly suggests the possible influence of a physiological stress caused by the feeding to satiety that did them more susceptible to acquire SRS. As a matter of fact if at this same phase of the cycle only the salmon coming from mortality are considered, only the infected ones exhibited greater weights. That 67% of the total of individuals with positive diagnoses to SRS were females. That the GSI of females are greater than the GSI of the males. That only in females, the slope of relation GSI v/s weight is negative and significantly different from zero; suggest that females in the first phase of the cycle of cultivation could be more susceptible to acquire SRS. Because in these

stages, in addition to potential physiological stress, and in proportion to the final stages, it could have a high amount of energy destined to growth and gonadal development, and conversely a low amount of energy destined to maintain the defenses of the immunological system. In fact, the greater percentage of female died during the first stages of the salt water cycle.

Key words: *Oncorhynchus kisutch*, SRS, *Piscirickettsia salmonis*, GSI, HSI

Introducción

Los animales de cultivo son obligados a ingerir grandes cantidades de alimento con el objetivo principal de generar en ellos rápidos crecimientos, mejores tasas de conversión, y menores tiempos de ciclo de cultivo. Como consecuencia, este procedimiento ha sido considerado como un verdadero "sistema estresante" que actúa sobre los animales generando respuestas de estrés en los que se producen una serie de cambios neuroendocrinos y metabólicos (Elrom, 2000). Además, estas prácticas de manejo intensivo pueden eventualmente agravar esta situación provocando enfermedad clínica (Urrutia, 1997).

En general, los regimenes de alimentación de las especies cultivables están más relacionados con la disponibilidad de horario de los técnicos y trabajadores que con las necesidades conductuales de forrajeo de las especies (Cuzon y cols, 1982). Por otro lado, los peces bajo condiciones de cultivo, las cuales son infrecuentemente óptimas, son sometidos a condiciones estresantes tales como: calidad de agua adversa, hipoxia, fluctuaciones de salinidad, manejo y altas densidades. Si estas condiciones de estrés son mantenidas por periodos crónicos pueden causar mortalidad masiva, predisponer a los peces a adquirir enfermedades infecciosas (Walters y Plumb, 1980; Robertson y cols, 1987) y/o hacerlos más susceptibles a adquirir parásitos (Carvajal y cols, 1991). En los centros de cultivo, los salmones son alimentados a saciedad. Si se considera a esta forma de alimentación como otro factor estresante que además es crónico, ya que esta forma de alimentación no es la natural de los salmones, se hace necesario indagar la posible relación entre esta forma de alimentación, con la susceptibilidad de los salmones de cultivo a adquirir enfermedades infecciosas.

Los estudios que relacionan factores nutricionales con la salud de los salmones, están preferentemente enfocados al rol que juegan los componentes químicos de la dieta como inmunoestimulantes (Wahli y cols, 1997; Montero y cols, 1999; Ortuño y cols, 1999). Aunque la interacción entre infección, nutrición e inmunidad ha sido considerada como pobremente estudiada por Kaushik y Luquet (1993), un estudio realizado por Sitjà-Bobadilla y cols (2002) en *Sparus aurata*, mostró que los peces alimentados a saciedad presentaron una mayor mortalidad y susceptibilidad a las parasitosis, y un mayor daño hepático e intestinal, que los peces alimentados con un régimen fijo.

Todos los peces utilizan la energía total producida del metabolismo de los nutrientes en crecimiento, reproducción y sistema inmunológico. Además, en términos de la historia de vida de los salmones, se sabe que esta distribución energética se ve afectada por factores tales como la agresividad y la dominancia dentro del grupo social, los que tienen un efecto sobre el crecimiento (Wikelski y Ricklefs, 2001). Debido a que el salmón coho *Oncorhynchus kisutch* es cultivado a altas densidades, presenta una conducta alimenticia voraz generadora de un grupo dominante dentro de la balsa jaula, lo que se refleja en un mayor crecimiento de este grupo. Además, se podría esperar que no sólo el crecimiento se vea afectado por la variabilidad de la distribución energética, sino que también sea afectada la salud de los salmones, por

ejemplo podría haber una menor cuota de energía destinada a mantener las defensas del sistema inmunológico.

La piscirickettsiosis es una de las enfermedades causantes de grandes pérdidas económicas a la empresa salmonera. Esta enfermedad se ha presentado principalmente en agua de mar y estuarina. Los intentos para evitar los brotes de esta enfermedad han sido infructuosos, sin embargo, una de las estrategias de algunos centros de cultivo para reducir pérdidas, ha sido la disminución de la densidad de cultivo por jaula (Larenas y cols, 1997).

El objetivo de este trabajo es indagar la posible relación entre la alimentación a saciedad que podría estar generando un estrés de tipo fisiológico, y la susceptibilidad del salmón coho *O. kisutch* a adquirir piscirickettsiosis, potenciada por este posible estrés.

Material y métodos

Los salmones fueron ingresados a fines de Diciembre de 2000 al centro de cultivo ubicado en el estuario Reloncaví, Puerto Montt (Chile) (41°40' S; 72°21' W).

Para evaluar el crecimiento y factor de condición ($K = \text{Peso} / \text{Longitud}^3$) de los salmones en el centro, se realizaron mensualmente "lances" de los cuales se tomaban aproximadamente 120 peces al azar los que fueron anestesiados con benzocaina en un tanque de 500 l. El peso y la longitud fueron calculados utilizando un peso Pools modelo S 120-3 y un ictiómetro, respectivamente. El número de individuos muertos antes y después de los muestreos fue similar, lo que indica que no hubo mortalidad por manejo.

Entre el 26 de febrero y 16 de septiembre de 2001 se enviaron muestras de mortalidad de los salmones obtenidas al azar, a los laboratorios de Aquatic Health, en los cuales se obtuvo el diagnóstico microbiológico, el peso, factor de condición, índice hepatosomático (IHS) e índice gonadosomático (IGS).

Con el objetivo de observar posibles diferencias de crecimiento entre salmones de mortalidad y muestreo, se realizó análisis de covarianza (ANCOVA) en el cual la variable dependiente fue el factor de condición y la covariable el peso (Zar, 1984). Para observar posibles variaciones del factor de condición en las distintas etapas del ciclo, se realizaron dos aproximaciones para el análisis de covarianza, una contempló a los salmones muestreados hasta junio del 2001 y la otra incluyó a los salmones muestreados hasta septiembre del 2001. También se graficó el peso de los salmones que presentaban diagnósticos positivos y negativos del patógeno *Piscirickettsia salmonis*, en función de la fecha en que se realizó el análisis. Los diagnósticos microbiológicos sólo arrojaron resultados positivos para *P. salmonis*. El análisis utilizado en la detección de este patógeno fue el método de inmunofluorescencia propuesto por Lannan y Fryer (1991).

Una pendiente distinta de cero de la relación entre el índice gonadosomático y el peso de los salmones que fueron enviados al laboratorio, sería reflejo de diferencias en la cantidad de gónada producida por gramo de salmón durante el ciclo de cultivo. Por lo que esta relación, tanto para machos como para hembras, fue evaluada mediante un análisis de correlación de Spearman (Zar, 1984).

Finalmente, para observar mortalidad diferencial entre sexos durante el periodo de cultivo del salmón coho se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras (Zar, 1984).

Resultados

Durante el ciclo de engorda del salmón coho cultivado en el estuario de Reloncaví, se muestrearon un total de 832 salmones, y se realizó el diagnóstico microbiológico, peso, factor de condición e IHS a 142 salmones provenientes de la mortalidad.

La prevalencia de la enfermedad fue mayor en hembras que en machos (67% y 33%, respectivamente). Sólo se obtuvo el índice gonadosomático de 58 salmones cuyos pesos fluctuaron entre 500 a 1 800 g, de los cuales el 64% fueron hembras y el 36% machos.

En las etapas iniciales del ciclo los resultados indican que, en general, a un mismo peso los salmones de mortalidad presentaron un mayor factor de condición que los de muestreo (Figura 1a; Tabla 1; Tabla 2). Sin embargo, en las etapas finales del ciclo el factor de condición de los salmones de muestreo fue mayor (figura 1b; tabla 1).

Figura 1. Relación entre el factor de condición y el peso de los salmones de mortalidad (símbolos llenos) y de muestreo (símbolos vacíos) para salmones coho muestreados hasta junio de 2001 (A), salmones muestreados hasta septiembre de 2001 (B), en el estuario Reloncaví.

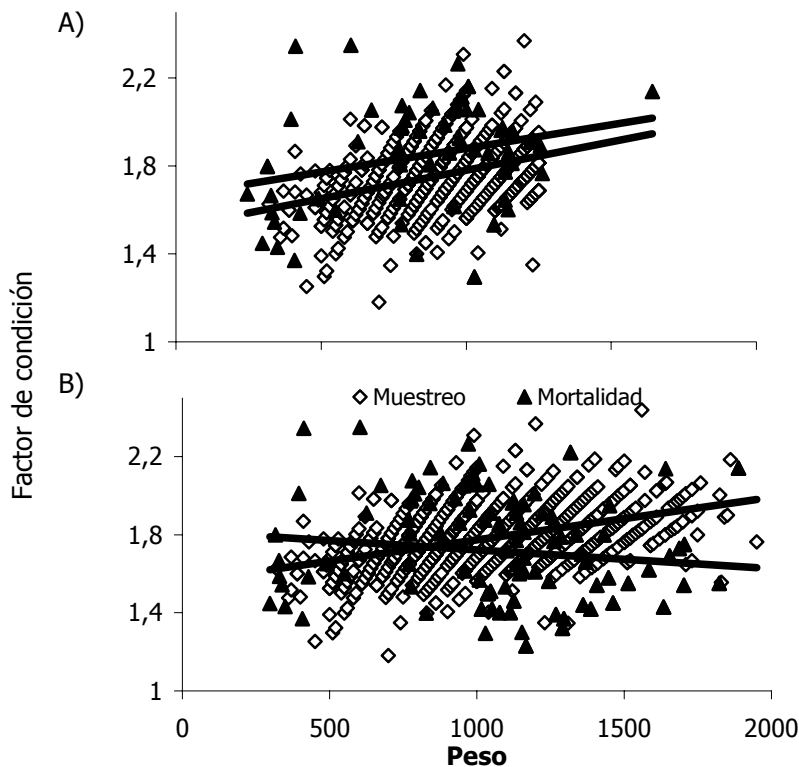


Tabla 1. Resultados del análisis de covarianza del factor de condición entre salmones de muestreo y mortalidad, considerando los salmones hasta junio de 2001 y hasta septiembre de 2001. Se indican los valores de F y de probabilidad (p) de las pruebas de comparación de pendientes y de medias ajustadas.

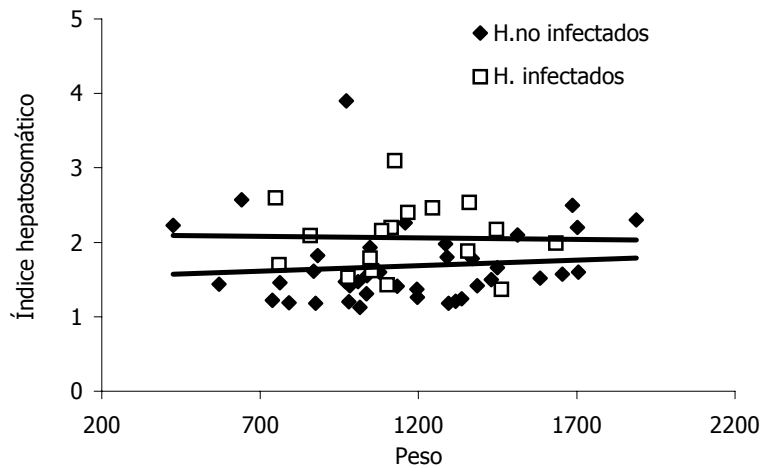
	Fecha	$F_{(1,670)}$	p
Comparación de pendientes	jun. 01	0,35	0,56
	sept. 01	52,85	> 0,001
Comparación de medidas ajustadas	jun. 01	26,13	> 0,001
	sept. 01	-	-

Tabla 2. Comparación de los promedios \pm desviación estándar (D.S.) de los Índices Gonadosomáticos (IGS) entre hembras y machos, Factor de condición entre salmones de mortalidad y muestreo, y del Índice Hepatosomático (IHS) entre salmones infectados y no infectados.

IGS	Hembras	0,38 \pm 0,15
	Machos	0,03 \pm 0,01
Factor de condición	Mortalidad	1,9 \pm 0,25
	Muestreo	1,7 \pm 0,15
IHS	Infectado	2,06 \pm 0,47
	No infectado	1,68 \pm 0,53

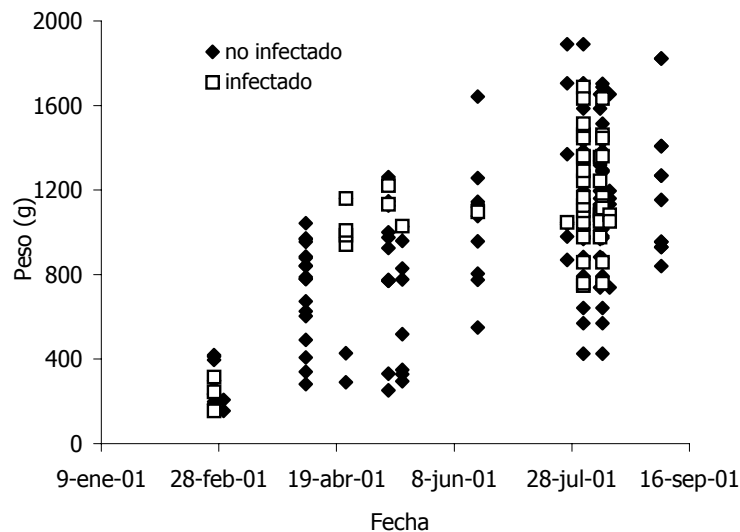
Durante todo el ciclo los índices hepatosomáticos de los salmones de mortalidad fueron mayores en los salmones infectados que en los no infectados ($U = 168$; $p = 0,004$) (Figura 2; Tabla 2).

Figura 2. Índice hepatosomático de salmones infectados y no infectados con SRS según su peso.



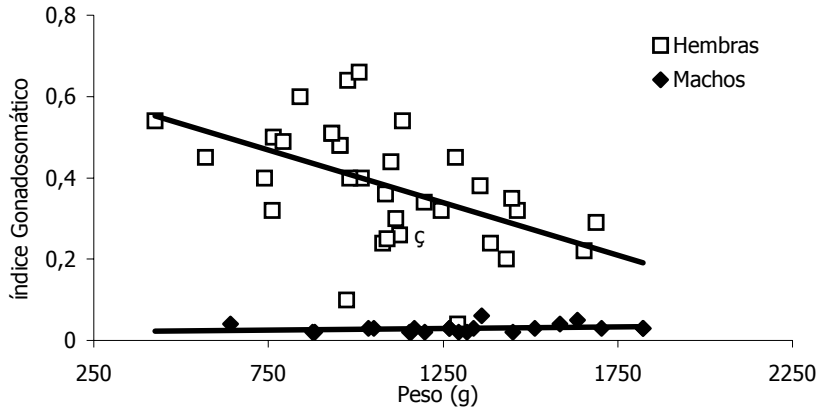
Los salmones infectados sólo mostraron mayores pesos que los no infectados en las etapas iniciales del ciclo (entre 800 y 1 200 g) (figura 3).

Figura 3. Peso de los salmones infectados (símbolos vacíos) y no infectados (símbolos llenos) por SRS según la fecha de mortalidad de salmones coho, en el estuario Reloncaví.



Las hembras presentaron mayores índices gonadosomáticos que los machos durante todo el ciclo de cultivo (Figura 4; Tabla 2). Por otro lado, al relacionar el índice gonadosomático con el peso del salmón, sólo las hembras mostraron una pendiente significativamente distinta de cero ($t(N-2) = -4,05$; $R = -0,58$; $p = 0,0003$), por lo que la mayor cantidad de gónada por gramo (IGS) de las hembras, fue producida en las primeras etapas del ciclo cuando pesaban entre 750 y 1 250 g (figura 4).

Figura 4. Relación entre el índice gonadosomático y el peso de los salmones coho de mortalidad provenientes de un centro de engorda en el estuario Reloncaví.



En general, durante el ciclo de cultivo, comenzaron a morir primero las hembras. Así, el 68% de éstas murió cuando pesaban entre 600 y 1 200 g. Por su parte, el 61% de los machos murió cuando pesaba entre 1 200 y 1 800 g, ($D_{máx.} = 0,35$; 6 intervalos; $\chi^2 = 6,5$; g.l. 2; $p = 0,038$) (figura 5; tabla 3).

Figura 5. Porcentaje de mortalidad de machos y hembras del salmón coho según su peso corporal (g), en el estuario Reloncaví.

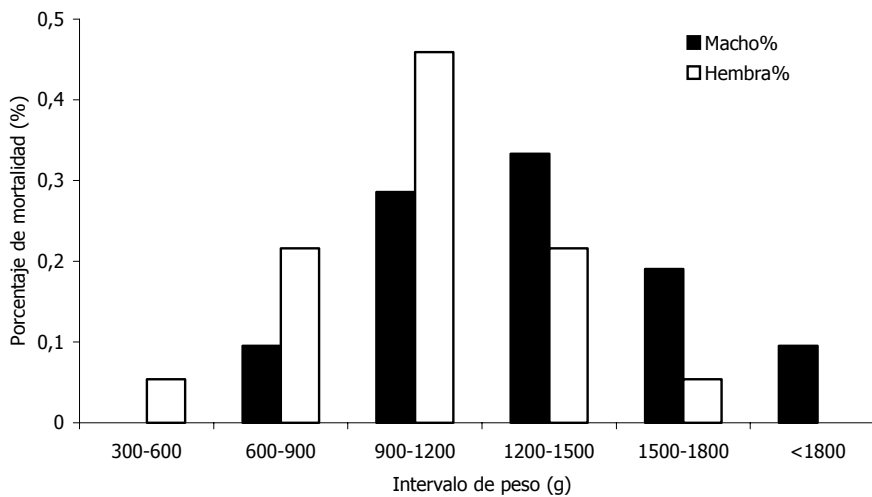


Tabla 3. Porcentaje de mortalidad de hembras y machos según el intervalo de peso durante el ciclo de cultivo.

Intervalo de peso (g)	Mortalidad (%)	
	Hembras	Machos
300 - 600	5	0
600 - 900	22	10
900 - 1 200	46	29
1 200 - 1 500	22	33
1 500 - 1 800	5	19
> 1 800	0	10

Discusión

La agresividad y dominancia jerárquica derivada de la necesidad de obtener posiciones de alimentación superiores dentro de la población total de salmones cultivados ha sido descrita en *O. kisutch*, *O. mykiss* y en *Salmo trutta*. En éstos, se ha observado que los salmones pertenecientes al grupo dominante alcanzan mayores pesos que los salmones que adoptan la conducta pasiva debido a que estos últimos ocupan posiciones de alimentación inferiores (Reinhardt, 1999; Barry y cols, 2000; Sloman y cols, 2002). En estos estudios no se ha evaluado el posible efecto de estas conductas sobre la variabilidad de la distribución energética dentro de la población de salmones según lo propuesto por Wikelski y Ricklefs (2001), que eventualmente podría tener un efecto sobre la salud de los salmones.

El reconocimiento de dominancia, agresividad y variabilidad de la distribución energética en la población de salmones sugiere una relación con el hecho de que hasta junio de 2001 los salmones de mortalidad tuvieron mayor factor de condición que los de muestreo, es decir, los salmones de mortalidad pudieron pertenecer al grupo dominante. Esta conducta, sumado a la alta demanda energética que genera el hecho de transformar, en condiciones de cultivo intensivo, la alta cantidad de alimento ingerido en un rápido crecimiento, pudo provocar en los salmones un estrés de tipo fisiológico y una mayor susceptibilidad a adquirir SRS. Si consideramos que el hígado cumple un rol trascendente en los procesos digestivos, es esperable que este órgano sea uno de los más afectados por un posible estrés fisiológico producido por la alimentación a saciedad. En este contexto, es tentativo pensar en la existencia de una relación entre el haber encontrado mayores IHS en los salmones de mortalidad infectados y el hecho de que el estrés fisiológico pudo hacer a los salmones más susceptibles a adquirir SRS, ya que desde el punto de vista histopatológico el hígado es uno de los órganos más afectados por la piscirickettsiosis (Larenas y cols, 1995).

A lo largo del ciclo de cultivo del salmón coho se observó una curva de crecimiento de tipo sigmoidea típica de los peces (datos no publicados). Los mayores crecimientos se observaron en los primeros meses del ciclo, y los menores hacia el final del ciclo (aproximadamente de 120% y 20%, respectivamente). Esto, sumado al hecho de que sólo hasta junio del 2001 los salmones de mortalidad tuvieron mayor factor de condición, sugiere que el estrés fisiológico pudo ser más agudo en los primeros meses del ciclo ya que la inversión energética en crecimiento debió ser mayor. Por otro lado, el hecho de que sólo en las primeras etapas del ciclo los salmones infectados presentaran mayores pesos que los no infectados, potencia aun más la relación entre el estrés fisiológico y la susceptibilidad a adquirir piscirickettsiosis.

Por motivos operacionales y política de presupuesto del centro de cultivo, no se pudo enviar más de 142 muestras al laboratorio para el análisis microbiológico, por lo que sólo se detectaron 46 individuos infectados con SRS. Sin embargo, que el 67% del total de salmones infectados con piscirickettsiosis fueran hembras, que los índices gonadosomáticos de las hembras sean mayores que los índices de los machos, y que sólo en éstas, la relación IGS vs peso sea negativa y significativamente distinta de cero sugieren que, en los primeros meses del ciclo y en proporción al resto del ciclo, pudo haber una menor cantidad de energía destinada al sistema inmunológico, y una mayor cantidad de energía destinada al crecimiento y desarrollo gonadal que hizo a las hembras, en las primeras etapas del ciclo, más susceptibles a adquirir la enfermedad. De hecho, hubo una mayor proporción de hembras que murió en las primeras etapas a diferencia de los machos, cuyas mayores mortalidades se registraron hacia el final del ciclo.

Entre las vías de infección de *P. salmonis* se ha sugerido el contacto directo vía branquial, ya que los patógenos son eliminados por la heces orina y bilis, por lo que el contagio estaría directamente relacionado con la densidad poblacional (Larenas y cols, 1997). Además, otros estudios de formas de transmisión de *P. salmonis* realizados por Correal (1995) y Venegas (1996) sugieren a especies reservorias autóctonas tales como peces, crustáceos, moluscos, poliquetos, y ectoparásitos (*Ceratohoa gaudichaudii* y *Caligus* sp.) como interactuantes en la dinámica de infección de la piscirickettsiosis, sin embargo el rol que puedan cumplir estas especies no ha sido dilucidado.

Debido a que nuestros resultados sugieren que las hembras, en los primeros meses del ciclo de cultivo, serían más susceptibles a adquirir piscirickettsiosis, proponemos al estrés fisiológico, a la variable ontogenética, y a la proporción sexual como factores que también pueden estar jugando un rol en la dinámica de infección de *P. salmonis*, sin descartar la importancia de los factores anteriormente mencionados. Así las hembras, en términos epidemiológicos, constituirían un grupo de alto riesgo cuya importancia podría ser variable a medida que se desarrolla el ciclo de cultivo del salmón coho. Además, la proporción sexual podría ser un atractivo parámetro en un eventual modelo epidemiológico predictivo de la infección de *P. salmonis* sobre el salmón coho.

El encontrar más evidencias de este posible estrés fisiológico en otros ciclos de cultivo, sumado a estudios bioquímicos tales como el análisis de los niveles de cortisol (Johnson y Albright, 1992), permitirán generar estrategias de cultivos tales como trabajar al 80% de la saciedad alimenticia, o regular las tasas de alimentación pensando no sólo en mejorar el factor de conversión, sino que también en minimizar el estrés fisiológico en el grupo dominante, lo que finalmente generaría una disminución de los costos de producción.

Bibliografía

1. Barry, A., E. Berejikian, P. Tezak, T.A. Flagg, A.L. Larae, E. Kummerow, C.V.W. Mahnken (2000). Social dominance, growth, and habitat use of age-0 steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) grown in enriched and conventional hatchery rearing environments. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 57:628-636
2. Carvajal, J., J.C. Uribe, M.V. Vial (1991). Patología parasitaria en el salmón coho de cultivo. Parásitos estresan salmónidos en el mar. *Creces*, 6/7:20-22
3. Correal, P. (1995). *Prospección de Piscirickettsia salmonis en fauna marina silvestre asociada al cultivo intensivo de salmónidos*. Tesis M.V., Univ. de Chile, Facultad de ciencias Veterinarias y Pecuarias, Santiago, Chile
4. Cuzon, G., M. Hew, D. Cognie, P. Soletchnik (1982). Time lag effect of feeding on growth of juvenile shrimp *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*, 29:33-44
5. Cvitanič, J., D.O. Garate, P.E. Smith (1991). The isolation of a rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulates. *J. Fish Dis.*, 14:121-145
6. Elrom, K. (2000). Handling and transportation of broilers: welfare, stress, fear and meat quality. *Isr. J. Vet. Med.*, 55:1-11
7. Johnson, S.C., L.J. Albright (1992). Effects of Cortisol Implants on the susceptibility and the histopathology of the responses of naive coho salmon *Oncorhynchus kisutch* to experimental infection with *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). *Dis. Aquat. Org.*, 14:195-205
8. Kaushik, S.J., P. Luquet (1993). Fish nutrition in practice. Ed. INRA. Paris (Les Colloques, no. 61)
9. Lannan, C., J. Fryer (1991). Recommended method for inspection of fish for the salmonid rickettsia. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 11:135-136
10. Larenas, J., J. Contreras, S. Oyadene, M.A. Morales, P. Smith (1997). Efecto de la densidad poblacional y temperatura en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) inoculadas con *Piscirickettsia salmonis*. *Arch. Med. Vet.*, 29:113-119

11. Larenas, J., L. Hidalgo, H. Garces, J.L. Fryer, P. Smith (1995). Piscirickettsiosis: Lesiones en el salmón atlántico (*Salmo salar*) infectados naturalmente con *Piscirickettsia salmonis*. *Av. Cs. Vet.*, 10:53-58
12. Montero, D., M. Marrero, M.S. Izquierdo, J.M. Vergara, L. Tort (1999). Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture*, 171:269-278
13. Ortuño, J., M.A. Esteban, J. Mesenger (1999). Effect of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 9:429-443
14. Robertson, L., P. Thomas, C.R. Arnold, J.M. Trant (1987). Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and a disease outbreak. *Prog. Fish-Cult.*, 49:1-12
15. Sitja-Bobadilla, A.M., M.J. Mingarro, E.Pujalte, P. Garay, P. Alvarez-Pellitero, J. Perez-Sanchez (2003). Immunological and pathological status of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) under different long-term feeding regimes. *Aquaculture*, 220:707-724
16. Sloman, K.A., L. Wilson, J.A. Freel, A.C. Taylor, N.B. Metcalfe, K.M. Gilmour (2002). The effects of increased flow rates on linear dominance hierarchies and physiological function in brown trout, *Salmo trutta*. *Can. J. Zool.*, 80:1221-1227
17. Reinhardt, U.G. (1999). Predation risk breaks size-dependent dominance in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and provides growth opportunities for risk-prone individuals. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 56:1206-1212
18. Urrutia, S. (1997). El broiler del año 2001. *Rev. Av. Prof.*, 15:23-28
19. Venegas, C. (1996). *Piscirickettsia salmonis*. *Prospección en fauna marina asociada a cultivos de salmónidos infectados. Periodo invierno-primavera*. Tesis M. V., Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Santiago, Chile
20. Wahli, T., V. Verlhac, J. Gabaudan, W. Schuep, W. Meiler (1997). Influence of combined vitamins C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 21:127-137
21. Walters, G.R., J.A. Plump (1980). Environmental stress and bacterial infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish Biol.*, 17:177-185
22. Wikelski, M., R.E. Ricklefs (2001). The physiology of life histories. *Trends Ecol. Evol.*, 16:479-481
23. Zar, J.H. (1984). *Biostatistical Analysis*. 2nd Ed. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey