
INFORME FINAL

“LABORATORIO DE REFERENCIA DE CALIGUS: CARACTERIZACIÓN DE CEPAS OBTENIDAS DESDE LA REGIÓN DE MAGALLANES Y COMPARACIÓN CON EJEMPLARES DE REFERENCIA”

**Proyecto Fondo de Inversión Estratégica FIE 2015-V014, Programa para la Gestión Sanitaria
en Acuicultura**

Laboratorio de Referencia Caligus

Centro Interdisciplinario de Investigación en Acuicultura (INCAR)

Universidad de Concepción



Diciembre, 2018

Resumen Ejecutivo

El Laboratorio de Genómica y Biotecnología Acuícola (LBGA) de la Universidad de Concepción fue designado por el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) como Laboratorio de Referencia nacional para Caligidosis (LRC). Entre sus funciones encuentran caracterizar y mantener cepas de *Caligus rogercresseyi*. Además de estandarizar y validar técnicas de laboratorio para su mantenimiento. En la actualidad, el LRC cuenta con cuatro cepas de caligus obtenidas desde distintas zonas de la Región de Los Lagos, tres cepas colectadas desde la región de Aysén y una cepa proveniente desde Magallanes. El objetivo de este informe final es describir los resultados obtenidos bajo el marco del proyecto **“Caracterización de cepas obtenidas desde la región de Magallanes y comparación con ejemplares de referencia”**. Se realizó la evaluación del tiempo de duración del ciclo de vida de *C. rogercresseyi* mediante ensayos *in vivo* infectando peces con cepas de Los Lagos, Aysén y Magallanes. Los peces se mantuvieron a distintas condiciones de temperatura, simulando la temperatura de cada población. Se observaron diferencias en la duración del ciclo de vida de *C. rogercresseyi* entre las cepas de Los Lagos, Aysén y Magallanes, presentando ciclos de 25, 27 y 31 días, respectivamente. Por otra parte, se evaluó la sensibilidad farmacológica de algunas poblaciones de Caligus, destacando la cepa obtenida en Magallanes, la que presenta alta sensibilidad a azametifós. Adicionalmente, se evaluó la posibilidad de mantener las cepas de *C. rogercresseyi* utilizando métodos de criopreservación. Sin embargo, esta metodología de conservación de Caligus no muestra ser eficiente ya que luego de exponer a los Caligus a los criopreservantes y mantenerlos criopreservados por un tiempo, no fue posible obtener Caligus vivos o huevos viables. Finalmente, se realizó un estudio epidemiológico que demuestra que en los últimos años el fármaco con mayor eficacia para el tratamiento del Caligus es azametifós. Pese a esto, mediante un mapa de riesgo fue posible detectar regiones de cultivo donde se describen los resultados obtenidos en torno a la caracterización de una nueva cepa de *C. rogercresseyi* identificada en Magallanes, efectos de las condiciones ambientales sobre el ciclo de vida de *C. rogercresseyi*, evaluación de sensibilidad farmacológica de las cepas. Además, de la exploración de un método de criopreservación de adultos y sacos ovígeros de Caligus para la mantención de las cepas. También se realizaron estudios epidemiológicos para la efectividad de los tratamientos antiparasitarios utilizados entre 2015 al 2017. Los modelos desarrollados indican que si bien azametifós es el fármaco más utilizado y con mayor eficacia en la actualidad, existen algunos centros que en sus últimos meses evaluados han demostrado reducción en la efectividad del tratamiento con azametifós. Se entregan algunas recomendaciones entre ellas, se plantea la incorporación de marcadores moleculares complementaria a los bioensayos, los que mejorarían la evaluación de la eficacia de los tratamientos en los distintos centros de cultivo. Otra recomendación es mantener las cepas de Caligus vivas, lo que implica mantener peces infectados con cada cepa, ya que hasta el momento no se ha logrado la criopreservación de los Caligus. Por último, de acuerdo a los estudios epidemiológicos es necesario evaluar los factores que influyen en la pérdida de eficacia del tratamiento con azametifós.

Abstract

The Laboratory of Genomics and Aquaculture Biotechnology (LBGA) of the Universidad de Concepción was designated by the National Fisheries and Aquaculture Service (SERNAPESCA) as the National Reference Laboratory for Caligidosis (LRC). Among its functions are (i) to characterize and maintain strains of *Caligus rogercresseyi* and (ii) to standardize and validate laboratory techniques for maintenance and bioassays. At present, the LRC has four strains of lice obtained from different areas of the Los Lagos Region, three strains collected from the Aysén region and one strain from Magallanes. The objective of this final report is to describe the results obtained under the framework of the project "Characterization of strains obtained from the Magallanes region and comparison with reference specimens". The evaluation of the lifespan of *C. rogercresseyi* was carried out through in vivo tests, infecting fish with strains from Los Lagos, Aysén and Magallanes. The fish were kept at different temperature conditions, simulating the temperature of each population. Differences were observed in the life cycle length of *C. rogercresseyi* between the strains of Los Lagos, Aysén and Magallanes, presenting cycles of 25, 27 and 31 days, respectively. On the other hand, the pharmacological sensitivity of some populations of Caligus was evaluated. Notably, the strain collected from Magallanes evidenced high sensitivity to azamethiphos. Additionally, cryopreservation technique was also explored to maintain the collection of *C. rogercresseyi* strains. However, this preservation method did not evidence to be efficient after testing of several cryopreservants and protocols. Finally, an epidemiological study was conducted, showing that in the last years the most effective drug for the treatment of Caligus was azamethiphos. Despite this, through a risk map, it was possible to detect crop regions where the results obtained are described around the characterization of a new strain of *C. rogercresseyi* identified in Magallanes. The effects of environmental conditions on the life cycle of *C. rogercresseyi* and evaluation of pharmacological sensitivity was also reported. Epidemiological studies were also carried out for the effectiveness of the delousing treatments used between 2015 and 2017. The developed models indicate that although azamethiphos is the most widely used and most effective drug currently. However, the last months evaluated was observed a reduction in azamethiphos effective in some salmon centers. Some recommendations are given among them, the incorporation of molecular markers complementary to the bioassays is proposed, which would improve the evaluation of the effectiveness of the treatments in the different fish farms. Another recommendation is to keep the live Caligus strains, which means keeping infected fish with each strain since up to now the cryopreservation of the Caligus has not been achieved. Finally, according to the epidemiological studies, it is necessary to evaluate the factors that influence the loss of effectiveness of the treatment with azamethiphos.

Antecedentes

El Laboratorio de Genómica y Biotecnología Acuícola (LBGA) de la Universidad de Concepción fue designado por el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) como Laboratorio de Referencia nacional para Caligidosis (LRC). Entre las funciones que debe llevar a cabo esta entidad se encuentran caracterizar y mantener cepas de *Caligus rogercresseyi*, estandarizar y validar técnicas de laboratorio, así como asesorar a SERNAPESCA en aspectos técnicos en el ámbito de la caligidosis.

Una de las principales actividades que se le ha encomendado al LRC es la conformación de un cepario y un banco genético para la mantención de ejemplares de *C. rogercresseyi* con diferentes sensibilidades a las distintas drogas antiparasitarias presentes en el mercado. Esta actividad es de gran importancia estratégica ya que permitirá el estudio de determinantes genéticos de la resistencia del parásito a las drogas, independiente de la evolución que tenga este fenómeno en terreno. Junto con las cepas resistentes, es fundamental mantener poblaciones parasitarias sensibles originadas desde áreas con historial de no tratamientos.

Entre las primeras tareas conducentes a la conformación del cepario llevadas a cabo en 2017, el LRC diseñó y montó en la Estación de Biología Marina de la Universidad de Concepción en Dichato, región del Biobío, un sistema hidráulico (bombas, tanques, cañerías, desagües), sistema eléctrico, que incluye el circuito principal, backup o grupo de respaldo eléctrico (en caso de pérdida de energía), control oxígeno, control de temperatura ambiental e iluminación, e instalaciones del laboratorio anexo donde se realizarán análisis básicos, para la mantención de un cepario de *Caligus rogercresseyi*. En paralelo, el LRC adquirió equipos ultrafreezers para la mantención de un banco genético y termocicladores en tiempo real para la implementación de técnicas moleculares de identificación y análisis poblacional.

Estando las instalaciones del cepario y banco genético listas, el plan de investigación para el periodo 2018 contempla la implementación de los protocolos de mantención de las cepas, de dichas instalaciones con diferentes cepas de *C. rogercresseyi* en función de su susceptibilidad a diferentes drogas antiparasitarias, lo cual debe ser caracterizado. Adicionalmente, a fin de optimizar la mantención del cepario de *Caligus* se explorará la utilización de criopreservación de ejemplares adultos, hembras ovígeras y sacos ovígeros con la finalidad mantener stocks viables de ejemplares. Estas actividades deben ser financiadas para asegurar el cumplimiento de los objetivos trazados para el cepario y para el banco genético.

Los presentes términos de referencia (TTR) buscan principalmente incorporar al cepario del LRC ejemplares de *C. rogercresseyi* provenientes de la región de Magallanes y su comparación con ejemplares presentes actualmente en el LRC. Dichas cepas han sido recolectadas desde distintas localidades de las Regiones de Los Lagos y de Aysén, cuyo historial de eficacias farmacológicas es conocido y ha sido reportado a través de las bases de datos de SERNAPESCA e INTESAL. En términos comparativos, el presente TTR buscará caracterizar y asociar las principales mutaciones tipo SNPs en ejemplares con alta o baja sensibilidad a piretroides y organofosforados. Finalmente, con el objetivo de optimizar la mantención de cepas de caligus, se explorará la utilización de la técnica de criopreservación para ejemplares adultos, hembras ovígeras y sacos ovígeras. De esta forma, se espera que la implementación de la técnica permita mantener ejemplares viables a -196°C con la finalidad de generar y propagar ejemplares obtenidos durante el desarrollo del proyecto. Es importante destacar que las cepas y el material biológico recolectado será de propiedad pública y administrado por SERNAPESCA para los fines que estime la autoridad.

El presente informe, reporta las actividades de investigación contempladas en el anexo 1 del Contrato de Prestación de Asesoría Estratégica “**Caracterización de cepas obtenidas desde la región de Magallanes y comparación con ejemplares de referencia**” encargado por el SERNAPESCA a la Universidad de Concepción.

Objetivos

Objetivos general

Asesorar técnicamente a Sernapesca en la realización de estudios para la incorporación, al Cepario Oficial de Caligus, de ejemplares provenientes de la Región de Magallanes, y realizar estudios comparativos a nivel genotípico y de sensibilidad farmacológica, con ejemplares ya existentes en el Cepario, junto con la realización de estudios que permitan optimizar la mantención de cepas de Caligus mediante la implementación de la técnica de criopreservación.

Objetivos específicos

1. Incorporar al cepario de referencia de Caligus, ejemplares vivos o cepas de *C. rogercresseyi*, provenientes de la región de Magallanes.
2. Caracterizar a nivel genético, morfológico y de sensibilidad farmacológica cepas recolectadas en la Región de Magallanes y su comparación con cepas del LRC.
3. Explorar la factibilidad de implementar la técnica de criopreservación para la mantención de ejemplares vivos de Caligus.
4. Financiar gastos operacionales del cepario y banco genético para el periodo 2018.

Carta Gantt

	Diciembre '17	Enero-Febrero '18	Marzo-Abril '18	Mayo-Junio '18	Julio-Agosto '18	Sep-Octubre '18	Nov-Diciembre '18
Etapas:							
Etapas 1: Estudio epidemiológico de la resistencia de fármacos antiparasitarios							
Identificación de centros/poblaciones resistentes/susceptibles para antiparasitarios							
Recolección de caligus adultos por centro Region de Los Lagos							
Recolección de caligus adultos por centro Region de Aysén							
Recolección de caligus adultos por centro Region de Magallanes							
Etapas 2: Cultivo de cepas vivas de referencia de Caligus							
Recepción y registro de ejemplares adultos de caligus							
Aplicación de protocolos de mantenimiento y bioseguridad							
Evaluación de eclosión de larvas							
Infección de peces y recolección de F1							
Etapas 3: Comparación cepas de Magallanes con cepas de referencia provenientes de las regiones de Los Lagos y Aysén							
Evaluación morfológica de ejemplares de Magallanes con cepas de referencia							
Evaluación de parámetros de ciclo vida de caligus							
Estimación de sensibilidad farmacológica							
Análisis moleculares de ejemplares expuestos a antiparasitarios							
Busqueda y evaluación de biomarcadores							
Etapas 4: Incorporación de nuevos ejemplares a banco genético							
Recepción y registro de muestras							
Extracción de ADN							
Aplicación de DNA barcoding (secuenciación de COI, 18s y 28s)							
Análisis de datos genéticos							
Etapas 5: Implementación de protocolos de criopreservación							
Revisión del estado de arte de criopreservación en insectos y crustáceos							
Revisión de protocolos de criopreservación y diseño experimental							
Evaluación de crioprotectores (citotoxicidad) en ejemplares adultos, hembras ovigeras y sacos ovigeros.							
Evaluación de protocolos de criopreservación (tasa de congelación, tiempo de equilibrio y tasa de descongelación)							
Evaluación de integridad genómica mediante ensayo cometa de célula							
Evaluación de integridad genómica mediante marcadores moleculares							

Resultados esperados (entregables)

Informe	Resultado/Hito	Descripción	Fecha entrega
Informe de avance N°1	Análisis preliminar de datos de cargas parasitarias, tratamientos y fármacos utilizados en la industria en los distintos barrios de las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes. Análisis estadístico de bases de datos de SERNAPESCA.	Se determinó que la droga más utilizada para el tratamiento de Caligus entre los años 2015-2017 fue azametifos. Adicionalmente se determinó que en ese periodo de tiempo el porcentaje de eficacia de los tratamientos fue en promedio de 90%.	29 diciembre 2017
	Análisis de comparación morfológica y genética de caligus recolectados desde la región de Magallanes y ejemplares del laboratorio de referencia: Análisis de anatómico mediante microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido, análisis genético mediante secuenciación del gen mitocondrial COI y de los genes nucleares 182 y 28s.	Se ha determinado mediante análisis de morfología y marcadores genéticos que la cepa recolectada en Magallanes corresponde a la especie de <i>C. rogercresseyi</i> .	
	Revisión del estado del arte de criopreservación en insectos y crustáceos y revisión de protocolos de criopreservación y diseño experimental. Propuesta experimental para evaluación de factibilidad de aplicación de la técnica de criopreservación en Caligus rogercresseyi.	Luego de una búsqueda bibliográfica se define el diseño experimental para la evaluación de criopreservantes para la mantención de cepas de <i>C. rogercresseyi</i>	
Informe de avance N°2	Análisis final de datos de cargas parasitarias, tratamientos y fármacos utilizados en la industria en los distintos barrios de las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes.	Se determinó que los tratamientos más utilizados en la industria durante 2015-2017 fueron deltametrina y azametifos, esta última con los mayores niveles de eficacia.	30 junio 2018
	Generación de mapa epidemiológico sobre éxitos de tratamientos utilizados por la industria para el control de la Caligidosis.	El mapa de riesgo generado indica que en general los tratamientos con azametifos mantienen, hasta el 2017, una alta eficacia. Sin embargo, se detectó que algunos barrios como ACS 31b presentan reducciones en las eficacias de los tratamientos con azametifos, sugiriendo un nivel de tolerancia por los Caligus de esa zona al tratamiento.	
Informe Final	Evaluación de parámetros de ciclo de vida de cepas de caligus obtenidas desde las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes: Análisis de duración de ciclo de vida de la F1, tasa de fertilidad y fecundidad, número de huevos por saco ovígero, tasa de eclosión, tasa de fijación y viabilidad de adultos.	Los parámetros de ciclo de vida de Caligus fueron de las distintas localidades fueron evaluados de manera <i>in vivo</i> manteniendo peces en las condiciones de temperatura y salinidad registradas en cada localidad. Se registraron diferencias en la duración del ciclo de vida de cada cepa evaluada como efecto de la temperatura. Cepa Los Lagos duración 25 días. Cepa Aysén duración ciclo 27 días. Cepa Magallanes duración del ciclo 31 días. Además se registraron diferencias en las tasas de fecundación y eclosión de la progenie de cada cepa.	30 diciembre 2018
	Comparación de sensibilidad farmacológica de cepas de caligus obtenidas desde las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes: Desarrollo de bioensayos para azametifos, deltametrina, Lufenurón y Benzoato de Emamectina según protocolos estandarizados. Evaluación de	Se evaluó la sensibilidad farmacológica de cepas provenientes de Los Lagos, Aysén y Magallanes. Esta última presenta un valor de EC ₅₀ para azametifos de 0,45. Además, se propone un nuevo tipo de bioensayo	

	biomarcadores moleculares de sensibilidad farmacológica de caligus. Evaluación poblacional de marcadores SNPs	complementario al usado actualmente y el uso de biomarcadores para la evaluación de la sensibilidad farmacológica de las cepas de Caligus. No fue posible establecer valores de EC50 en los bioensayos realizados con Lufenuron y Benzoato de Emamectina ya que todos las concentraciones evaluadas generaron mortalidad del 100% en los Caligus.	
	Evaluación de crioprotectantes (citotoxicidad) en ejemplares adultos, hembras ovigeras y sacos ovígeros. Evaluación de protocolos de criopreservación (tasa de congelación, tiempo de equilibrio y tasa de descongelación).	Se evaluaron tres distintos criopreservantes (DMSO, Etanol y PEG) para la conservación de huevos y caligus adultos. Los métodos evaluados no permiten la mantención de cepas viables.	
	Evaluación de integridad genómica mediante ensayo cometa de célula única.	No se realizó ensayos cometas, debido que no fue posible recuperar Caligus vivos luego de los tratamientos de criopreservación evaluados.	
	Evaluación de integridad genómica mediante marcadores moleculares.	No fue posible realizar evaluación de integridad genómica de Caligus criopreservados, debido que no fue posible recuperar Caligus vivos luego de los tratamientos.	

Recomendaciones prácticas

1. Se plantea un nuevo método para el desarrollo de bioensayos en el cual es necesario considerar el sexo de los individuos a la hora de testear los niveles de resistencia farmacológica de una población. Además, se propone complementar los bioensayos convencionales con marcadores genéticos que permitirían dar mayor robustez a la evaluación de la sensibilidad de los distintos fármacos utilizados en la industria del salmón.
2. Para lograr mantener cepas de *Caligus* criopreservadas es necesario evaluar en el futuro nuevos métodos de preservación, además de contar con equipamiento especializado que permita evaluar distintos protocolos de criopreservación, así como suministro constante de nitrógeno líquido. Esto último es un factor de costo importante al momento de planificar una línea de trabajo del cepario oficial. Es por ello que se plantea como la mejor alternativa, mantener cepas de *Caligus* vivas, lo que implica mantener constantemente peces infectados con las distintas cepas e ir renovando la genética de cada cepa mediante campañas que recolección de hembras cada 6-12 meses. Paralelamente, se plantea la mantención de un banco genético, es decir DNA de las distintas poblaciones y bioensayos para evaluar en el tiempo mutaciones puntuales o variaciones genéticas que estén asociadas a sensibilidad farmacológica.
3. Los resultados epidemiológicos confirman que la droga más eficaz al día de hoy es azametifós y revela que el desempeño de cipermetrina es ligeramente superior a deltametrina. Sin embargo, el modelo también presenta evidencia que el desempeño de azametifós ha disminuido en el tiempo. Por lo que es necesario mejorar las estrategias de baño y control del ectoparásito. Además, de evaluar si la reducción de la resistencia de *Caligus* a azametifós es mecanismos de resistencia que ha adaptado el ectoparásito o es por la forma en que los tratamientos están siendo aplicados.
4. Dada la evidencia de la disminución generalizada de eficacias observadas de deltametrina y la presencia de ACS con baja sensibilidad a azametifós, es urgente implementar un programa de vigilancia farmacológica para *C. rogercresseyi* en Chile que permita evaluar tanto las prácticas de aplicación de tratamientos como la ocurrencia poblacional de resistencia farmacológica. Lo anterior, debe ser acompañado de cambio en el Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de Caligidosis, PSEVC-Caligidosis a cargo de la autoridad.
5. Los resultados de las eficacias de campo y los modelos epidemiológicos implementados sugieren una alta heterogeneidad entre ACS ubicadas en las distintas regiones productoras de salmón, así como entre ambientes estuarinos y marinos. De esta forma, se recomienda explorar una reorganización de las ACS a fin de clasificarlas por riesgos potencial como zonas de diseminación de *Caligus* o de reservorios poblacionales. De esta forma aquellas zonas con mayor riesgo epidemiológicos podría ser susceptibles de una mayor frecuencia de monitoreo para evaluar resistencia farmacológica. Por otra parte, aquellas ACS donde sea detectado una mayor sensibilidad, es posible modificar la frecuencia de baños y evaluar su dinámica dependiendo las fluctuaciones medioambientales.

Creación de cepario de *Caligus rogercresseyi*

Durante el año de ejecución del proyecto el Laboratorio de Referencia de *Caligus rogercresseyi* (LRC) dirigido por el Dr. Cristian Gallardo, logró coleccionar ocho cepas de Caligus. De ellas cuatro fueron obtenidas desde distintas zonas de la Región de Los Lagos (Contao, Huenquillahue (MH), Fundación Chile, Puelche), tres cepas coleccionadas desde la región de Aysén (Barrio 19A, 22A, 24) y una cepa proveniente desde Magallanes. La cepa obtenida desde Magallanes fue caracterizada por análisis de morfología y genéticos confirmando que esta cepa corresponde a *C. rogercresseyi*. Uno de los objetivos principales del cepario oficial de *C. rogercresseyi* es caracterizar a nivel genotípico y fenotípico las distintas cepas de caligus en referencia a variables ambientales que impactan en su ciclo de vida, así como en la respuesta farmacológica frente a los principales antiparasitarios utilizados en la industria actualmente. En este punto, el presente estudio describe genes candidatos y SNPs que pueden ser utilizados como marcadores de resistencia farmacológica para azametifos, deltametrina y cipermetrina. Estos biomarcadores fueron exitosamente validados para la genotipificación de las cepas mantenidas en el LRC. Además, en este informe final del proyecto “**Caracterización de cepas obtenidas desde la región de Magallanes y comparación con ejemplares de referencia**” se describen los resultados obtenidos en torno al ciclo de vida de *C. rogercresseyi*, evaluación de sensibilidad farmacológica de las cepas. Además, de la exploración de un método de criopreservación de adultos y sacos ovígeros de Caligus para la mantención de las cepas. Finalmente, en este informe se reportan resultados de estudios epidemiológicos generados en torno a la efectividad de los tratamientos antiparasitarios utilizados entre 2015 al 2017.

1.- Evaluación de parámetros de ciclo de vida de cepas de caligus obtenidas desde las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes: Análisis de duración de ciclo de vida de la F1, tasa de fertilidad y fecundidad, número de huevos por saco ovígero, tasa de eclosión, tasa de fijación y viabilidad de adultos.

Antecedentes

La Caligidosis es una enfermedad producida por la especie *Caligus rogercresseyi*, el parásito de mayor impacto económico y riesgo sanitario que enfrenta la industria del salmón en Chile. Una de las mayores brechas para resolver de la Caligidosis en la industria, guarda relación con la capacidad de modelar y predecir la dinámica poblacional de *C. rogercresseyi* en distintas zonas geográficas con regímenes hidrográficos y ambientales contrastantes, como es el caso de las regiones X y XI. Sin embargo, a pesar de existir modelos epidemiológicos disponibles para *Lepeophtheirus salmonis* desarrollados por investigadores en Canadá y en Noruega, los parámetros de historia de vida (tasa de crecimiento, mortalidad, fecundidad, duración del ciclo de vida, etc.) necesarios para alimentar el modelo matemático han sido escasamente descritos para *C. rogercresseyi*. De esta forma, es prioritario generar investigación básica sobre la biología del ciclo de vida de este ectoparásito, estableciendo dichos parámetros bajo distintas combinaciones de factores físicos como temperatura, salinidad y pH, así como establecer la existencia de diferencias en el ciclo de vida en *Caligus* con distintos orígenes biogeográficos. La exposición de las etapas plantónicas de *C. rogercresseyi* a una combinación de distintas salinidades y temperaturas tiene un efecto significativo en la tasa de supervivencia y tiempo desarrollo, siendo la salinidad el factor que está principalmente involucrado en la supervivencia de los organismos, mientras que en el tiempo de desarrollo el efecto más significativo es el de la temperatura (Montory et al. 2018). Se ha observado que la duración del ciclo de vida de *C. rogercresseyi* puede variar dependiendo de la temperatura. A temperaturas cercanas a 10°C el ciclo de vida puede tardar aproximadamente 45 días, a 12°C puede bordear 31 días de duración, mientras que a temperaturas cercanas a 15°C el ciclo se reduce a 26 días (González y Carvajal, 2003). Al mismo tiempo, se ha observado que durante épocas de mayor temperatura el largo de los sacos ovígeros de las hembras incrementa (Bravo et al. 2009). Adicionalmente, otro factor ambiental que aparentemente influye en el desarrollo de *C. rogercresseyi*, es la salinidad. Se ha observado que en zonas de Chile en donde la salinidad es baja (menos de 25 PSU) existe menor abundancia de este ectoparásito (Bravo et al. 2009, Bravo et al. 2008). Se han observado mortalidades de 100% de nauplius I y de nauplius II en salinidades menores a 20 PSU, mortalidades de un 48± 17% de nauplius I y un 58± 15% de nauplius II a 26 PSU, mientras que a 32 PSU la mortalidad de los nauplius I registrada ha sido de un 15% y un 25± 6% para los nauplius II (Montory et al. 2018).

Objetivo

1. Evaluar el tiempo de desarrollo de las etapas plantónicas de *C. rogercresseyi* de las distintas cepas de *Caligus* dependientes de la temperatura.

Metodología

Diseño experimental y obtención de las muestras

Individuos de la especie *C. rogercresseyi* de tres cepas de *Caligus* una proveniente de la Región de Los Ríos, otra de Aysén y Magallanes utilizados para la evaluación de parámetros de ciclo de vida bajo las condiciones ambientales de cada zona en unidad experimental perteneciente al Laboratorio de Biotecnología y Genómica Acuícola (LBGA) en Dichato. Los estadios larvales de *C. rogercresseyi* fueron obtenidos a partir de hembras grávidas colectadas de individuos de *Salmo salar* mantenidos en el laboratorio. Las hembras recién colectadas fueron mantenidas con agua de mar (a 32 PSU) microfiltrada (a 5 micrómetros), expuesta laminarmente a radiación ultravioleta, con suministro continuo de aire (8.8 mg/L O₂) al interior de una cámara de cultivo con temperatura constante de 12 °C.

Tabla 1. Temperaturas evaluadas para cada localidad

Localidad (cepa)	Temperatura (°C)
Región de Los Lagos	12-16
Aysén	8-16
Magallanes	8-12

Diseño experimental

El experimento contará con 3 temperaturas: 8, 12 y 16°C y 3 salinidades: 22, 26 y 32 PSU, implementándose 9 tratamientos con 3 réplicas cada uno (Fig. 1). Desde un frasco de vidrio de un litro con 2700 nauplius I se repartirán 100 nauplius a los 9 tratamientos y sus respectivas réplicas, en frascos de vidrio de 500 ml con agua de mar micro-filtrada (a 5 micrómetros) en las 3 salinidades correspondientes, expuesta laminarmente a radiación ultravioleta, con suministro continuo de aire (8.8 mg/L O₂). Una vez que se tengan los 100 nauplius en cada uno de los tratamientos, estos se trasladarán a las cámaras de cultivo.

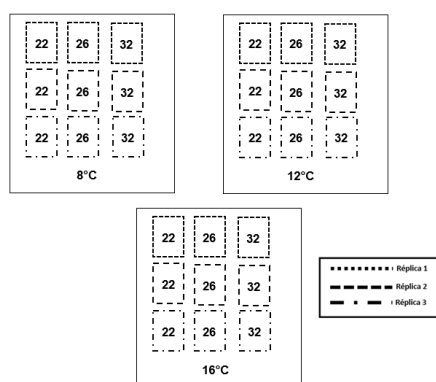


Figura 1. Cámaras de cultivo con sus respectivos tratamientos. Los cuadrados grandes representan cada una de las cámaras de cultivo y los cuadrados pequeños a los distintos tratamientos y sus respectivas réplicas.

Estimación del número de individuos

Cada 24 horas desde el inicio del experimento se realizarán conteos de la mortalidad existente en cada uno de los tratamientos (Fig. 2). Lo primero es aplicarle luz al frasco de 500 ml donde se encuentran todos los organismos, aquellos que respondan a la luz mediante movimiento se consideraran como vivos. Para separarlos de los muertos, se filtra la primera capa de agua del frasco, luego se vuelve a aplicar luz al frasco para confirmar que todos los organismos que se encuentran en él están muertos, los organismos vivos deben traspasarse inmediatamente al frasco original de 500 ml con la salinidad que corresponda al tratamiento, con aireación y dentro de la cámara de cultivo.

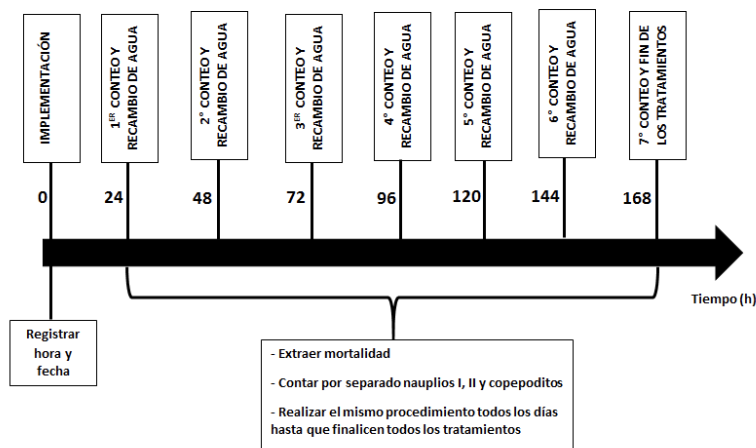


Figura 2. Diagrama de ejecución del diseño experimental. La flecha negra representa el tiempo (en horas) y las actividades a realizar en cada muestreo.

Los organismos muertos deben traspasarse a la cámara de conteo para zooplancton para ser cuantificados bajo la lupa estereoscópica, deben enumerarse por separados nauplius I, II y copepoditos. La mortalidad debe guardarse en un tubo Falcón con alcohol absoluto, el cual debe rotularse con la información del tratamiento al que pertenece, para luego ser fotografiado y medido.

Análisis de morfología

Desde cada condición se extraerán aleatoriamente 30 nauplius I, 30 nauplius II y 30 copepoditos, los que serán fotografiados para posteriormente realizar distintas medidas morfométricas.

Análisis estadísticos

Para determinar si existe un efecto de la combinación T-S sobre el éxito de infestación bajo distintos niveles de desarrollo de los estados plantónicos de *C. rogercresseyi* se utilizará un ANOVA de dos factores con interacción y si existen diferencias estadísticas se aplicará un test a posteriori. Previo al análisis se realizará la comprobación de los supuestos de la estadística paramétrica y de no cumplirse se evaluará una transformación de los datos.

Diseño experimental evaluación del efecto T/S en Caligus adultos (ensayo in vivo)

Además se evaluó el efecto de la salinidad y temperatura sobre el ciclo de vida de las cepas de *C. rogercresseyi*. Para llevar a cabo el experimento se implementaron 10 estanques de 230 litros efectivos con aireación constante (6 mg/L de O₂ disuelto) con 8 peces correspondientes a la especie *Salmo salar* en cada uno (Fig. 3). Una vez que los peces ya se encontraban aclimatados en sus respectivas condiciones, se realizó una infección con una carga de 35 copepoditos por pez. Además, se mantuvo un estanque control para observar el efecto de las condiciones de T/S sobre peces sin infección.

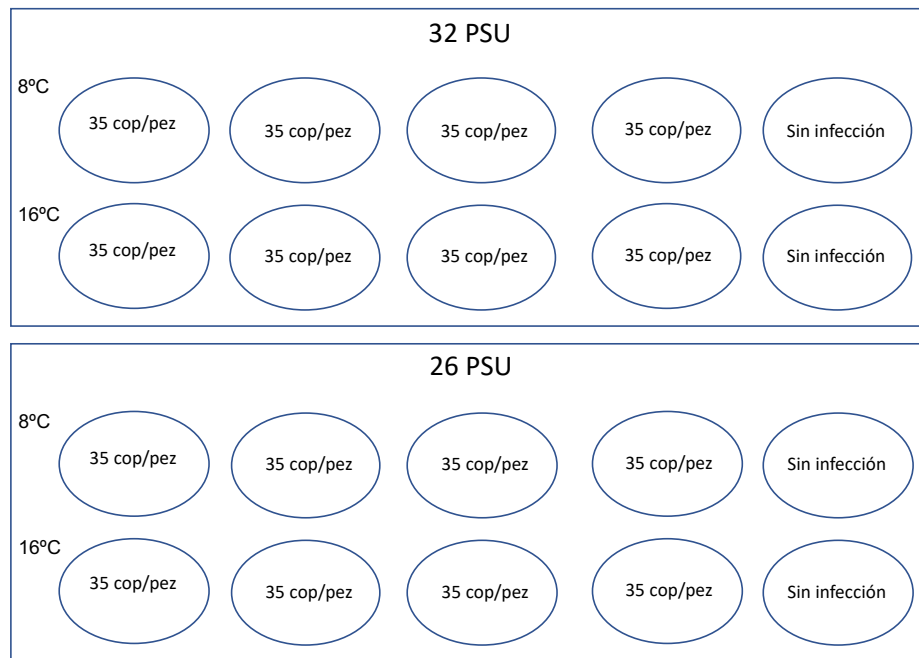


Figura 3. Diseño experimental para evaluación de efecto de la temperatura en el ciclo de vida de *C. rogercresseyi*.

Muestreo y conteo de copepoditos

Transcurridas 48 horas post-infección se sacrificaron dos peces por cada uno de los estanques (incluido los estanques control), con la finalidad de evaluar el porcentaje de infección efectiva de copepoditos sobre el hospedador. De estos individuos se obtuvieron muestras de mucus, piel y riñón anterior. El conteo de copepoditos se llevó a cabo por zonas, para esto el pez se dividió en 5 zonas corporales, con el fin de facilitar el conteo. Los peces se anestesiaron con BZ-20 (dosis: 1,5 ml/20 l) para cuantificar los copepoditos (Fig. 4).

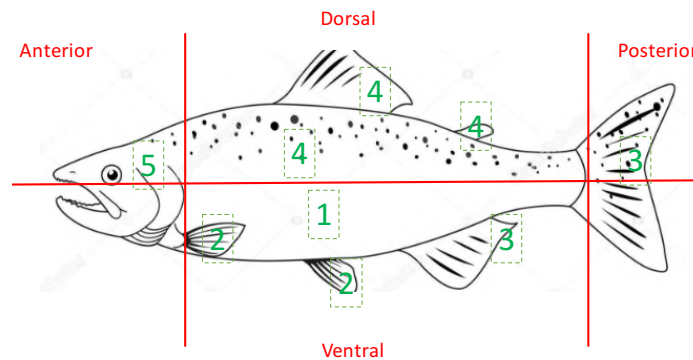


Figura 4. Zonas corporales para el conteo de copepoditos.

Luego de 25 días post-infección, se realizó un muestreo (Fig. 5) de las hembras adultas de caligus para evaluar el estado de madurez en el que se encontraban. Para el conteo de los Caligus se sacrificaron los peces siguiendo las normas bioéticas de la UdeC. Las hembras ovigeras colectadas fueron puestas en agua de mar filtrada con aireación constante para evaluación del éxito de fecundidad y eclosión. Por otra parte, para futuras evaluaciones transcriptómicas, se fijaron muestras de hembras y machos de Caligus en RNA Later. Además, se colectaron muestras de piel, riñón anterior y mucus de los peces expuestos a las distintas condiciones de salinidad y temperatura y fueron fijadas en RNA Later, para estudios transcriptómicos futuros.

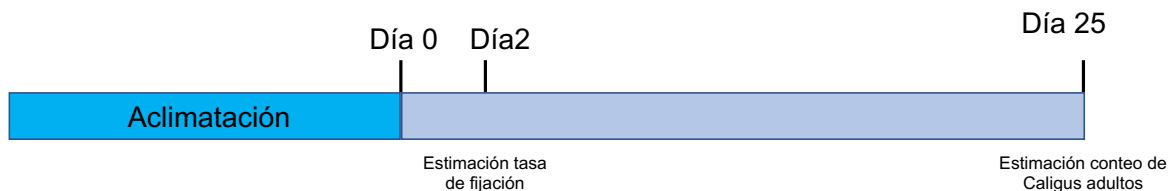


Figura 5. Muestreos realizados durante la evaluación de las condiciones de T/S sobre el ciclo de vida de Caligus.

Análisis estadísticos

Se realizó una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para evaluar diferencias significativas entre los distintos tratamientos. También se efectuó una comparación de proporción de fijación entre tratamientos y mediante la prueba no paramétrica Mann-Whitney.

Resultados

En este informe se entregan resultados de sobrevivencia de los estados larvales de Caligus expuestos a las diferentes temperaturas y salinidades, tiempos de desarrollo de los estados larvales y morfometría de los estados larvales (nauplius y copepoditos). Las hembras ovígeras de las distintas cepas de Caligus mantenidas en el LRC.

Supervivencia larval

Se registraron diferencias significativas en la sobrevivencia de larvas Caligus expuestas a los diferentes tratamientos ($X^2 = 158.1$; $GL=8$). La sobrevivencia larval fue afectada significativamente por la salinidad, produciéndose mayor mortalidad de larvas Caligus a salinidades de 22 psu, independiente de la temperatura. A esta salinidad se registró el mayor decaimiento en la sobrevivencia larval y las longevidades de los estados larvales fueron menores, variando en promedio entre 162 horas (6,7 días) a 8°C y 22 psu, 210 h (8,7 días) a 12°C y 22 psu y 234 h (9,7 días) a 16°C y 22 psu. En tanto, la mayor sobrevivencia de copepoditos se registró a 16°C y 32 psu. Adicionalmente, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para evaluar el efecto de las distintas salinidades y temperaturas sobre la mortalidad de *C. rogercresseyi*, analizando las covarianzas de las mortalidades acumuladas a través del tiempo. El factor salinidad (Fig. 6A) explica una mayor varianza en las mortalidades acumuladas en comparación el factor temperatura (Fig. 6B), lo que sugiere que *C. rogercresseyi* tiene un mayor rango de tolerancia a cambios de temperatura que de salinidad. Este patrón también se observa al considerar la combinación temperatura-salinidad como factor (Fig. 6B), donde por ejemplo, el grupo T8-S22 difiere significativamente del grupo T8-S32 a pesar de estar expuestos a igual temperatura, sin embargo, el grupo T8-S22 no difiere significativamente del grupo T12-S22 a pesar de estar expuestos a temperaturas diferentes.

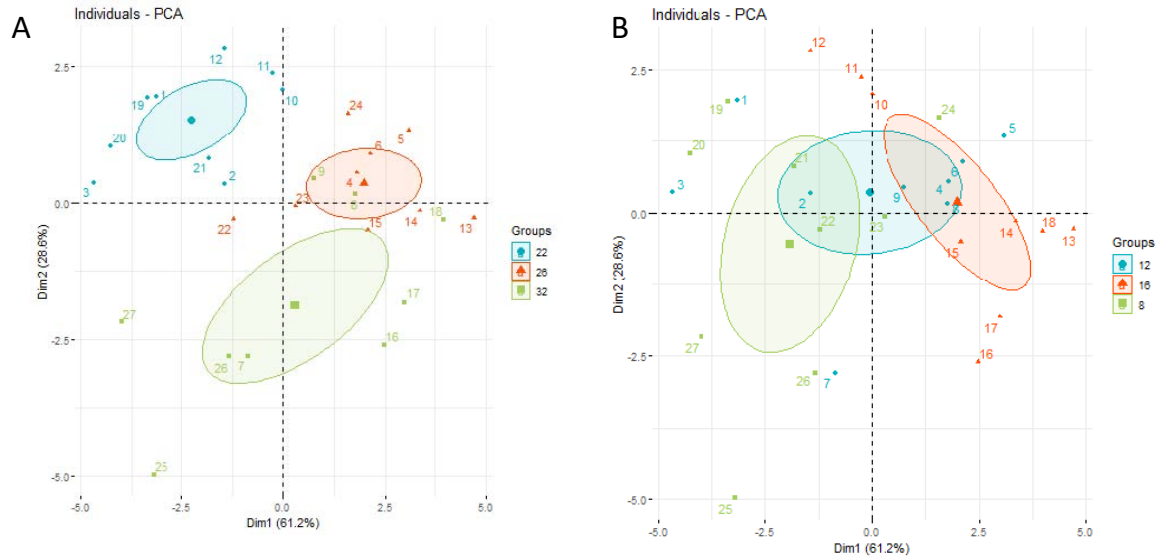


Figura 6. Análisis de componentes principales (A) basado en mortalidad acumulada al tiempo de *Caligus rogercresseyi* expuesto a distintas salinidades. (B) Análisis de componentes principales basado en mortalidad acumulada al tiempo de *Caligus rogercresseyi* expuesto a distintas temperaturas.

El análisis de las mortalidades acumuladas indica que el 50% de mortalidad se alcanzó alrededor de las 44 hrs en aquellos tratamientos donde las larvas de *Caligus* fueron expuestas salinidades bajas de 22 psu (Fig. 7). Contrariamente, la menor mortalidad donde se alcanzó el 50% fue registrada a las 162 hrs en el tratamiento combinado de 16°C y 32 psu. Interesantemente, a temperaturas menores de 8 y 12°C pero en salinidades normales de 32 psu, el 50% de mortalidad fue observado a las 114 hrs post-tratamiento. Los resultados en conjunto sugieren que la salinidad posee un mayor efecto sobre la sobrevivencia de las larvas de *Caligus* comparado con la temperatura durante el cultivo larval. Es decir, es probable que *Caligus* posee un rango de tolerancia restringido en salinidad pero de mayor amplitud en temperatura.

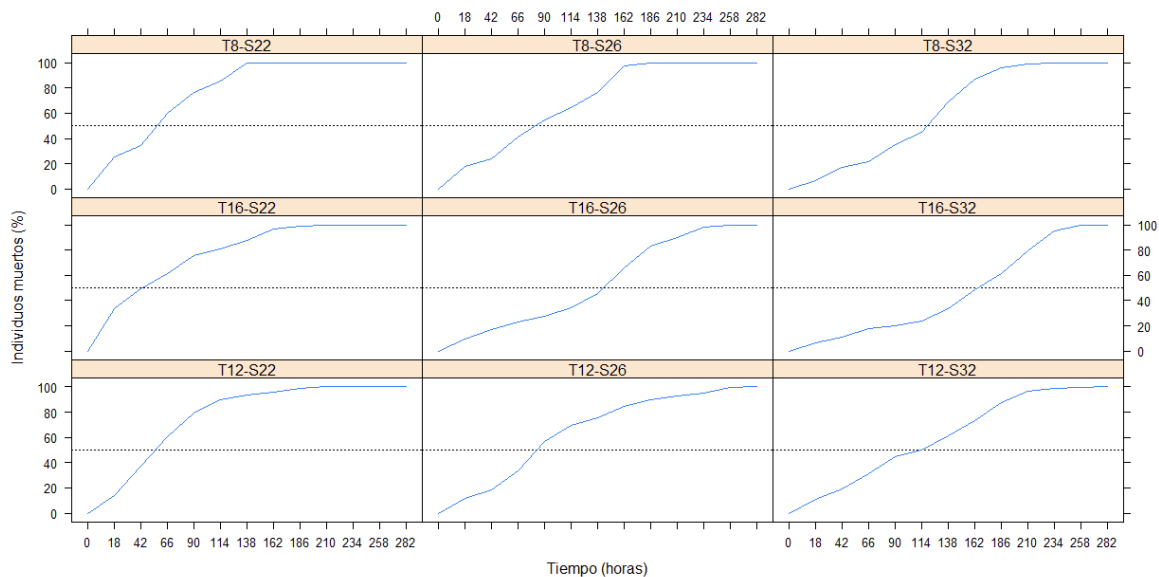


Figura 7. Porcentaje de individuos muertos promedio a la hora por tratamiento. Línea punteada indica el 50% de individuos muertos.

Morfometría de copepoditos expuestos a distintas combinaciones de Temperatura y salinidad

Al final de los experimentos, se midió el largo total, ancho total y largo del abdomen de los copepoditos y se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para evaluar diferencias significativas en su morfometría. El PCA mostró que no hubo variaciones significativas en la morfometría de copepoditos expuestos a los diferentes tratamientos de temperatura y salinidad (Fig. 8).

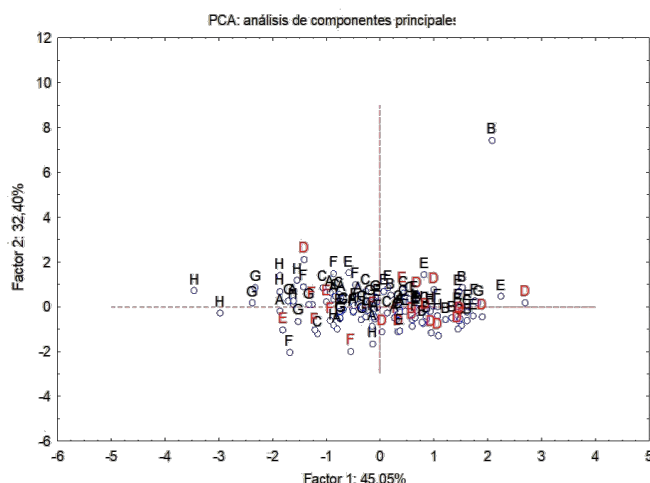


Figura 8. Resultados del PCA para copepoditos expuestos a diferentes tratamientos de temperatura y salinidad. A= 12°22psu; B= 12°C, 26psu; C= 1°C, 32 psu; D=16°C, 22psu; E=16°C, 26psu; F=16°C, 32psu; G= 8°C, 26psu; H=8°C, 32psu.

Fijación de copepoditos

Se realizó conteo de copepoditos fijados luego de 48 hrs, en los peces expuestos a las distintas condiciones de salinidad y temperatura. Los peces mantenidos a 16°C y 26 PSU mostraron mayor tasa de fijación (40%). Mientras los otros tres grupos experimentales mostraron tasa cercanas al 25% (Fig. 9). Del análisis estadístico se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos de 26 y 32 PSU a 16 °C. Además se encontraron diferencias significativas dentro del tratamiento de 26 PSU a las distintas temperaturas, mientras que no se observaron diferencias dentro del tratamiento de 32 PSU a distintas. Los valores p del test se encuentran en la tabla 2.

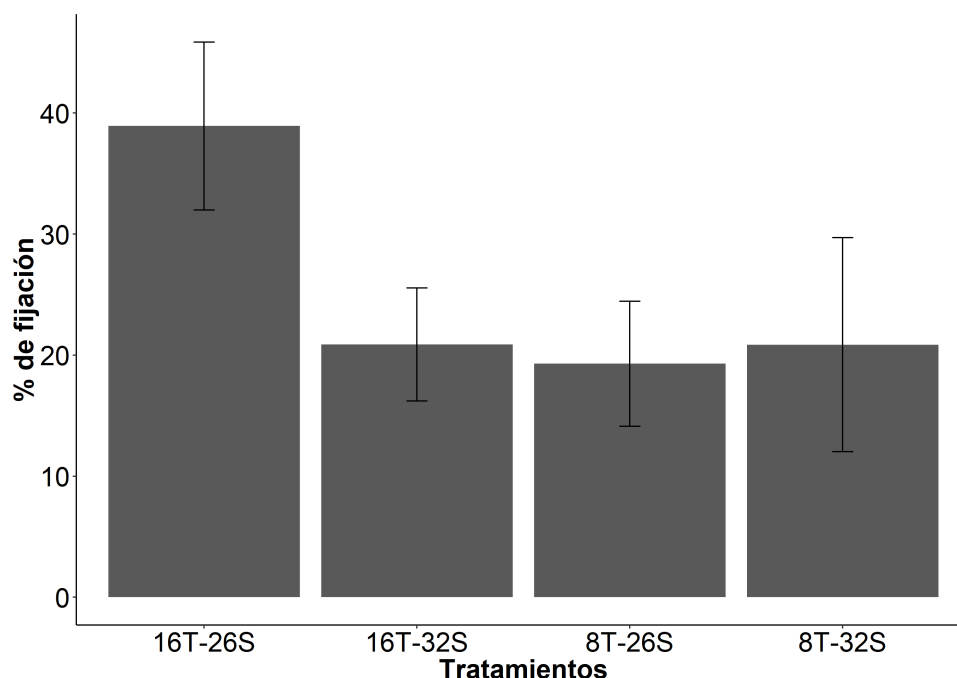


Figura 9. Media del porcentaje de fijación de cada tratamiento. Barras de error corresponden al intervalo de confianza.

Tabla 2. Valores p de comparación por pares mediante Wilcoxon con corrección de Holm

	16T-32S	16T-26S	8T-32S
16T-26S	0.022		
8T-32S	1	0.072	
8T-26S	1	0.022	1

Cantidad de Caligus adultos parasitando

Luego de 25 días de infestación se evaluó el número de *Caligus* adultos fijados en los peces, mantenidos a las distintas salinidades y temperatura. El número de adultos totales parasitando peces luego de 25 días fue entre 8 a 10 *Caligus* adultos por pez a las temperaturas de 8 y 16°C a 32 PSU. El análisis estadístico utilizado (Mann-Whitney) no muestra diferencias significativas en cuanto a número de *Caligus* adultos entre ambas temperaturas a 32°C (Fig. 10).

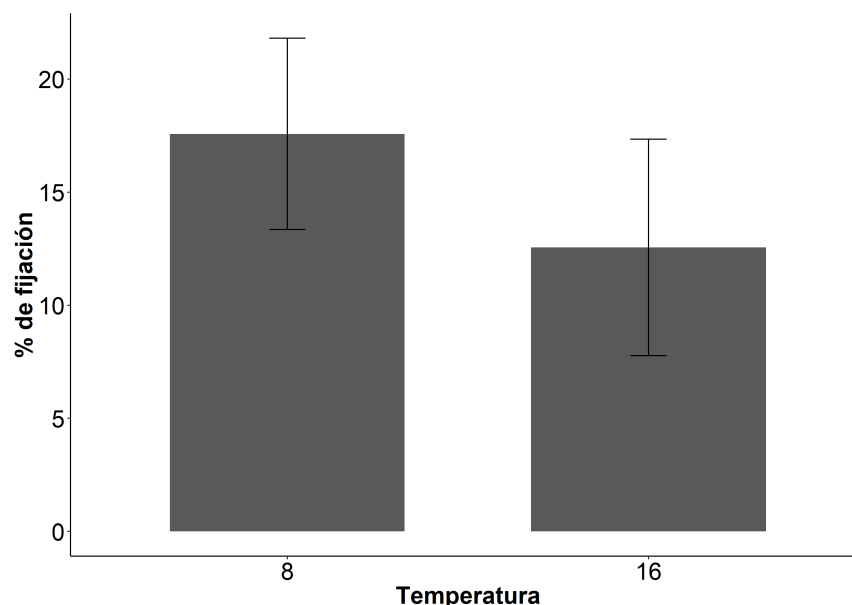


Figura 10. Media del porcentaje de fijación total por temperatura a 32 PSU. Barras de error corresponden al intervalo de confianza.

Tabla 3. Resumen de parámetros de ciclo de vida obtenidos para cepas de *C. rogercresseyi*.

Cepa	Los Lagos	Aysén	Magallanes
Duración del ciclo (días)	25	27	31
Tasa de fertilidad (larvas por hembra)	320	320	240
Tasa de fecundidad (huevos por saco)	80	80	60
Tasa de eclosión (porcentaje de eclosión)	100%	100%	100%
Tasa de fijación (%)	80%	76%	46%
Viabilidad de adultos	100%	100%	100%

Conclusiones

Tanto la temperatura como la salinidad tienen efectos sobre las etapas de vida libre de *Caligus rogercresseyi*. A bajas salinidades se ve afectada significativamente la sobrevivencia de los estadios larvales de *C. rogercresseyi*. Por otro lado, la temperatura tiene un efecto en la duración del ciclo de vida de las etapas planctónicas del parásito, teniendo una mayor durabilidad a temperaturas más bajas. También debe destacarse que temperaturas y salinidades del agua muy bajas ocasionan una alta mortalidad, dada la sensibilidad de los estados larvales.

En salinidades de 32 PSU, las temperaturas de 8 y 16 °C no producen ningún efecto en la fijación de hembras ovígeras adultas sobre el hospedero, a diferencia de los machos, sobre los cuales existe un efecto de la temperatura en la fijación de estos al huésped, donde a mayores temperaturas el porcentaje de fijación es menor.

La duración del ciclo de vida de *C. rogercresseyi* se ve afectado por las temperaturas. Es así como la cepa proveniente de Los Lagos presenta un ciclo de 25 días, mientras que las cepas de Aysén y Magallanes tienen una duración de 27 y 31 días, respectivamente.

2.- Comparación de sensibilidad farmacológica de cepas de caligus obtenidas desde las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes: Desarrollo de bioensayos para azametifós, deltametrina, Lufenurón y Benzoato de Emamectina según protocolos estandarizados. Evaluación de biomarcadores moleculares de sensibilidad farmacológica de caligus.

Antecedentes

La mayor parte de los tratamientos antiparasitarios contra *Caligus* se realizan con el organofosforado azametifós y en menor medida con deltametrina y cipermetrina. Aunque no se han publicado estudios moleculares de la pérdida de sensibilidad con azametifós, profesionales de la industria afirman que ya se han reportado casos de fallas de tratamientos tanto en los Lagos como en Aysén. La principal causa de resistencia farmacológica es la repetición de tratamientos utilizando el mismo principio activo, generando así una alta presión selectiva sobre las poblaciones de *C. rogercresseyi*. Los parásitos susceptibles mueren y los sobrevivientes (resistentes) transmiten los genes de resistencia a las sucesivas generaciones. Sin embargo, el riesgo aumenta cuando las poblaciones se hacen no sólo resistentes a un fármaco, sino multiresistentes. Este fenómeno, ha sido descrito previamente en artrópodos incluyendo el piojo del salmón noruego *Lepeophtheirus salmonis*. En este contexto, la aparición de poblaciones multiresistentes a tratamientos farmacológicos puede generar una situación de alto riesgo sanitario para la industria del salmón (Myhre Jensen et al., 2017). Es importante señalar que la tolerancia a una droga en particular no significa necesariamente tolerancia a otras. En este sentido, un principio básico del control parasitario es alternar el uso de los principios activos para reducir la presión de selección sobre la población de piojos.

En este contexto, resulta imperioso conocer con certeza los niveles de sensibilidad farmacológica para las distintas poblaciones de piojos. La prueba estándar para evaluar el nivel de sensibilidad de una población parasitaria a un determinado principio activo es el bioensayo. El bioensayo es una prueba in vivo en la que se desafía a un grupo de parásitos a diferentes concentraciones conocidas de la droga ($n=7-8$), bajo condiciones controladas, con el objetivo de estimar: 1) el parámetro EC_{50} que corresponde a la concentración efectiva que logra matar al 50% de los individuos, y 2) el porcentaje de individuos muertos en la concentración recomendada por el fabricante. A pesar de ser utilizado ampliamente por las empresas salmonera, el bioensayo posee diversas desventajas: (1) En estados iniciales del desarrollo de la resistencia farmacológica, los resultados del bioensayo son ambiguos, (2) Debido a que el bioensayo se basa en la observación, parásitos vivos inmóviles pueden contabilizarse como individuos muertos. (3) En general, los bioensayos requieren de entre 200 y 250 piojos vivos y en buen estado, lo que en algunas circunstancias puede ser difícil de conseguir, (4) La sensibilidad farmacológica depende en parte del estado de robustez del piojo, lo que a su vez varía en función de la estación del año, las condiciones de muestreo y traslado al laboratorio, entre otras, (5) Tiempo de análisis (1-2 días) y (6) alto costo. Reconociendo las desventajas de los actuales métodos de determinación de resistencia farmacológica basados en bioensayos, se propone también establecer las bases moleculares para la identificación de biomarcadores que permitan la generación de nuevos métodos molecular para determinar resistencia en *C. rogercresseyi*.

Objetivo

Determinar sensibilidad farmacológica de cepas obtenidas de distintos centros de cultivo mediante evaluación por bioensayos y marcadores moleculares.

Metodología

Realización de bioensayos para evaluación de centros de bajo y alto rendimiento de tratamientos farmacológicos

Mediante una aproximación bioestadística se buscó la preselección de sitios con alto y bajo rendimiento farmacológico. Para esto, todos los centros de cultivo con salmón del Atlántico y trucha arcoíris en actividad entre 2015 y 2016 fueron analizados e incluidos en el análisis estadístico para la generación de un ranking de acuerdo a su eficacia de tratamientos observada para las drogas azametifós, deltametrina y cipermetrina. Para ello se modeló la eficacia de tratamiento para cada

droga en base a los datos del informe post-tratamiento (IPT) entre 2015 y 2016. Producto de este análisis se generaron tres modelos de regresión lineal de efectos mixtos, uno para cada droga, desde los cuales se calcularon los residuos, estadístico que fue empleado para el ranking de los centros. Así, los centros con residuos negativos se asociaron a tratamientos exitosos, mientras que aquellos con residuos positivos se asociaron con tratamientos fallidos. Para cada droga se seleccionaron los 3 centros con mayores y menores valores de residuos, los que en la práctica deberían ser los centros con peores y mejores eficacias de tratamiento observadas durante el periodo.

De los centros seleccionados se realizó bioensayos según la droga correspondiente. Esto bajo las condiciones descritas anteriormente en el punto anterior, siguiendo el protocolo SEARCH (2006). Se colectaron todos los animales ocupados en los bioensayos, separados por sexo, y se fijaron en RNALater solution (Ambion®, USA) para posteriores análisis de expresión génica. Adicionalmente, se estandarizó un protocolo de bioensayo para Lufenuron y Benzoato de Emamectina testeando concentraciones de 400, 800 y 1200 ug/L de cada fármaco por separado.

Validación de marcadores transcriptómicos asociados a rendimiento de tratamientos farmacológicos

Utilizando las muestras tomadas de los bioensayos mencionados en el punto anterior, se validó un grupo de marcadores transcriptómicos codificantes y no-codificantes por qPCR. Para ello, a partir de las secuencias identificadas se realizó diseño de partidores específicos utilizando la herramienta bioinformática Primer 3, incorporada en el software Geneious (Biomatters Ltda®). El análisis de expresión génica para validar los transcritos candidatos se realizó en 10 individuos adultos (machos y hembras por separado) de cada localidad donde se realizó el bioensayo, evaluando aquellos individuos que quedaron vivos, como aquellos que fueron afectados después del tratamiento. Los individuos colectados fueron aquellos expuestos a 5 ppb de azametifos y cipermetrina, y 1 ppb deltametrina; esto para evaluar una concentración cercana a la media según los valores de EC_{50} obtenidos en la etapa anterior. La evaluación de los niveles de abundancia relativa de cada transcrito fue normalizada utilizando el gen β -tubulina como control endógeno, el cual ha sido validado previamente como control interno para *Caligus* expuestos a drogas (Valenzuela-Muñoz et al., 2015). El método de cuantificación utilizado fue el método delta CT comparativo ($\Delta\Delta_{CT}$) (Pfaffl, 2001). Los análisis estadísticos (análisis de distribución de datos, evaluación de diferencias significativas) fueron realizados en el software comercial Graphpad Prism 6. Adicionalmente, mediante el uso del package de R llamado “factoextra”, se realizó una serie análisis de componentes principales (PCA) para evaluar las causas de las diferencias significativas encontradas en las muestras, analizando las covarianzas de cada la expresión de cada transcrito (variable dependiente) y otros factores que explicaron su diferenciación como son el sexo, centro de origen, droga utilizada y condición de parásitos después del bioensayo. Con esto fue posible agrupar genes y lncRNAs que presentaron un patrón de expresión similar entre las distintas respuestas a los fármacos, sugiriendo según de esta forma si son marcadores de asociados al rendimiento de fármacos utilizados en centros de cultivo para tratar *C. rogercresseyi*.

Identificación de marcadores SNPs en regiones transcriptómica de C. rogercresseyi

Desde transcriptomas obtenidos por secuenciación masiva para *Caligus* (Gallardo-Escárate et al., 2014), se utilizó el ensamble *de novo* para identificación de variantes tipo SNPs en secuencias relacionadas con respuesta a fármacos. Las secuencias relacionadas fueron extraídas a partir del análisis de anotación por Gene Ontology, identificando genes relacionados con la respuesta a fármacos en el parásito. La identificación de SNPs se realizó en el software CLC Genomics Workbench (CLCbio, Dinamarca), utilizando la herramienta *Basic variant detection*. Los parámetros utilizados fueron: cobertura mínima = 30, conteo mínimo = 10, frecuencia alélica mínima = 25%, calidad mínima de base = 10, calidad mínima de base vecina = 10; radio de bases vecina = 5. Una vez obtenida la tabla de variantes SNPs encontradas se categorizaron identificando la posición en la secuencia, su ubicación (regiones codificantes, 3'-UTR, 5'-UTR), clase de SNPs (1,2,3,4) y tipo de SNPs (sinónimo, no-sinónimo). Un grupo de SNPs seleccionados, basados en su calidad y

según las categorías mencionadas anteriormente, se seleccionó para diseño de partidores para high-resolution melting analysis (HRMA). La validación de estos SNPs se realizó a partir de DNA extraído de 10 individuos de *C. rogercresseyi* y amplificación por qPCR con curva HRM. Las condiciones de qPCR fueron las mismas mencionadas en la actividad anterior, pero se reemplazó el fluoróforo por EvaGreen (Life Technologies, USA) dada su mayor intensidad, y la curva de disociación se realizó con alta resolución (tomando datos cada 0.1 s en vez de cada 0.3 s). Con los datos de qPCR, se recalculó la frecuencia alélica de los SNPs, los cuales pueden ser utilizados para genotipificación a escala poblacional.

Resultados

Resultados bioensayos para evaluar rendimiento de tratamientos farmacológicos

En base a la cantidad de Caligus vivos y afectados obtenidos por cada concentración de drogas en los bioensayos, se calculó el valor de EC₅₀ para cada centro. En la tabla 4 se muestran los resultados, donde en color rojo se resaltan aquellos centros que fueron posteriormente seleccionados para validación de marcadores transcriptómicos. Esto debido a que los valores muestran ser contrastantes según el rendimiento estimado previamente. Para los bioensayos realizados para Lufenuron y Benzoato de Emamectina no fue posible determinar el valor de EC50 ya que en las concentraciones evaluadas se registró 100% de mortalidad.

Tabla 4. Resultados bioensayos para cada droga. En rojo centros seleccionados para validación de marcadores moleculares. LL: cepa Los Lagos; AY: cepa Aysén; MG: cepa Magallanes

Código Centro idc	ACS	Región	Antiparasitario	EC50	95% CI
1796	10b	LL	Azametifós	0,4778	0.0765 - 1.275
1376	9b	LL	Cipermetrina	9,709	3.155 - 57.84
4145	10b	LL	Cipermetrina	2,178	0.972 - 5.259
1796	10b	LL	Deltametrina	1,424	0.634 - 3.746
1871	10a	LL	Deltametrina	3,042	1.826 - 5.285
XX	XX	MG	Azametifós	0,456	0.878 - 1.24
4826	19a	AY	Azametifós	13,72	6.392 - 32.6
2885	19a	AY	Cipermetrina	3,12	1.852 - 5.346
3962	24	AY	Deltametrina	2,18	1.128 - 4.676

Validación de marcadores selecciones en regiones codificantes y no-codificantes del transcriptoma con asociación a rendimiento de drogas antiparasitarias

Se seleccionaron 20 transcritos entre codificantes y lncRNAs, de los cuales se midió sus valores de expresión por qPCR en centros seleccionados según los bioensayos en la etapa anterior. Se tabularon los valores de expresión relativa de estos transcritos para evaluar aquellos factores que mejor explican su variabilidad por análisis PCA. Luego a partir de biplot (variables dependientes y factores), se observaron que factores explicaron la variabilidad de expresión génica de los transcritos. A partir de estos análisis se observa que se logra diferenciar la expresión génica dependiendo de la droga aplicada, identificando ciertos genes (codificantes o lncRNA) que se asocian más con un fármaco en particular. Adicionalmente, otros factores secundarios fueron sexo, rendimiento de droga en los centros, y resultado del bioensayo (afectado, no-afectado). De estos factores, el factor sexo (macho, hembras) logró mostrar patrones diferenciados de expresión, lo cual indica que es una condición a considerar para evaluar la respuesta de Caligus a la aplicación de fármacos. Por otra parte, los factores relacionados con la estimación previa del rendimiento de droga (centro con mejor y peor rendimiento por droga), y condición de Caligus después de los bioensayos, no mostró patrones diferenciados según la expresión de los transcritos (Fig. 11). De

todas maneras, es importante señalar que en este caso se tomó el set de datos completos, incluyendo los datos de expresión para todas las drogas aplicadas y centros muestreados. Un posterior análisis separado por droga reveló que el rendimiento de drogas, tipificado como centros tolerantes y centros susceptibles, si logra diferenciar patrones de expresión particular con transcritos en particular; por el contrario, la condición después de los bioensayos no se asocia a ningún patrón específico de expresión. Para poder evaluar estas diferencias, se observó las diferencias de expresión por cada droga, evaluando específicamente los niveles de expresión de ciertos genes que mostraron cierta asociación con los factores analizados por PCA (Figs. 12 – 14).

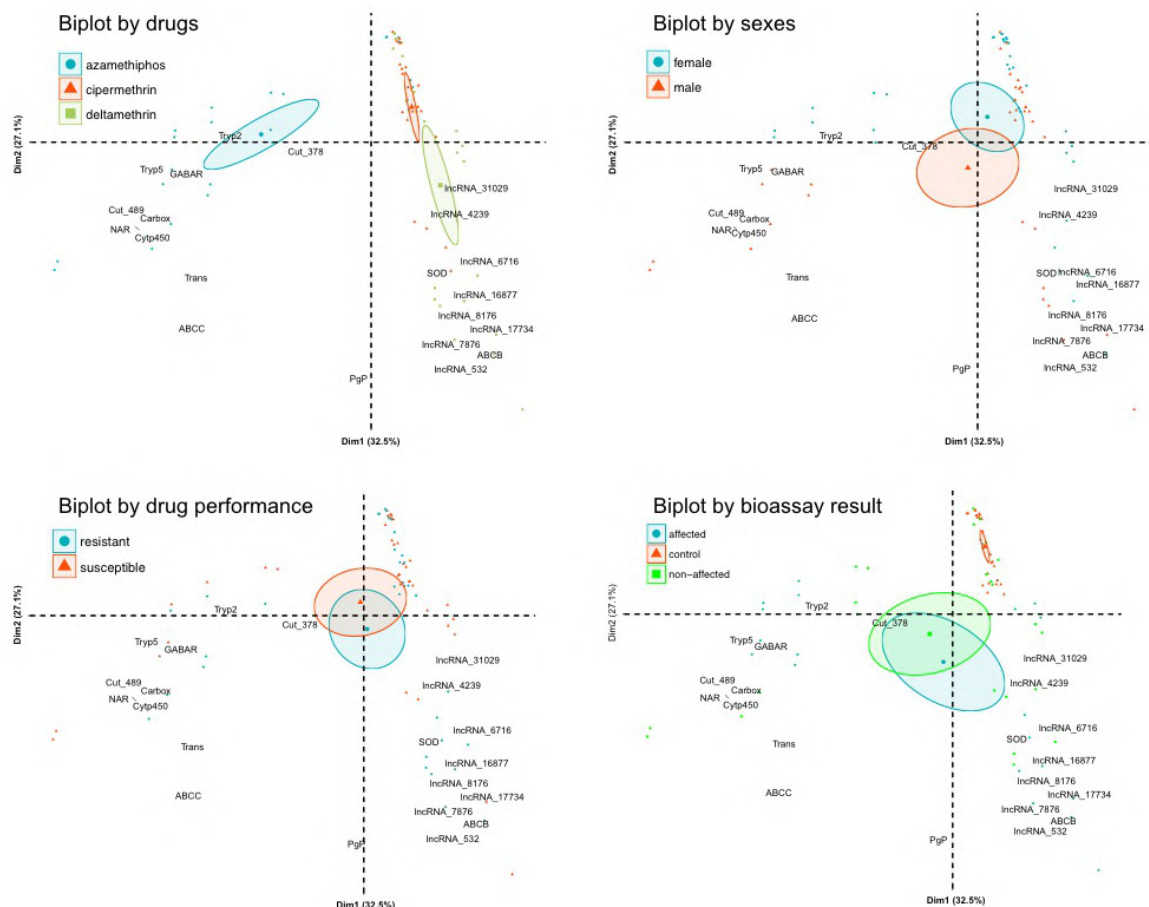


Figura 11. Análisis de componentes principales (PCA) sobre valores de expresión de genes codificantes y lncRNAs obtenidos por qPCR; y factores que explican su variabilidad: fármaco, sexo, rendimiento de droga (pre-evaluación estadística), condición de Caligus después de bioensayos. Los biplot se realizaron utilizando el package “factoextra” en el programa R.

Se seleccionaron 4 marcadores para evaluar los factores de interés para azametifós. Estos fueron cuticle protein 378 (Cut-378), GABA receptor (GABAR), superóxido dismutasa (SOD) y lncRNA_4239 (no codificante). Se observó una clara diferencia en el nivel de expresión de Cut-378 en hembras provenientes de la población sensible (1796, barrio 10b) y la tolerante (4826, barrio 19a) al fármaco. Esta tendencia se mantiene en los machos, pero con una menor diferencia que con hembras. En el caso de SOD y lncRNA_4239 sólo existió diferencias en las hembras, con claras diferencias entre ambas poblaciones; pero con un patrón inverso: mayor en la población sensible para SOD, mayor en la tolerante para el no codificante lncRNA_4239. Finalmente, GABAR muestra diferencias significativas para ambos sexos, pero con tendencias opuestas (Fig. 12).

Azamethiphos

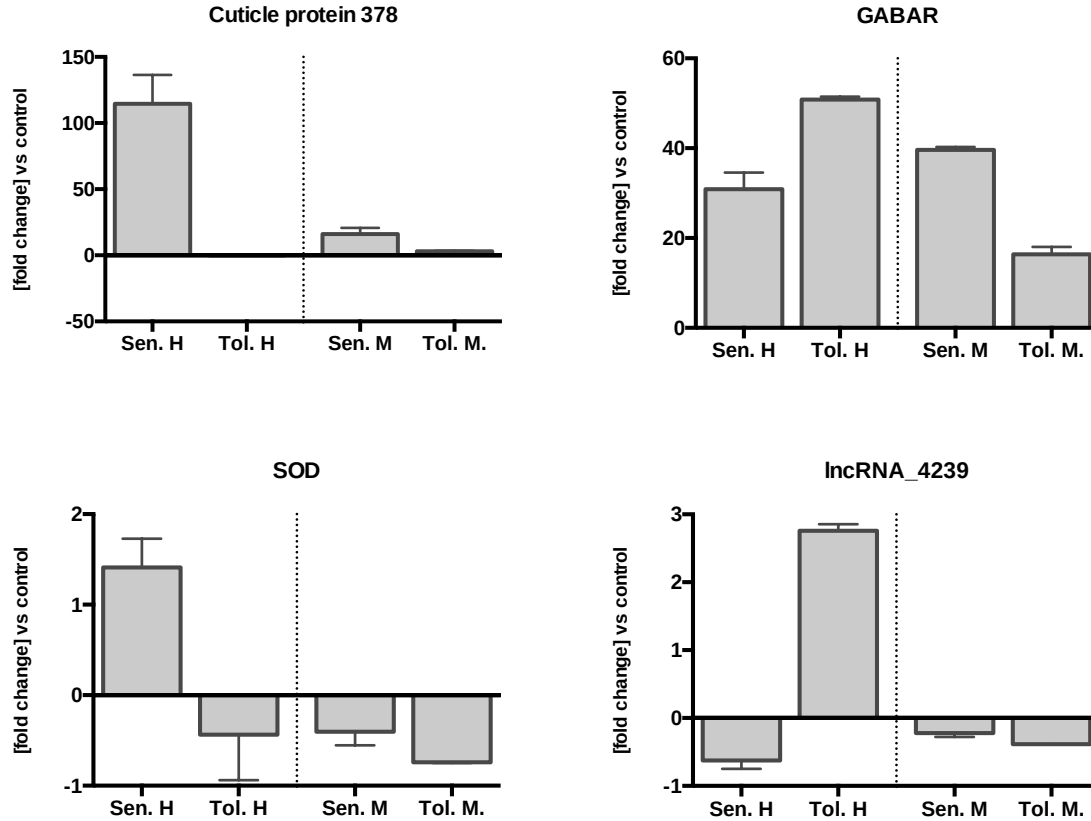


Figura 12. Niveles de expresión relativa de transcritos seleccionados para evaluar asociación con rendimiento de azametifos. En el eje Y se grafica los valores de fold-change calculados a partir de los valores de $\Delta\Delta_{CT}$ de cada muestra respecto del control. La normalización de los datos se realizó basado en la expresión del control endógeno β -actina. Sen: población sensible (centro 1796, barrio 10b), Tol; población tolerante (centro 4826, barrio 19a); H: hembras, M: machos.

Para evaluar el rendimiento de cipermetrina se seleccionaron 5 genes con patrones de expresión asociados a su efecto. Para este caso, se selección el gen codificante Cut-378, y los lncRNA 4239, 6716, 7876 y 16877. Para este fármaco sólo se observaron diferencias en las hembras para todos los marcadores al comparar la población sensible (centro 4145, barrio 10b) con el centro tolerante (1376, barrio 9b). Lo que diferencias a los transcritos son los patrones de expresión entre centros, ya que para en hembras de la población sensible hubo mayor expresión de Cut-378, lncRNA_6717 y lncRNA_16877; pero menor expresión que las hembras tolerantes de lncRNA_4239 y lncRNA_7876. Éste último transcrito es el único que muestra diferencias significativas también en machos, pero con diferencias menos notorias que para hembras. Este análisis revela que para evaluar sensibilidad de *Caligus* frente a esta droga, los resultados son más confiables al evaluar sólo animales hembras (Fig. 13).

Cipermethrin

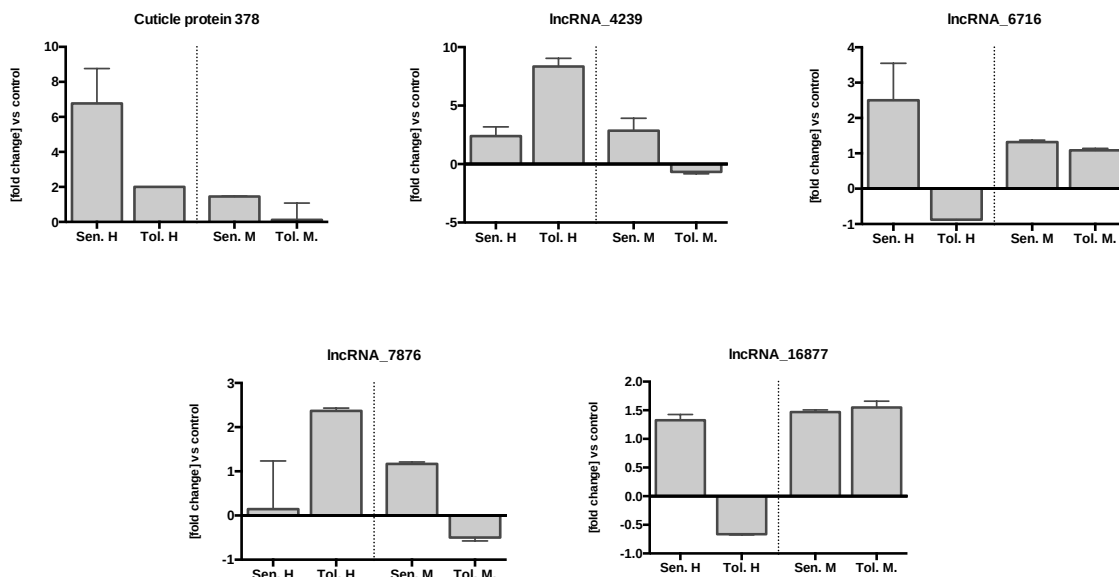


Figura 13. Niveles de expresión relativa de transcritos seleccionados para evaluar asociación con rendimiento de cipermetrina. En el eje Y se grafica los valores de fold-change calculados a partir de los valores de $\Delta\Delta_{CT}$ de cada muestra respecto del control. La normalización de los datos se realizó basado en la expresión del control endógeno β -actina. Sen: población sensible (centro 4145, barrio 10b), Tol; población tolerante (centro 1376, barrio 9b); H: hembras, M: machos.

La asociación de sensibilidad de *Caligus* a deltametrina nivel de centros se evaluó utilizando 5 marcadores transcriptómicos. Estos fueron Cut-378, SOD, y los lncRNAs 4239, 532 y 7876. Tanto SOD como lncRNA_7876 tuvieron el mismo patrón de expresión: mayor expresión de hembras en la población sensible (centro 1796, barrio 10b) que en la población tolerante (centro 1871, barrio 10a); pero esta tendencia se revierte en machos. Por otro lado, el transcritor lncRNA_4239 tiene mayor expresión en la población sensible para ambos sexos (aunque con mayor diferencia en hembras); y lncRNA_532 sólo tiene diferencias en hembras, expresándose mayormente en la población sensible. El gen Cut-378 tuvo menor diferencias poblacionales que para las otras drogas, y que para los otros transcritos para deltametrina, pero aun así se observa una mayor expresión en machos en la población sensible (Fig. 14).

Deltamethrin

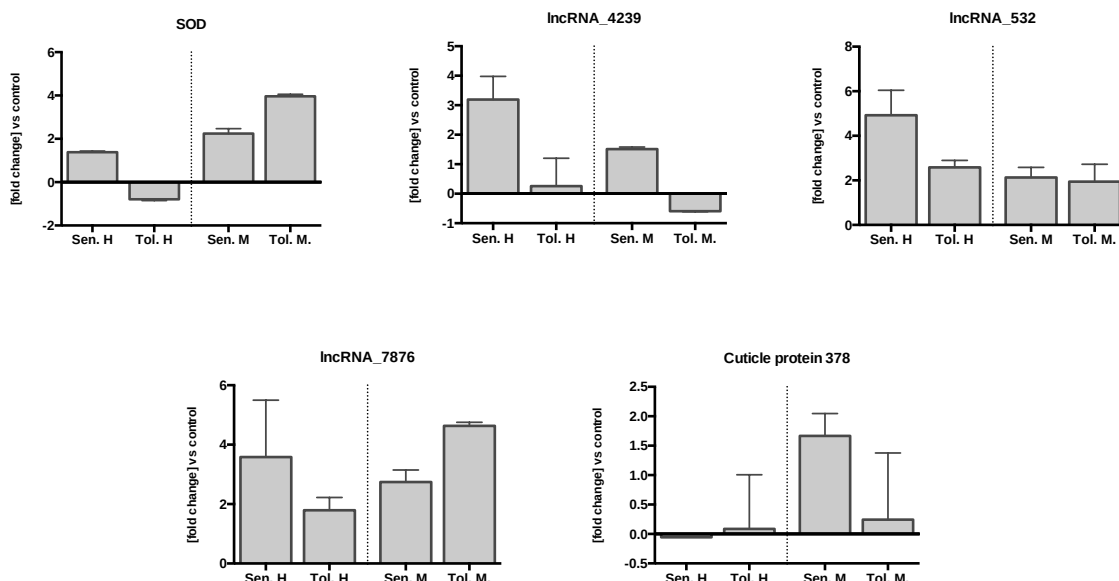


Figura 14. Niveles de expresión relativa de transcritos seleccionados para evaluar asociación con rendimiento de deltametrina. En el eje Y se grafica los valores de fold-change calculados a partir de los valores de $\Delta\Delta_{CT}$ de cada muestra respecto del control. La normalización de los datos se realizó basado en la expresión del control endógeno β -actina. Sen: población sensible (centro 1796, barrio 10b), Tol; población tolerante (centro 1871, barrio 10a); H: hembras, M: machos.

Panel de SNPs candidatos en *C. rogercresseyi* en secuencias relacionadas con respuesta a fármacos.

Desde los transcriptomas obtenidos para *Caligus*, se obtuvieron más de 70.000 variantes correspondientes a SNPs en distintas secuencias de las especies (Tabla suplementaria 1). De estos SNPs, se seleccionaron 26 genes candidatos que contenían SNPs, que estaban relacionados con la respuesta a fármacos (según estudios previos o los análisis de expresión presentados anteriormente). De estos transcritos se obtuvieron 6 marcadores de tipo SNPs que pudieron ser validados por HRM, en 5 diferentes genes relacionados con respuesta a fármacos en los parásitos (Tabla 5). Cabe destacar que dichos SNPs fueron encontrados en genes cuya respuesta fue compartida entre todos los fármacos evaluados en el presente estudio.

Tabla 5. Panel de SNPs candidatos validados en *C. rogercresseyi* para fármacos evaluados en el presente estudio.

Contig	Gen	Posición	Variante	Frecuencia (%)
2464	Glicoproteína P	1121	C/T	26,92
9779	Transportador ABCC	1897	G/A	36.59
3529	Putative cuticle protein	201	G/A	49.25
		449	T/G	28.3
10568	Serine/threonine-protein kinase Nek1	227	G/C	31.43
358	NADH dehydrogenase subunit 4	758	A/G	25.74

En referencia al análisis a nivel poblacional de los SNPs identificados, se realizó una evaluación de la frecuencia de amplificación de los primers utilizados por HRM para 20 ejemplares de cada población estudiada (Los Lagos, Aysén y Magallanes). Los resultados muestran una alta frecuencia de amplificación de para las regiones de Los Lagos y Aysén por sobre 85%. No obstante, para la región de Magallanes, se observó en general una baja frecuencia de amplificación, y en 3 de los 6 SNPs evaluados, no se observó amplificación. El resultado sugiere, que para esta última región no se encuentran las mutaciones identificadas para las regiones de los Lagos y Aysén en ejemplares de caligus (Tabla 6).

Tabla 6. Evaluación poblaciones de SNP candidatos para *C. rogercresseyi*

Gen	Variante	Los Lagos (%)	Aysén (%)	Magallanes (%)
Glicoproteína P	C/T	89,9	95,6	-
Transportador ABCC	G/A	91.2	98.4	85.1
Putative cuticle protein	G/A	-	94.8	75.1
	T/G	97.7	85.8	80.8
Serine/threonine-protein kinase Nek1	G/C	88.1	-	-
NADH dehydrogenase subunit 4	A/G	98.2	87.8	84.7

Genotipificación y análisis de variabilidad genética con SNPs

La aplicación del protocolo de SNPs optimizado anteriormente para *C. rogercresseyi* permitió genotipificar efectivamente 15 loci en 45 individuos de ejemplares muestreados en las tres regiones.

A partir de estos sets de datos se realizaron los cálculos de variabilidad genética que arrojaron los resultados que se observan en la Tabla 1, En particular se observa que los valores de variabilidad genética (He y uHe cuyos valores van de 0 a 0,5 para los SNPs) son intermedios si se comparan con otras especies y más bajos que los observados en otros estudios realizados en invertebrados en Chile usando marcadores 16s. En este estudio se observa una uHe promedio de 0,20-0,24 y se esperaba un valor más alto (por ejemplo 0,4) en concordancia con los valores observados para 16s. Es importante señalar que, durante el proceso de supervisión de la detección automática de marcadores, se observa una gran cantidad de loci SNPs siendo amplificados entre los perfiles HRM de SNPs, lo cual dificulta aún más la generación de la matriz básica de datos.

Tabla 1. Parámetros generales de variabilidad genética intraespecífica estimados a partir de loci SNPs en *C. rogercresseyi* recolectados desde las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes.

Población	% loci polimórficos	N	Na	Ne	I	He	uHe
Los Lagos	79,4	15	1,75	1,36	0,352	0,226	0,230
Aysén	69,9	15	1,67	1,34	0,337	0,218	0,224
Magallanes	50,7	11	1,41	1,23	0,222	0,143	0,149
Total	66,7	18,7	1,61	1,31	0,304	0,196	0,201

N: Número promedio de individuos, Na: Número promedio de alelos diferentes, Ne: Número de alelos efectivos, I: Índice de información de Shannon, He: Índice promedio de diversidad genética de Nei, uHe: Índice promedio de diversidad genética de Nei insesgado, F: Índice de fijación de alelos.

Los resultados por población (Tabla 1) revelan que las muestras tomadas en Magallanes presentan la menor diversidad genética ($uHe = 0,149$). Por otra parte, la diversidad genética muestra una pequeña tendencia a aumentar al comparar con las regiones de Los Lagos y Aysén. Otro aspecto a resaltar es la presencia de al menos 1 alelo único o privado en todas las poblaciones estudiadas en Magallanes, sugiriendo un proceso de selección adaptativo o bien otro evento de flujo génico diferente al repoblamiento. Esta última opción es la más probable, dado el reducido periodo de tiempo analizado. Para poder afirmar si efectivamente se alteraron los patrones de diferenciación poblacional con el repoblamiento, es necesario determinar que ocurre con la estructuración genética de las poblaciones.

Conclusión

La población de *C. rogercresseyi* obtenida desde Magallanes presenta un valor de EC_{50} de 0.45 para azametifós, lo que indica que esta cepa tiene una alta susceptibilidad a los tratamientos con este fármaco.

Para los bioensayos realizados para Lufenurón y Benzoato de Emeactina no fue posible determinar el valor de EC_{50} ya que en las concentraciones evaluadas se registró un 100% de mortalidad. Esto debido a que el producto es aplicado como aditivo en alimentos y por tanto su concentración y estandarización en bioensayos por inmersión no son comparables a las condiciones reales de uso de los fármacos.

Mediante una aproximación transcriptómica se lograron identificar distintos genes codificantes y no codificantes candidatos para el seguimiento y estimación de presencia de resistencia farmacológica en *C. rogercresseyi*. Los genes codificantes se relacionaron con procesos biológicos comúnmente asociados a la respuesta de fármacos, tales como la vía de señalización de receptores de glutamato, la vía de señalización multivesicular del sistema nervioso, comportamiento, entre otros. Sin embargo, también fue posible evidenciar una respuesta transcriptómica del tipo droga-específica. Dentro de los genes exclusivos para azametifós se encontró *Cuticle protein 378*, *GABAR* y *lncRNA_4239*, los exclusivos para cipermetrina *lncRNA_6719*, *lncRNA_7876* y *lncRNA_16877* y finalmente los exclusivos para deltametrina *lncRNA_532* y *lncRNA_7876*. Esta información resulta de vital importancia para la generación de nuevos métodos de evaluación de resistencia farmacológica generales y exclusivos para cada droga. Por otra parte, algunos de estos genes resultaron tener un mejor rendimiento dependiendo del sexo del individuo analizado. Estos resultados generan nuevas directrices sobre la importancia de considerar el sexo de los individuos a la hora de testear los niveles de resistencia farmacológica de una población. En síntesis, los resultados obtenidos están de acuerdo con la hipótesis inicial que plantea la existencia de una base genética para la resistencia farmacológica de *C. rogercresseyi* y que esta información genética puede ser utilizada como herramienta para la estimación de resistencia en el piojo de mar.

Se describe los valores de variabilidad genética de las tres poblaciones analizadas mediante la amplificación selectiva de mutaciones SNPs mediante la técnica de HRM. Se observa que los ejemplares de las poblaciones de Los Lagos y Aysén poseen una mayor variabilidad comparado con Magallanes. Esto puede ser inferido debido al aumento del n poblacional que existe en estas regiones comparado con la región más austral.

El presente estudio describe biomarcadores tipo SNPs para genes involucrados en la respuesta farmacológica de *C. rogercresseyi* frente a azametifós, deltametrina y cipermetrina.

3.- Evaluación de crioprotectantes (citotoxicidad) en ejemplares adultos, hembras ovígeras y sacos ovígeros. Evaluación de protocolos de criopreservación (tasa de congelación, tiempo de equilibrio y tasa de descongelación).

Antecedentes

La tecnología de criopreservación se refiere al congelamiento, almacenamiento y descongelamiento de material vivo. La criopreservación consta de siete pasos básicos: recolección de muestras, mantenimiento de muestras en una solución fisiológica, verificación de la calidad, refrigeración, congelamiento, descongelamiento y verificación de viabilidad (Tiersch and Mazik, 2000). La criopreservación o la preservación en nitrógeno líquido de células individuales, grupos celulares u organismos completos por largos periodos, requiere de la presencia de un compuesto químico que permita proteger a las células del daño provocado por la congelación. Existen diversos factores que se involucran en el éxito de la aplicación de las técnicas de criopreservación, como lo son el tipo y concentración de crioprotectante (Gwo, 2000; Tiersch et al., 1994), las tasas de congelamiento y descongelamiento (Lahnsteiner et al., 1996), el tiempo de almacenamiento (Israel et al., 1996) y la acción bacteriana (Jenkins and Tiersch, 1997). Las modificaciones a los factores antes mencionados pudieran ocasionar una gran variedad de daños celulares a causa del frío, cambios en el pH, formación de hielo intracelular y extracelular, cambios en la concentración de solutos, volumen y toxicidad del crioprotectante (Jamieson, 1991). El crioprotectante debe penetrar la célula a través de su membrana plasmática, por lo cual su eficiencia depende de 1) las características físico-químicas de esta membrana y que en gran parte están dadas por la permeabilidad de la membrana plasmática frente a dicho compuesto y 2) de la toxicidad que el crioprotector le produce una vez que ha penetrado en ella. Debido a que cada una de las células de un organismo tiene membranas plasmáticas con propiedades diferentes, cada grupo de células u órgano responde de diferente modo a los diferentes crioprotectantes. Además, cada especie responde de manera diferente a un mismo crioprotectante. Esto implica que las mismas células, pero de diferentes especies requieren de distintos crioprotectantes, distintas concentraciones y diferentes tiempos de permanencia dentro de la célula para que le provoque el menor daño posible (Taşdemir et al., 2013). En este informe se reportan los avances alcanzados hasta la fecha en torno a estandarización de protocolos de criopreservación de *Caligus*.

3. Objetivo

Evaluar toxicidad y protocolos de etanol como crioprotectante en *Caligus* adultos y sacos ovígeros.

Metodología

Siguiendo el diseño de experimento propuesto en el Informe N°1. Se realizó la evaluación de la toxicidad de Etanol, uno de los crioprotectantes propuestos. Para ello se colectaron 120 machos y 120 hembras adultas de *Caligus* del cepario del laboratorio de referencia traídos desde la Región de Los Lagos. Los *Caligus* fueron puestos en criotubos de 2 ml, 10 individuos en cada tubo, y expuestos a tres concentraciones distintas de crioprotectante (0,5, 1 y 2 M) por duplicado. Finalmente fueron congelados gradualmente desde 4°C, -20°C, ultrafreezer (equipo que mantiene las muestras a -80°C, el cual fue adquirido mediante los fondos recibidos por este proyecto) y nitrógeno líquido. Luego de dos días fueron descongelados y evaluada su capacidad de nado (Fig. 15). Similar procedimiento se realizó con sacos ovígeros cortados desde hembras maduras, colocando en cada tubo 10 sacos ovígeros, por duplicado para evaluar cada concentración de crioprotectante. Luego de dos días los sacos fueron descongelados y se evaluó la capacidad de eclosionar de estos.

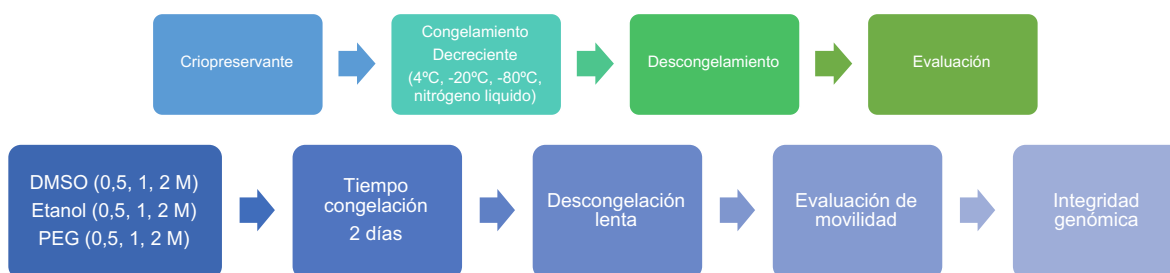


Figura 15. Diseño experimental para evaluación de toxicidad de etanol como crioprotectante de *Caligus rogercresseyi*.

Resultados

Los *Caligus* adultos, machos y hembras, expuestos a tres concentraciones de etanol, DMSO y PEG mostraron reducción en su movilidad luego de 10 minutos de exposición. La congelación de las muestras se llevó a cabo en un gradiente descendiente de temperatura para evitar shock térmico en las muestras y como consecuencia daño en los organismos. Luego de dos días de congelación en nitrógeno líquido, los *Caligus* fueron descongelados lentamente manteniendo los criotubos en hielo por 5 horas. Finalizadas las 5 horas no se observó recuperación de los individuos congelados. Adicionalmente, en las muestras de *Caligus* adultos expuestos a etanol se observó una despigmentación (Fig. 16). Adicionalmente, se probó congelar sacos ovígeros de hembras maduras. Para ello 10 sacos ovígeros fueron puestos en etanol (0.5, 1 y 2 M). Pasado 2 días de congelación en nitrógeno líquido los sacos fueron puestos en agua de mar filtrada con aireación constante para su eclosión. Los sacos puestos a las concentraciones de 1 y 2 M de etanol se deshicieron luego de un día en el agua. Aquellos sacos que fueron expuestos a 0,5 M de etanol por 10 minutos se mantuvieron íntegros por tres días sin lograr eclosionar.

Desde los ensayos de criopreservación utilizando DMSO y PEG se observó que los *Caligus* adultos mantenían su integridad morfológica, sin cambios de coloración como los expuestos a etanol. Sin embargo, no se observó recuperación de los *Caligus* luego del proceso de descongelación. Adicionalmente, los huevos de *Caligus* criopreservados en DMSO y PEG no lograron eclosionar para llegar al estado infestivo, copepodito.

Estudios previos en huevos de copépodos marinos han demostrado que es posible mantener organismos en Etanol a 4°C por no más de 10 minutos, los que luego de ese presentan capacidad de eclosionar, sin embargo, cuando los tiempos de exposición al Etanol es mayor no es posible obtener eclosión (Ohs et al., 2009). El Etanol como criopreservante también ha sido testeado en espermios de langostas, sin presentar éxito de recuperación luego de la descongelación (Fatimah et al., 2016). En el copépodo marino *Acartia tonsa*, se ha observado que es posible obtener larvas viables para eclosión luego de ser mantenidas por hasta 26 minutos a 4°C en concentraciones de DMSO no mayores a 2 M (Ohs et al., 2009). Sin embargo, en los ensayos realizados en *Caligus* adultos y huevos no mostraron ser viables luego del periodo de criopreservación evaluado.

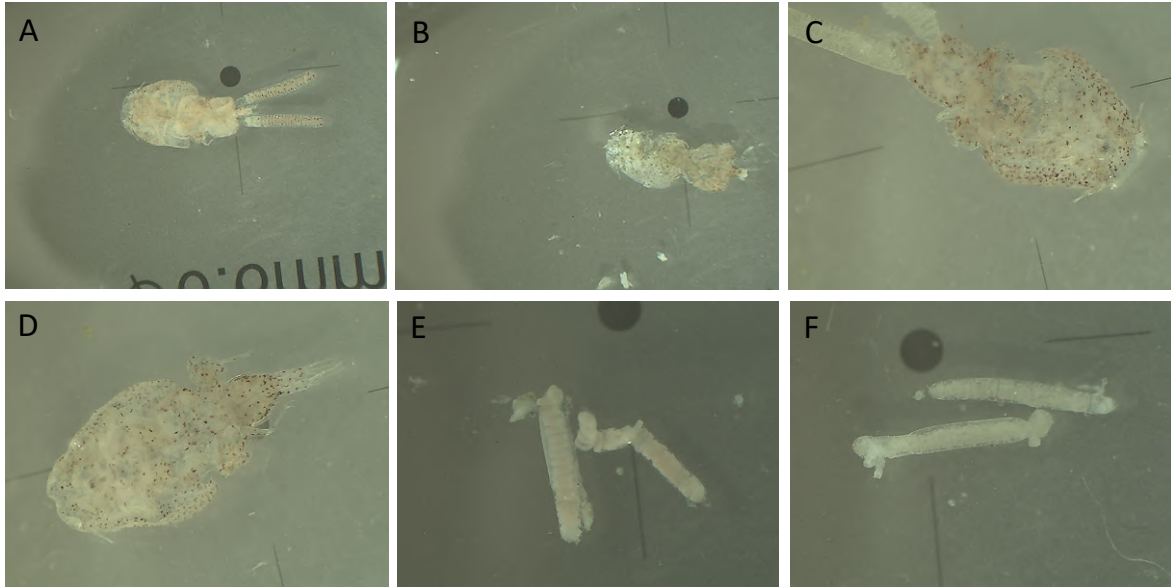


Figura 16. Efectos fenotípicos observados en *Caligus* expuestos a distintos criopreservantes. A-C hembras de *Caligus* preservadas en DMSO, PEG, Etanol, respectivamente. D: macho de *Caligus* criopreservado en Etanol. E-F: sacos ovígeros de hembras de *Caligus* expuestos a criopreservantes.

Conclusión

Es necesario tener en cuenta que el objetivo de este proyecto es criopreservar por largos periodos de tiempo muestras de *C. rogercresseyi*, es por ello que se incluyó una etapa de congelación de las muestras de dos días. Sin embargo, ninguno de los ensayos evaluados mostró que fuera viable la criopreservación de *Caligus*. Por otra parte, se debe considerar para el futuro, si se lograra criopreservar *Caligus*, que es necesario contar con un sistema de congelación con suministro constante de nitrógeno líquido lo que encarecería la mantención de estos copépodos por esta vía. Por el momento, la mejor forma de mantener cepas de *Caligus* es manteniendo peces infectados constantemente e ir renovando la genética de cada cepa mediante campañas que recolección de hembras cada 6-12 meses.

Las actividades asociadas a los experimentos de criopreservación (enumeradas a continuación) no pudieron ser realizadas debido a la inviabilidad de las muestras luego de los procesos de congelación.

- Evaluación de integridad genómica mediante ensayo cometa de célula única.
- Evaluación de integridad genómica mediante marcadores moleculares.

4.- Análisis datos de cargas de *Caligus rogercresseyi* asociadas a tratamientos antiparasitarios por inmersión utilizados en Los Lagos y Aysén durante 2015, 2016 y 2017

Antecedentes

Desde su aparición como un patógeno de importancia para la salmonicultura en Chile, el control del *Caligus rogercresseyi* se ha basado casi exclusivamente en el uso de agentes farmacológicos. El uso extensivo de estas drogas durante años ha tenido como consecuencia la aparición de poblaciones de *C. rogercresseyi* resistentes al benzoato de emamectina (EMB). En la actualidad existen numerosos antecedentes que sugieren la disminución de la sensibilidad de los parásitos a los piretroides sintéticos deltametrina y cipermetrina en varias zonas de Los Lagos y Aysén. Se desconoce cuál es el estado de sensibilidad del parásito al organofosforado azametifos, la droga más utilizada en la actualidad.

La evaluación del desempeño de los tratamientos antiparasitarios en base a información de campo debe tomarse en cuenta como primer antecedente en el estudio de la sensibilidad de los piojos a las drogas. En este contexto, desde 2012 Sernapesca solicita información de campo de 4 jaulas para cada tratamiento antiparasitario que se realice con el objeto de evaluar la eficacia de tratamientos (Informe post-tratamiento – IPT).

El objetivo general de este estudio fue analizar los datos sobre uso y eficacia de tratamientos antiparasitarios contra *Caligus rogercresseyi* reportados por medio del IPT entre 2015 y 2017.

Objetivos

- Analizar frecuencia y uso de drogas antiparasitarias sobre *C. rogercresseyi*.
- Analizar el desempeño de drogas antiparasitarias sobre *C. rogercresseyi*.
- Generar mapas de riesgo basados en el desempeño de drogas antiparasitarias sobre *C. rogercresseyi*.
- Modelar desempeño de drogas antiparasitarias por inmersión.

Materiales y métodos

La data utilizada en este estudio corresponde a información generada en el marco del Programa Sanitario Específico de Vigilancia y Control de Caligidosis, coordinado por Sernapesca, en particular los Informes post-tratamiento (IPT). El IPT es un informe requerido por cada tratamiento antiparasitario realizado en Chile en el que se reportan las cargas parasitarias pre- (1 día antes) y post-tratamiento (3 días después) de cuatro jaulas, con el objeto de evaluar la eficacia del procedimiento.

La información del IPT se nos suministró en forma tabulada. Para los datos IPT del 2016 y 2017 se proporcionaron las cargas pre- y post-tratamiento tanto de estadios juveniles como adultos (adultos móviles + hembras ovígeras), sin embargo, los datos de 2015 contaban sólo con las cargas de individuos adultos.

Como primera actividad, la data fue sometida a una revisión para identificar observaciones con errores de tipeo y/o duplicaciones, las que fueron corregidas/omitidas antes de realizar los análisis.

1.1. Frecuencia y uso de tratamientos antiparasitarios

Para los análisis relativos a la frecuencia y uso de tratamientos antiparasitarios, consideramos los tratamientos presentes en los registros IPT como todos los tratamientos antiparasitarios registrados en Chile entre 2015 y 2017. A modo descriptivo se calculó el número de tratamientos reportados por droga, por especie de salmón tratada, por método de aplicación, por ACS y el promedio de tratamientos por centro. Del mismo modo, se construyeron mapas que muestran la intensidad de uso de cada droga para 2015, 2016 y 2017.

Eficacia de los tratamientos antiparasitarios

Con los registros de las cargas pre- y post-tratamiento se calculó la eficacia a nivel de jaula, expresada como la reducción porcentual de la carga parasitaria con respecto a la carga inicial. En concreto, la eficacia (E) para el tratamiento i en la jaula j fue calculada del siguiente modo:

$$E_{ij} = \frac{CI_{ij} - CF_{ij}}{CI_{ij}}$$

Donde CI_{ij} y CF_{ij} corresponden a la carga inicial y la carga final, respectivamente, asociada al tratamiento i aplicado en la jaula j .

La información sobre eficacia fue analizada por medio de histogramas y estadísticos descriptivos tales como la media ($\bar{x}$), mediana, desviación estándar (σ), coeficiente de variación ($C_v = \frac{\sigma}{\bar{x}}$) y rango (mínimo y máximo), para cada droga antiparasitaria, a nivel general, por macrozona y por ACS. Los valores negativos de eficacia (cuando $CF > CI$) fueron excluidos del cálculo de los estadísticos para evitar influencias desmedidas.

Con el objeto de facilitar la presentación de resultados, en algunos casos las eficacias de tratamiento fueron categorizadas en 4 grupos de acuerdo a su valor porcentual: i) eficacia negativa: $< 0\%$; ii) baja eficacia: $\geq 0\%$ a $< 50\%$; iii) eficacia intermedia: $\geq 50\%$ a $< 90\%$; y iv) alta eficacia o tratamiento exitoso: $\geq 90\%$. La frecuencia relativa de cada categoría de eficacia fue presentada a nivel de droga y ACS por medio de gráficos de barra apilada.

Por otro lado, para evaluar la distribución espacial y temporal del desempeño de las drogas, se construyeron *heatmaps* presentando la eficacia promedio trimestral por ACS. Para evaluar el rol de las empresas en la aplicación de los tratamientos se realizaron *heatmaps* con la proporción de tratamientos efectivos ($\geq 90\%$ eficacia) por empresa y ACS para las drogas más utilizadas. Finalmente, para evaluar si el uso reiterado de una droga afecta posteriormente la eficacia de esta, se hicieron gráficos de asociación entre el número de tratamientos por droga en cada centro desde 2015 hasta 2017 y la eficacia de cada droga durante 2017. En la Figura 1A del anexo se presenta la ubicación y nomenclatura de las ACS.

Mapas de riesgo basado en eficacia de drogas

El objetivo de los mapas de riesgo fue presentar de manera gráfica la variabilidad espacial de la eficacia de tratamiento para cada droga. Estos mapas podrán ayudar a la autoridad y otros tomadores de decisiones a identificar las áreas con mayores problemas y explorar las posibles causas de bajas eficacias de tratamiento. La identificación de las áreas (ACS) con mejores y peores eficacias es un paso fundamental para identificar centros con una alta probabilidad de tener piojos ya sea sensibles o tolerantes a estas drogas, lo que, a su vez, es necesario para llevar a cabo cualquier investigación que busque identificar marcadores genéticos de resistencia en *C. rogercresseyi*.

Se construyeron mapas de riesgo para azametifós, deltametrina y cipermetrina. Para ello se calculó un estadístico que resumiera la eficacia de tratamientos por ACS. En este caso se optó por utilizar la mediana ya que presentó un mejor contraste visual que otra medida de resumen. Para una mejor visualización de la variabilidad geográfica de la eficacia, las medianas por ACS fueron categorizadas de la siguiente manera: $< 50\%$; $\geq 50\%$ a $< 90\%$; $\geq 90\%$ a $< 95\%$; y $\geq 95\%$.

Modelamiento de la eficacia de tratamientos

El modelamiento del desempeño de tratamientos antiparasitarios contra *C. rogercresseyi* es una tarea especialmente complicada dado que deben considerarse dos mediciones de cargas parasitarias (abundancias pre- y post-tratamiento). La forma más simple de lidiar con este desafío ha sido establecer la carga post-tratamiento como la variable dependiente y la carga pre-

tratamiento como una de las variables independientes de una regresión. Esta aproximación se ha utilizado ampliamente en los últimos años para modelar el desempeño de drogas antiparasitarias sobre *C. rogercresseyi* (Arriagada et al., 2014, 2017, 2018; Arriagada & Marín, 2018; Jiménez et al., 2018) y *Lepeophtheirus salmonis* (Jones et al., 2012; Lees et al. 2008).

Un problema de esta aproximación es que no permite modelar la eficacia directamente como una proporción (limitada entre 0 y 1), que es la forma más común de expresar (y de entender) el desempeño de una droga. Probablemente no se ha modelado la eficacia de tratamiento como tal, ya que supone salirse de las distribuciones de probabilidades habituales en biología (Normal, Poisson, Binomial Negativa), y obliga adentrarse en distribuciones menos comunes y complejas como la distribución Beta. Esta distribución es de naturaleza continua y limitada en el intervalo 0 y 1. La distribución Beta se ha utilizado en epidemiología para modelar sensibilidad, especificidad y prevalencia, pero hasta ahora no se había empleado en el modelamiento de eficacia de tratamientos. La distribución Beta es sumamente flexible, pudiendo adoptar diferentes formas para ajustarse a los datos (Fig. 17). En nuestro caso, la eficacia es una variable fuertemente asimétrica, la que puede ser modelada adecuadamente con una distribución Beta.

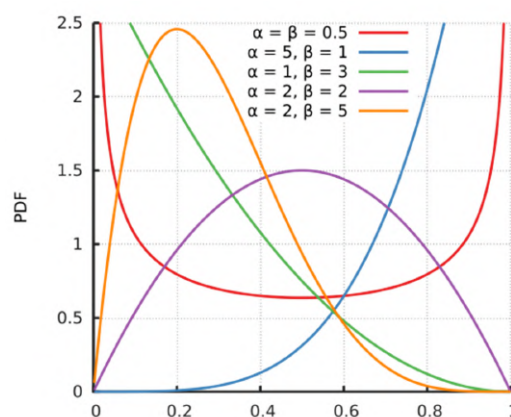


Figura 17. Flexibilidad de la distribución Beta.

Teniendo en cuenta que la aplicación de la distribución Beta a la evaluación del desempeño de tratamientos antiparasitarios es una aproximación totalmente novedosa, en este estudio construimos un modelo considerando los siguientes predictores: peso promedio, droga (azametifós (ref.), deltametrina, cipermentrina), método (lona (ref.), wellboat), especie (trucha, salar (ref.)), región (X (ref.), XI), carga de adultos pre-tratamiento, y año (2016 (ref.), 2017). La formulación del modelo se detalla a continuación:

$$\text{logit}(\mu_i) = \beta_0 + \beta_1 \text{pesogr}_i + \beta_2 \text{tratCiper}_i + \beta_3 \text{tratDelta}_i + \beta_4 \text{metWellb}_i + \beta_5 \text{espTrucha}_i + \beta_6 \text{regXI}_i + \beta_7 \text{atpre}_i + \beta_8 \text{año17}_i$$

Donde:

μ_i : eficacia observada (E_{ij})

pesogr: Peso del pez en gramos

tratCiper: Igual a 1 si el tratamiento es Cipermentrina, igual a cero si no.

tratDelta: Igual a 1 si el tratamiento es Deltametrina, igual a cero si no.

metWellb: Igual a 1 si el método es Wellboat, igual a cero si no.

espTrucha: Igual a 1 si la especie es Trucha, igual a cero si no.

regXI: Igual a 1 si la Región en que se aplicó el tratamiento es la XI, igual a cero si no.

atpre: Promedio de parásitos en estado "adulto" antes del tratamiento.

año17: Igual a 1 si el año en que se aplicó el tratamiento es el 2017, igual a cero si no.

Es necesario hacer hincapié en que la aplicación de la regresión Beta a los objetivos de evaluar eficacia de tratamientos se encuentran **aún en desarrollo**, faltando incorporar elementos como inflación en 1 y efectos aleatorios, por lo que sus **resultados deben ser tomados con cautela**.

Resultados

Número de centros, tratamientos y jaulas participantes

Durante 2015, 2016 y 2017 se reportó la información de 3.157 tratamientos antiparasitarios realizados a nivel de centro, en 392 centros de cultivo de Los Lagos y Aysén. El número total de jaulas reportadas fue de 12.921. Sin embargo, 410 (3.17%) de estas jaulas correspondía a información duplicada. Así, el número final de tratamientos antiparasitarios reportados a nivel jaula fue de 12.511. De este número, en 93 casos la información no fue registrada de manera correcta, obteniendo un total de 12.418 jaulas tratadas con información válida. En 9.667 (77.85%) de ellas la droga de elección fue azametifos, en 2.087 (16.80%) se administró deltametrina, mientras que en 616 (4.96%) se aplicó cipermetrina. Por otro lado, sólo en 19 (0.15%) jaulas se usó peróxido de hidrógeno como principio activo y en 3 se aplicó agua dulce, mientras que en 14 jaulas (0.11%) se aplicó un tratamiento térmico.

Desde 2015 a 2017 en las regiones de Los Lagos y Aysén cada centro fue tratado en promedio (Tabla 6) entre 1.09 y 2.74 veces por año con azametifos, entre 0.24 y 0.57 veces con deltametrina y entre 0.02 y 0.29 veces por año con cipermetrina. En el caso de cipermetrina se observa una clara disminución del número de tratamientos por centro entre 2015 y 2017.

En 11.316 (91.13%) de las jaulas reportadas, el tratamiento fue aplicado para tratar salmón del Atlántico, mientras que en 1.092 (8.79%) ocasiones fue para trucha arcoíris y en 10 (0.08%) de las jaulas se reportó salmón del Atlántico y trucha arcoíris simultáneamente. En 12.278 jaulas reportadas (98.9%), el método de tratamiento fue la lona cerrada y en 122 (1%) fue wellboat y en 14 jaulas (0.1%) el tratamiento fue térmico.

Tabla 6. Número promedio de tratamientos por centro con azametifos, deltametrina y cipermetrina durante los años 2015, 2016 y 2017 en las regiones de Los Lagos y Aysén.

Droga	Año	Los Lagos	Aysén	Total
Azametifós	2015	2.74	2.29	2.46
	2016	1.09	2.36	1.86
	2017	2.34	1.65	1.91
Deltametrina	2015	0.49	0.46	0.47
	2016	0.24	0.56	0.44
	2017	0.57	0.38	0.46
Cipermetrina	2015	0.28	0.29	0.28
	2016	0.08	0.11	0.10
	2017	0.03	0.02	0.02

El número de tratamientos a nivel de centro por ACS con azametifos, deltametrina y cipermetrina se presentan en la tabla 1A del anexo. También los Anexos se presentan mapas con la intensidad de uso (número de tratamientos) por año, para cada una de las drogas (Fig. 2A).

En general, la intensidad de uso presentó una fuerte variación geográfica y a través de los años. Azametifós fue usado intensamente durante 2015 en prácticamente todas las áreas de cultivo, alcanzando una media que rondó los 2,5 tratamientos por centro en promedio. En 2016, esta droga fue usada con mayor intensidad en la región de Aysén, pero en 2017, se aplicó con mayor frecuencia en la región de Los Lagos, en particular en la parte central de la isla de Chiloé.

La deltametrina presentó un patrón geográfico similar al de azametifós, pero menos marcado. Es así que en 2015 deltametrina se usó intensamente en zonas particulares de ambas regiones, como fueron prácticamente todo Chiloé en Los Lagos y la zona oceánica sur de Aysén. En 2016, el uso de deltametrina en Aysén duplicó el uso en Los Lagos, mientras que en 2017 esta tendencia se

invirtió en favor de Los Lagos, con Chiloé central el área con mayor intensidad de uso de esta droga.

El patrón de uso de cipermetrina fue bastante diferente al de las otras dos drogas ya que se usó prácticamente en todas las áreas de cultivo en 2015, pero en 2016 y 2017 su uso fue muy marginal.

Eficacia de tratamiento

La carga parasitaria antes del tratamiento promedió 9.83 caligus adultos por pez, con una mediana de 7.7, DE de 8.26 y un rango entre 0 y 141.6 piojos. En el caso de la carga post-tratamiento, la media fue de 0.80, mediana de 0.1, DE de 2.00 y rango entre 0.0 y 69.1 piojos adultos por pez.

Descontando los casos en que no se informaron las cargas parasitarias y otros en que la eficacia arrojó valores indeterminados por presentar cargas iniciales iguales a cero, se calculó la eficacia de tratamiento para 12.418 jaulas. Considerando sólo valores mayores o iguales a cero (n=12.330), la eficacia media alcanzó un 90.45%; la mediana fue de 97.56% y la DE 16.01%. El rango fluctuó entre -700 y 100% (Fig. 18).

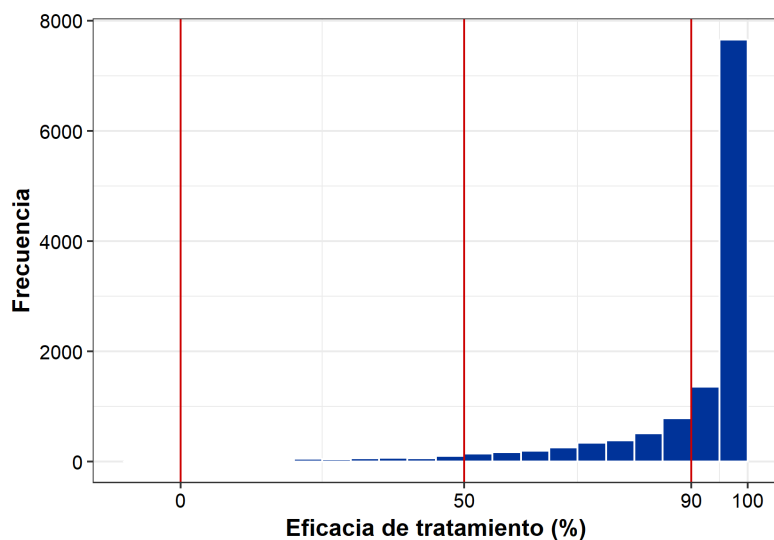


Figura 18. Distribución de eficacias de tratamiento para procedimientos realizados en Los Lagos y Aysén desde 2015 a 2017 (Todos las drogas/tipos de tratamientos). Líneas rojas demarcan 4 categorías de eficacia de tratamiento.

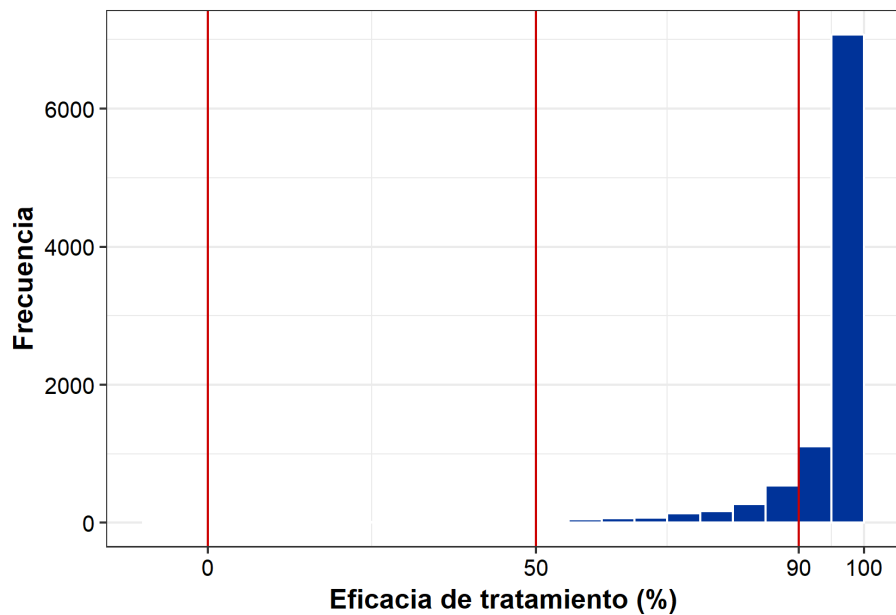


Figura 19. Distribución de eficacias de tratamientos con azametifos realizados en Los Lagos y Aysén desde 2015 a 2017. Líneas rojas demarcan 4 categorías de eficacia de tratamiento.

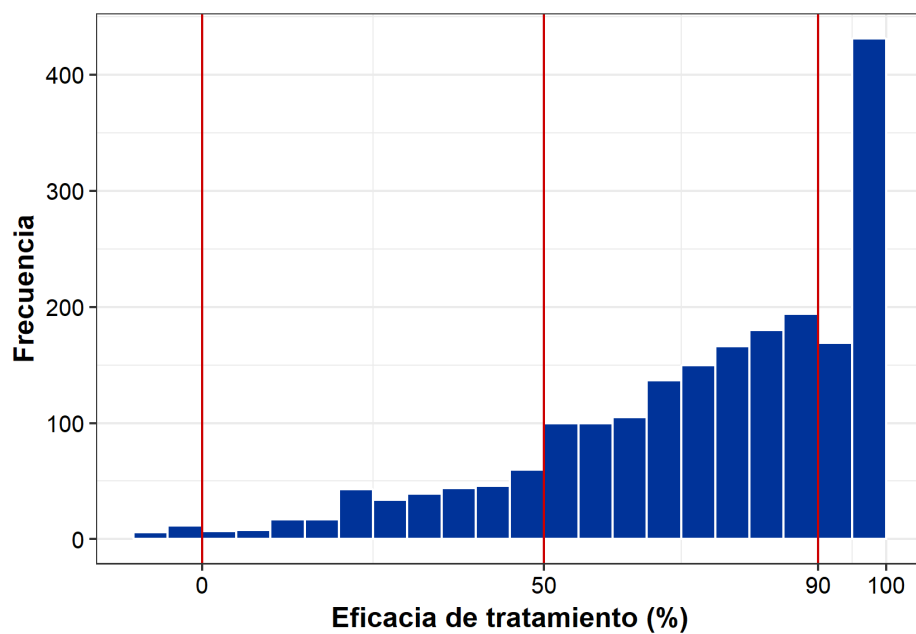


Figura 20. Distribución de eficacias de tratamientos con deltametrina realizados en Los Lagos y Aysén desde 2015 a 2017. Líneas rojas demarcan 4 categorías de eficacia de tratamiento.

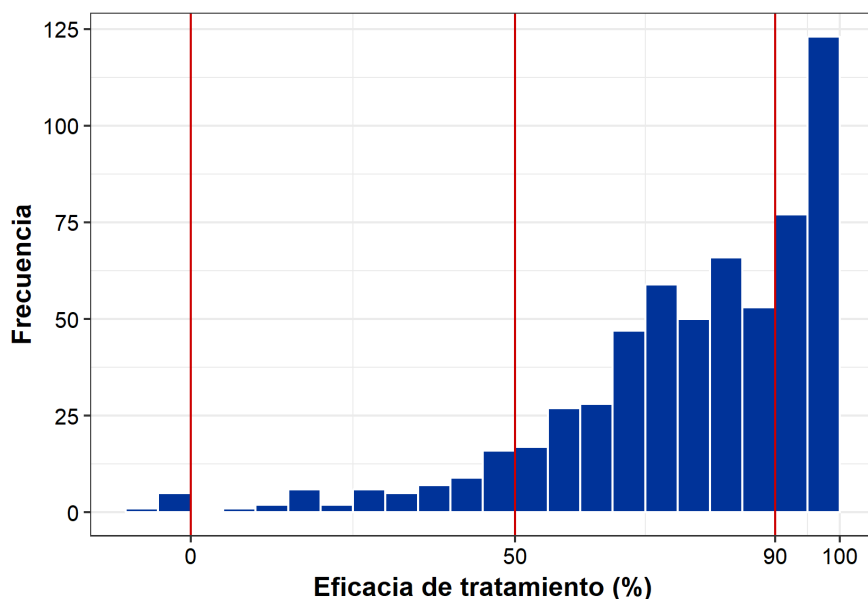


Figura 21. Distribución de eficacias de tratamientos con cipermetrina realizados en Los Lagos y Aysén desde 2015 a 2017. Líneas rojas demarcan 4 categorías de eficacia de tratamiento.

Cuando se evaluaron las eficacias de acuerdo a la droga utilizada (Figs. 19-21), se pudo apreciar diferencias importantes. La eficacia de los tratamientos en que se utilizó azametifos fue relativamente alta, alcanzando una media de 93.41%. Un 84.77% de los tratamientos llevados a cabo con esta droga (Fig. 21) logró una eficacia mayor o igual al 90%, lo que puede considerarse como un tratamiento exitoso. Esto lo convierte en el antiparasitario más eficaz en la actualidad. Es importante señalar que, a pesar de la gran cantidad de tratamientos con azametifos ($n=9.667$), la dispersión de los valores de eficacia fue relativamente baja ($DE=12.94$; $CV=0.14$), sugiriendo que la mayoría de los casos las eficacias estuvieron muy cercanas al promedio.

En el caso de tratamientos con piretroides, las eficacias fueron generalmente menores que con azametifos. La eficacia media de los tratamientos realizados con deltametrina fue de 71.50%, mientras que el porcentaje de tratamientos exitosos ($\geq 90\%$ de eficacia) fue de 28.9%. Los tratamientos llevados a cabo con cipermetrina presentaron un desempeño ligeramente superior a deltametrina. En este grupo de tratamientos, la eficacia media alcanzó un 74.03% y el porcentaje de procedimientos exitosos fue de 32.79% (Fig. 22). Tanto para deltametrina como para cipermetrina la dispersión de las eficacias fue relativamente alta ($CV=0.40$ y 0.54 , respectivamente) indicando que, en general, los resultados de estos tratamientos no fueron muy consistentes entre las jaulas, centros de cultivo y/o el tiempo.

Las jaulas tratadas con peróxido de hidrógeno y tratamiento térmico lograron muy buenas eficacias, con una media de 90.74% y 96.9% respectivamente. Sin embargo, su bajo número ($n=19$ y $n=14$) sugiere que estos resultados deben ser tomados con precaución.

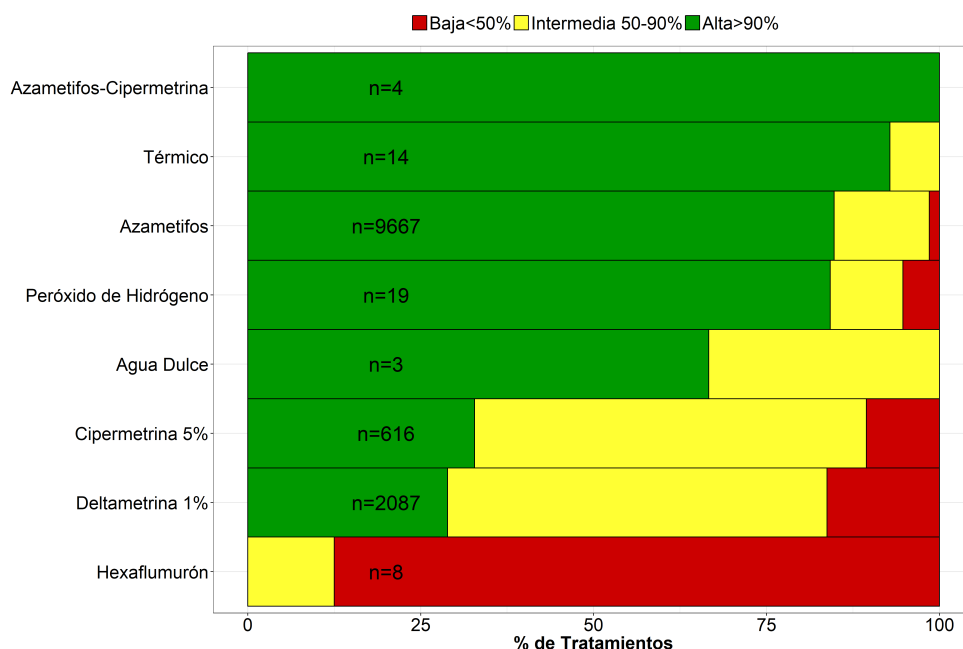


Figura 22. Drogas/tipo de tratamientos reportados entre 2015 y 2017 por categorías de eficacia de tratamiento y número de procedimientos.

Las eficacias de tratamiento para cada una de las drogas evaluadas presentan diferentes patrones entre regiones y ACSs (Figs. 23 y 8). En todas las ACSs de la región de Los Lagos, la gran mayoría de los tratamientos llevados a cabo con azametifos (Fig. 23, panel izquierdo) arrojó eficacias iguales o superiores al 90%. Destaca en este grupo la ACS 3a con un 100% de los tratamientos en esta categoría. El ACS con los peores resultados para azametifos en Los Lagos fue la 15, con un 25% de tratamientos con resultados menores al 50% de eficacia y todas las eficacias menores al 90%. En Aysén, la situación para azametifos fue similar (Fig. 24, panel izquierdo), destacando las ACS 23c, 27 y 18a como las que acumulan más tratamientos fallidos (~25%).

La situación para los tratamientos con piretroides es diferente a la de azametifos. En casi todas las ACSs de la región de Los Lagos la mayoría de los tratamientos realizados con deltametrina (Fig. 23, panel central) presentó una eficacia intermedia. Los peores resultados en la región fueron observados en las ACSs 2, 9a, 17b y, por la gran cantidad de tratamientos, las ACSs 10a, 10b y 11. En Aysén la variabilidad de la eficacia de deltametrina fue importante, variando el porcentaje de tratamientos exitosos entre 100% (ACS 28c) y menor al 5% (ACS 27) (Fig. 24, panel central).

Similar a la situación de deltametrina en Los Lagos, la mayor parte de los tratamientos llevados a cabo con cipermetrina resultaron con eficacias menores al 90% en casi todas las ACS de la región de Los Lagos (Fig. 23 panel derecho). Sin embargo, destacan 3 áreas donde se registró una alta proporción de eficacias mayores al 90%, que corresponden a las ACSs 9c y 12b con un 100% de los tratamientos en este grupo y la ACS 2 con un 60%. En la región de Aysén (Fig. 24, panel derecho) se registraron eficacias altas en al menos 50% de los tratamientos realizados con cipermetrina en 8 de las 23 ACSs. Sin embargo, también se observaron ACSs con eficacias consistentemente bajas como la 23a y 18d.

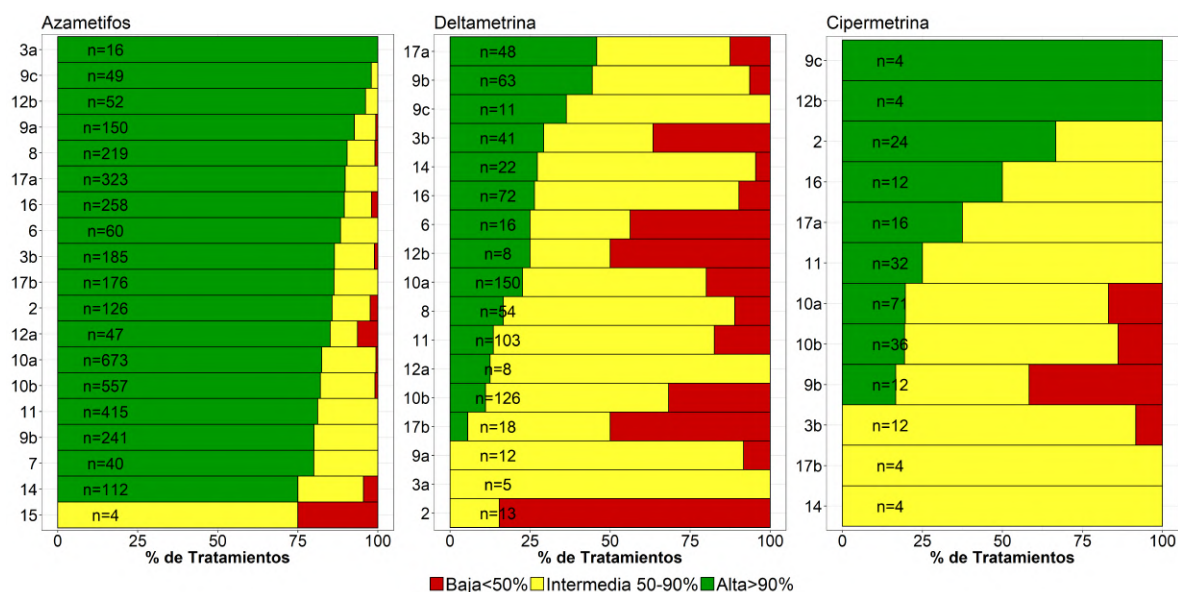


Figura 23. Categorías de eficacia de tratamientos a nivel ACS para tratamientos antiparasitarios llevados a cabo con azametifos, deltametrina y cipermetrina en la región de Los Lagos desde 2015 a 2017. Se indica el número de procedimientos reportados a nivel de jaula por ACS (n).

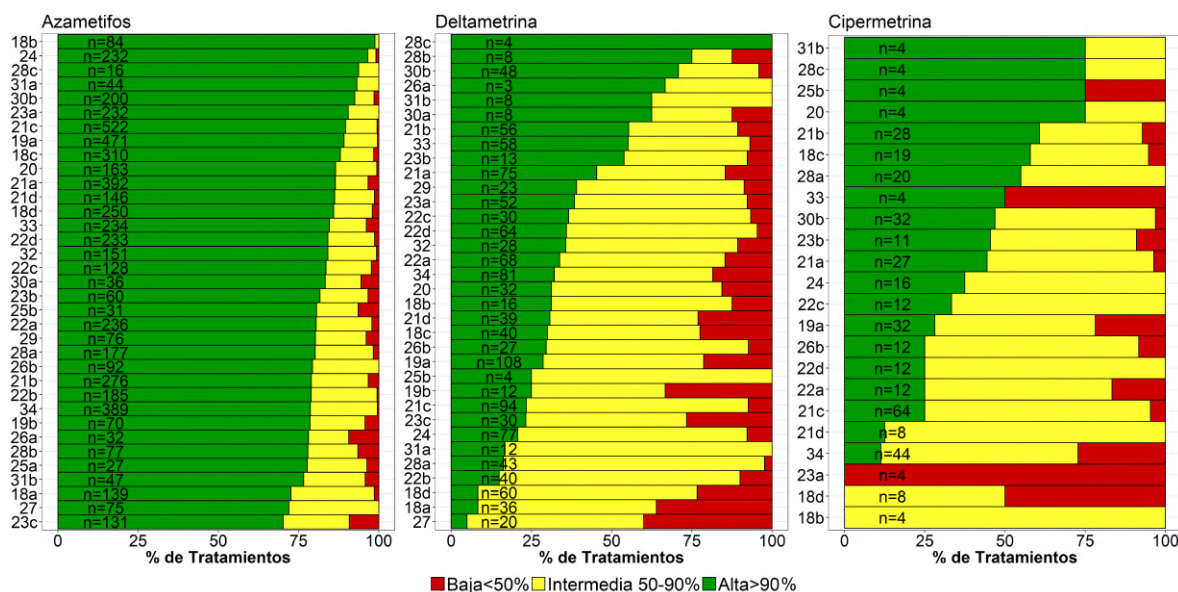


Figura 24. Categorías de eficacia de tratamientos a nivel ACS para tratamientos antiparasitarios llevados a cabo con azametifos, deltametrina y cipermetrina en la región de Aysén desde 2015 a 2017. Se indica el número de procedimientos reportados a nivel de jaula por ACS (n).

Los estadísticos descriptivos de eficacia para azametifos, deltametrina y cipermetrina para cada ACS se presentan en las Tablas 2A, 3A y 4A en el anexo.

En la Figura 25 se presentan *heatmaps* con la variación espacial y temporal de azametifos y deltametrina, las dos drogas más utilizadas entre 2015 y 2016. En el caso de azametifos (Fig. 9 izquierda), se observan principalmente eficacias promedio mayores al 85% con algunas excepciones como las ACS 14, 15, 23c y 31b. Sin embargo, durante el año 2016 se observó un patrón espacial diferente en la región de Aysén donde las eficacias promedio disminuyeron en relación a los años 2015 y 2017. En esta figura no se observó ningún patrón temporal que pueda sugerir un aumento de la tolerancia a azametifos. Deltametrina presentó un desempeño menor a

azametifós en todas las ACSs (Fig. 25 derecha). Por otro lado, deltametrina registró eficacias promedio superiores en la región de Aysén respecto de Los Lagos y se observó que durante el año 2016 las eficacias medias fueron superiores a las registradas durante 2015 y 2017.

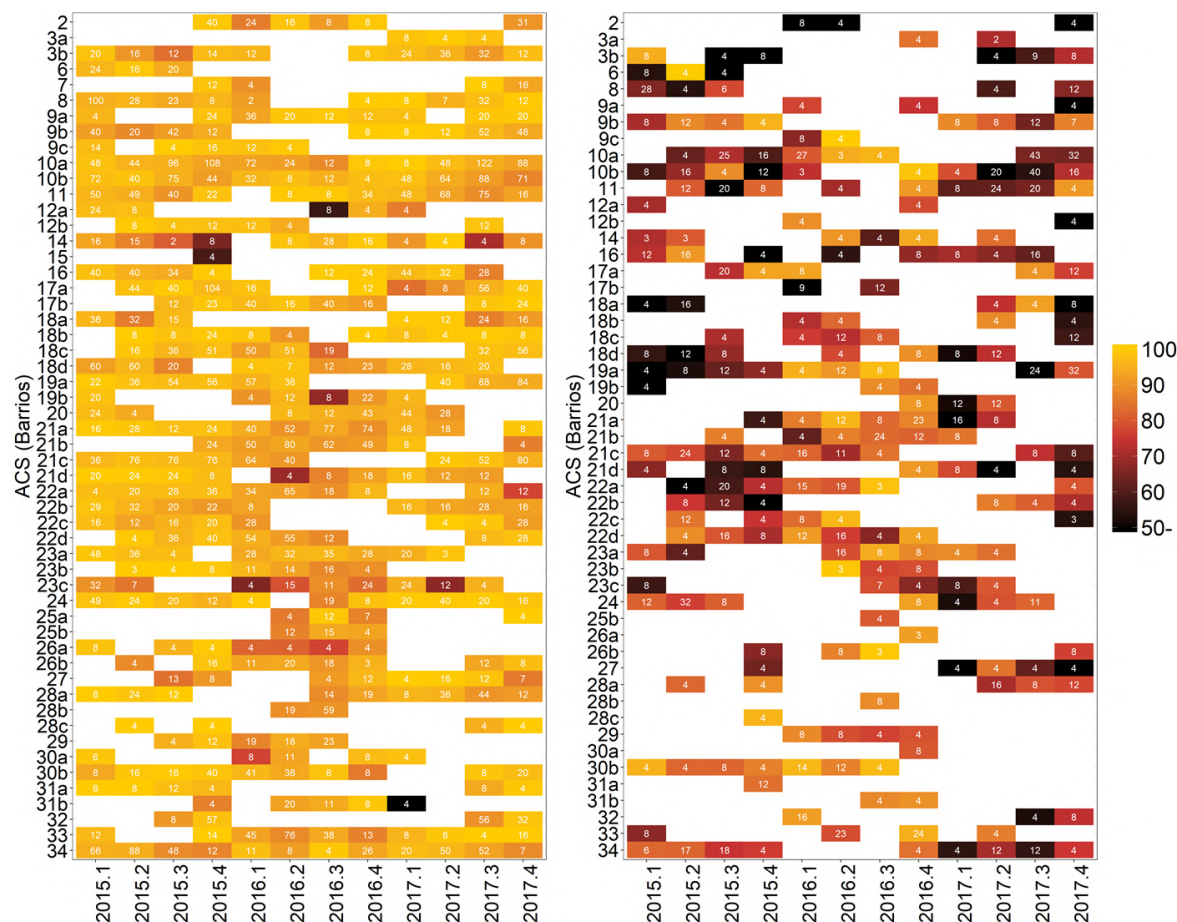


Figura 25. Eficacias medias de tratamientos realizados con azametifós (izquierda) y deltametrina (derecha) en cada ACS por trimestre durante 2015, 2016 y 2017. Dentro de cada casilla se indica el número de procedimientos reportados a nivel de jaula durante el período por ACS (n).

Cuando se evalúa la eficacia por ACS y empresa emergen patrones interesantes (Figs. 10 y 11). Por ejemplo, existen ACSs con centros de varias empresas donde la eficacia de tratamientos con una droga en particular presenta fuertes diferencias entre empresas. Bajo el supuesto que de haber piojos resistentes estos se deberían distribuir por toda la ACS, este patrón sugiere que las diferencias observadas en el desempeño de la droga podrían deberse a diferencias en los procedimientos de baño. Este es el caso de la ACS 11 se observa una gran proporción de tratamientos exitosos con azametifós (Fig. 26), pero también se observan algunos centros que presenta una alta proporción de tratamientos fallidos en el barrio 17^a.

Otros patrones interesantes son aquellos que muestran empresas que, a pesar de tener centros en diferentes (y en ocasiones muy distantes áreas), presentan resultados consistentemente buenos o malos. En el grupo de empresas consistentemente buenas con azametifós destaca centro 20, 13, y en menor medida 22 y 16 (Fig. 26). Para el caso de deltametrina, 22 es la empresa con resultados consistentemente mejores (Fig. 27). Por el contrario, 15 es una empresa que destaca por tener en general malos resultados con azametifós en las tres ACSs (10a, 10b y 11) donde tiene centros, áreas donde otras empresas presentan mucho mejores resultados con la misma droga (Fig. 10).

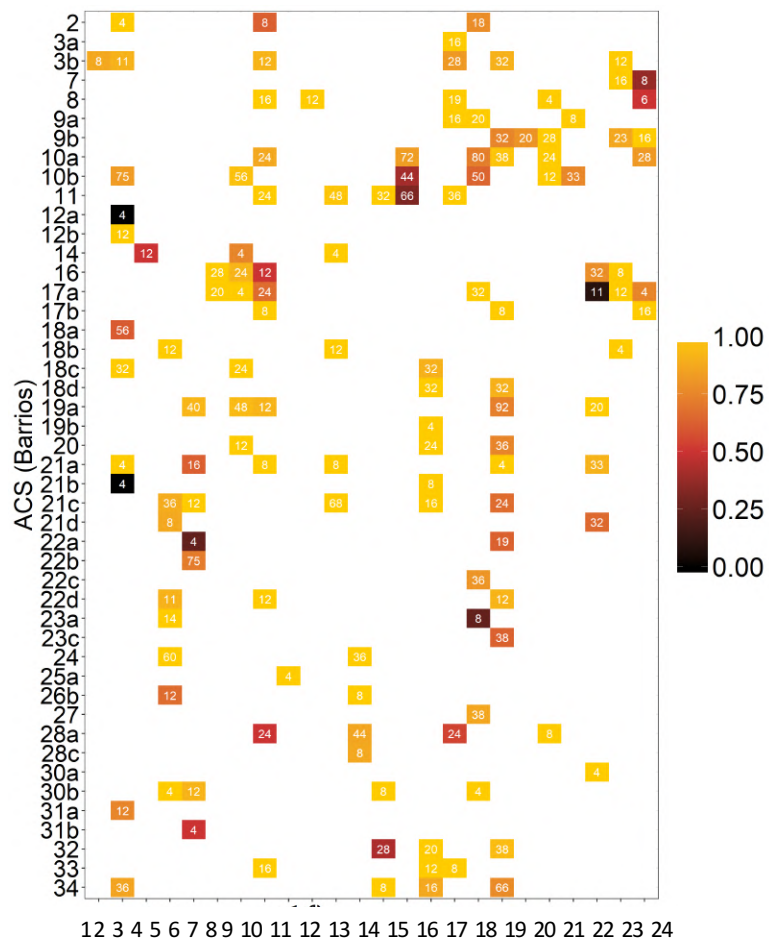


Figura 26. Proporción de eficacias mayores al 90% de tratamientos con azametifós a nivel de jaula por empresa en las regiones de Los Lagos y Aysén desde 2015 a 2017. Dentro de cada casilla se indica el número de procedimientos reportados a nivel de jaula durante el período por ACS (n).

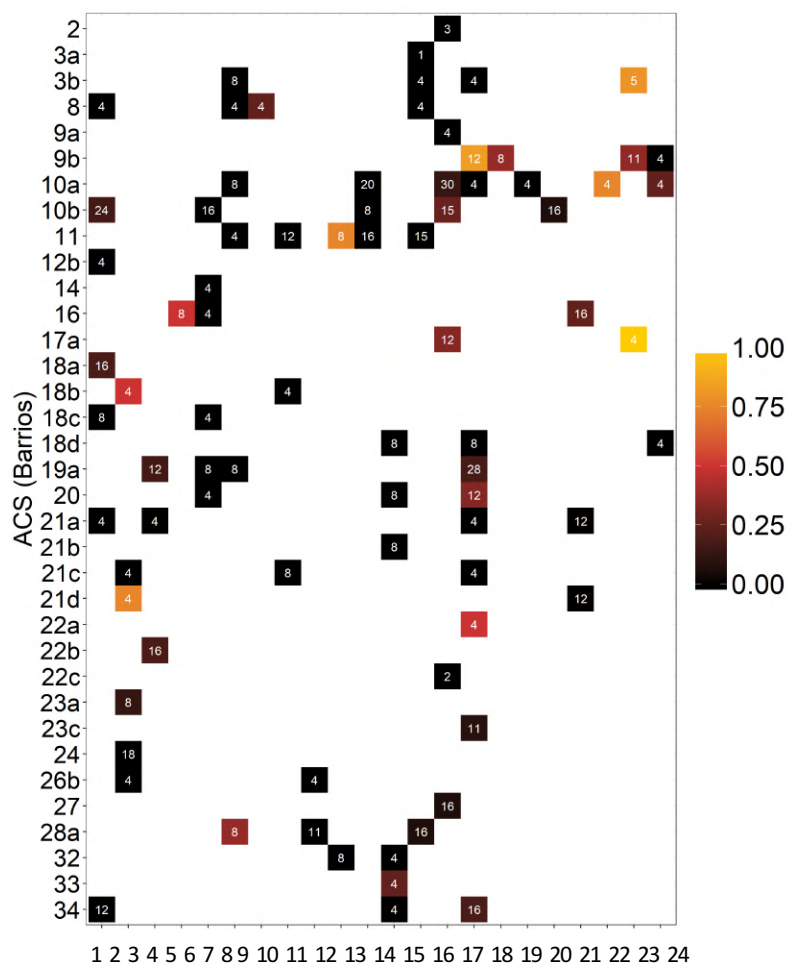


Figura 27. Proporción de eficacias mayores al 90% de tratamientos con deltametrina a nivel de jaula por empresa en las regiones de Los Lagos y Aysén desde 2015 a 2017. Dentro de cada casilla se indica el número de procedimientos reportados a nivel de jaula durante el período por ACS (n).

Los gráficos de asociación entre el número de tratamientos con azametifos y deltametrina por centro en los últimos tres años versus la eficacia de estas drogas por centro en el último año muestran una asociación negativa en el caso de azametifos (Fig. 28) y una asociación positiva para deltametrina (Fig. 29). Para el caso de azametifos esto sugiere que a medida que los centros tratan más, el desempeño de la droga se empeora. En el caso de deltametrina, esta asociación sería a la inversa, es decir, mientras más se usa la droga, mejor desempeño tiene. Esta diferencia puede deberse al tiempo que llevan estas drogas en el mercado y, por consiguiente, al diferente nivel de sensibilidad de *C. rogercresseyi* frente a estas drogas en la actualidad.

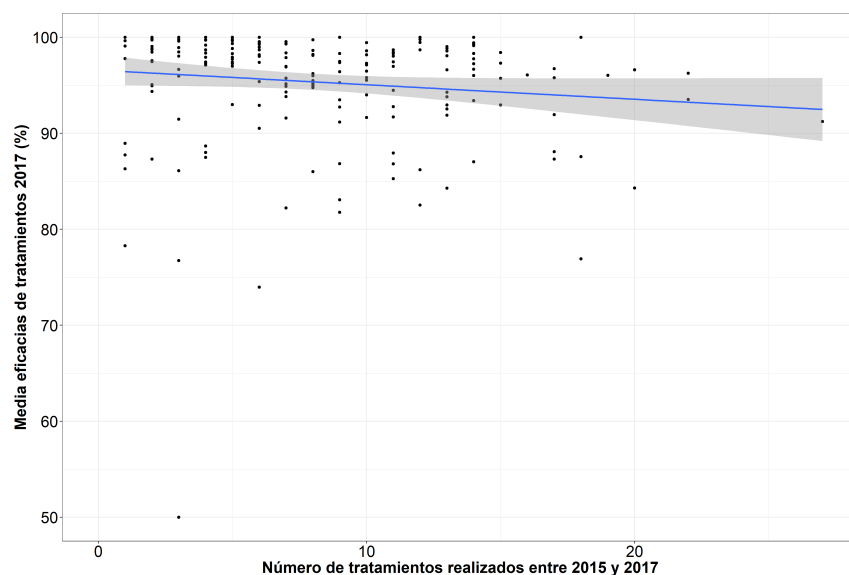


Figura 28. Eficacia media de tratamientos con azametifos durante 2017 vs número de tratamientos realizados con azametifos entre 2015 y 2017. Datos calculados a nivel de centro.

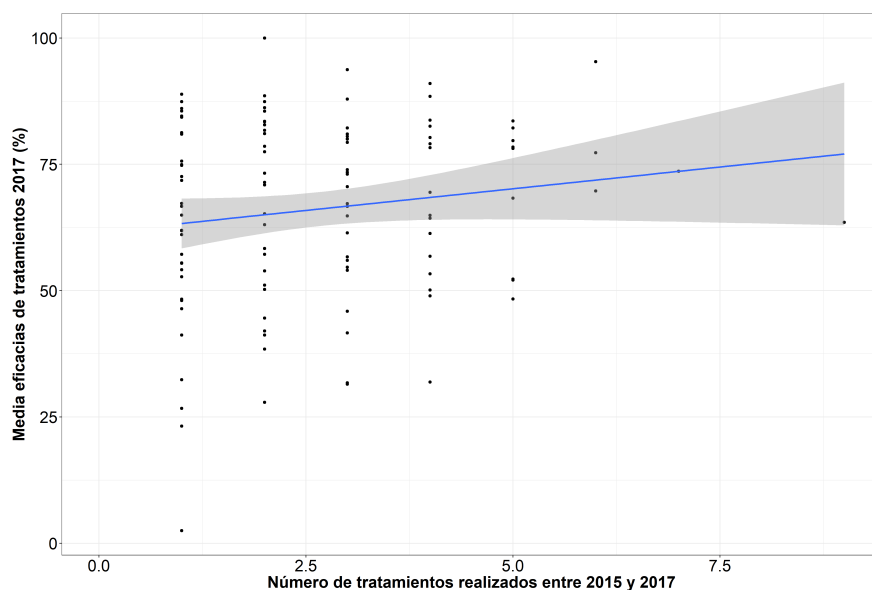


Figura 29. Eficacia media de tratamientos con deltametrina durante 2017 vs número de tratamientos realizados con deltametrina entre 2015 y 2017. Datos calculados a nivel de centro.

Mapas de riesgo (año 2017)

Los mapas de riesgo muestran una importante variabilidad espacial del desempeño de drogas durante 2017. Para el caso de azametifós, en general, el desempeño fue bueno, con la gran mayoría de las ACSs con una mediana superior al 95% de eficacia. La excepción a este patrón está representada por la ACS 12a con una mediana menor al 90% de eficacia (Fig. 30, panel izquierdo). Este sería un barrio apto para buscar piojos con algún grado de tolerancia a azametifós. La ACS 31b presenta valores incluso menores (mediana 50% eficacia), pero consta sólo de un registro, por lo que es necesario tomar este resultado con cautela.

Para el caso de deltametrina, en la mayoría de las ACSs el desempeño medio estuvo por debajo del 90% de eficacia. La única excepción correspondió a tratamientos realizados en el barrio 9B donde la mediana sobrepasó ligeramente el 90% de eficacia. Áreas con resultados menores al 50% de eficacia se concentraron en la región de Los Lagos, en particular en las ACSs 2, 9a, 12b. Otras áreas de malos resultados se observaron en la ACS 27 en la región de Aysén (Fig. 14, panel central).

Los tratamientos con cipermetrina en 2017 fueron sumamente escasos. En todas las ACSs donde se aplicó la mediana de eficacia estuvo entre el 50 y 90% (Fig. 14, panel derecho).

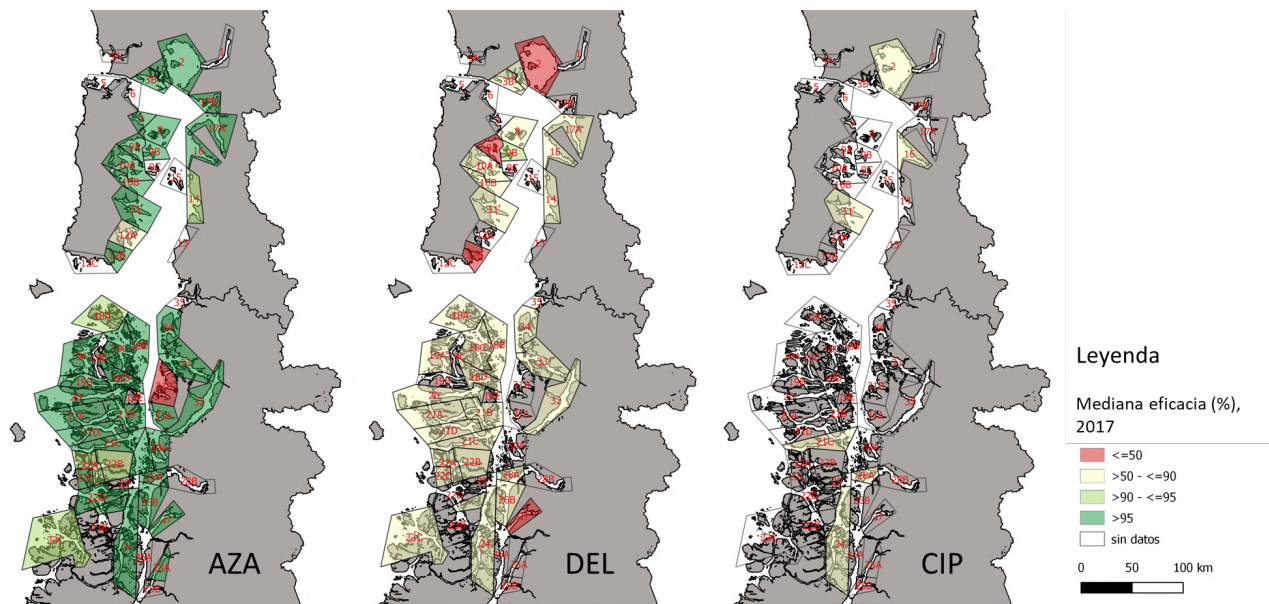


Figura 30. Mapa de riesgo en base al desempeño de drogas antiparasitarias para 2017. Expresado como mediana de eficacia (%) calculada por ACS.

Modelamiento de la eficacia de tratamientos

Los resultados del modelo Beta indican que, bajo un 95% de credibilidad, las variables droga, parásitos adultos totales pre-tratamiento y el año del tratamiento fueron significativas, es decir, explicaron de buena manera la variabilidad observada de la eficacia de tratamientos entre 2016 y 2017. Como era de esperar, azametifós resultó ser la droga de mejor desempeño. Entre los piretroides, cipermetrina presentó resultados ligeramente mejores que deltametrina. La carga pre-tratamiento de adultos presentó una asociación positiva con la eficacia, sugiriendo que se logró un mejor desempeño cuando las cargas pre-tratamiento fueron mayores. Finalmente, los tratamientos realizados en 2017 tuvieron peores resultados, en promedio, que los llevados a cabo en 2016, lo que podría ser la primera señal concreta sobre la pérdida de sensibilidad del *C. rogersesseyi* al azametifós en el tiempo. En la Tabla 7 se presentan las variables significativas que se mantuvieron en el modelo final, sus estimadores (β) y correspondiente intervalo de credibilidad del 95%.

Tabla 7. Modelo Beta para eficacia de tratamiento; datos IPT 2016-2017.

Variable	Estimación	Intervalo de credibilidad (95%)	
Intercepto (β_0)	277.312	158.571	397.756
Droga Azametifós (referencia)			
Droga Ciper	-0.610	-0.754	-0.475
Droga Delta	-0.700	-0.761	-0.632
Adultos totales pre-tratamiento	0.018	0.014	0.022
Año 2016 (referencia)			
Año 2017	-0.136	-0.196	-0.078

Conclusiones

Durante 2015, 2016 y 2017 se reportaron a través del Informe Post-Tratamiento (IPT) 3.157 tratamientos antiparasitarios en las regiones de Los Lagos y Aysén, repartidos en 392 centros de cultivo. En el 77,9% de los tratamientos la droga seleccionada fue azametifós, en 16,8% deltametrina y en 5,0% cipermetrina. En el 0,3% de los casos se administraron tratamientos no farmacológicos. La intensidad de tratamientos con azametifós ha ido bajando desde los 2,46 tratamientos/centro en 2015 estabilizándose alrededor de los 1,90 tratamientos/centro desde 2016 hasta 2017. El uso de deltametrina se ha mantenido relativamente constante entre 2015 y 2017 en los 0,45 tratamientos/centro/año. Finalmente, el uso de cipermetrina ha ido disminuyendo sostenidamente desde 0,28 en 2015 a 0,02 tratamientos/centro/año en 2017. El uso de estas tres drogas antiparasitarias presenta una fuerte variación espacial y a través de los años.

Las eficacias de tratamientos realizados con azametifós fueron en general altas y presentaron una baja dispersión, sugiriendo que esta droga funciona bien en la gran mayoría de las ACS de las regiones de Los Lagos y Aysén. Las áreas con la mayor proporción de tratamientos fallidos con azametifós en Los Lagos fueron las ACSs 15, 14, mientras que en Aysén fueron las ACSs 23c, 27, 18a y 31b. Tratamientos llevados a cabo con deltametrina o cipermetrina lograron eficacias inferiores y mucho más variables a través de las ACSs. En la mayor parte de las ACS el desempeño de estas drogas fue intermedio, aunque hubo algunas donde la proporción de tratamientos exitosos fue importante como en las ACSs 30b y 21b (deltametrina) y 2, 21b y 18c (cipermetrina), por nombrar algunas. Por otro lado, en algunas ACSs se observa una variación considerable en el desempeño de las drogas entre empresas, la que podría estar explicada por diferencias en los procedimientos de baños. Del mismo modo, se puede apreciar que hay empresas que presentan resultados consistentemente buenos, a pesar que tienen centros ubicados en diferentes ACSs, lo que habla sobre la importancia de las prácticas al realizar un tratamiento por inmersión.

Para el caso de azametifós se observa una asociación negativa entre la intensidad de uso y la eficacia media, lo que sugiere que los centros que han hecho un mayor uso de esta droga presentan una peor eficacia. En el caso de deltametrina, esta asociación es positiva, para la cual no tenemos una interpretación clara. El tiempo que llevan estas cada una de estas drogas en el mercado podría explicar este diferente comportamiento.

Este informe presenta un modelo del desempeño de drogas antiparasitarias utilizando la distribución Beta que permite modelar la eficacia directamente como una proporción. Los resultados de este modelo confirman que la droga más eficaz es azametifós y revela que el desempeño de cipermetrina es ligeramente superior a deltametrina. El modelo indica, además, que las cargas de adultos totales pre-tratamiento influyen significativamente sobre la eficacia. Finalmente, el modelo presenta evidencia que el desempeño de azametifós ha disminuido en el tiempo.

5.- Identificación morfológica y molecular de Calígidos provenientes de centros de cultivos de salmón de Atlántico localizados en la Región de Magallanes

Antecedentes

Desde su aparición como un patógeno de importancia para la salmonicultura en Chile, el control del *Caligus rogercresseyi* se ha basado casi exclusivamente en el uso de agentes farmacológicos. El uso extensivo de estas drogas durante años ha tenido como consecuencia la aparición de poblaciones de *C. rogercresseyi* resistentes al benzoato de emamectina (EMB). En la actualidad existen numerosos antecedentes que sugieren la disminución de la sensibilidad de los parásitos a los piretroides sintéticos deltametrina y cipermetrina en varias zonas de Los Lagos y Aysén. Se desconoce cuál es el estado de sensibilidad del parásito al organofosforado azametifós, la droga más utilizada en la actualidad.

Por otra parte, se desconoce el rango de tolerancia fisiológica de la especie y como estos pueden afectar el ciclo de vida. Por otra parte, la evidencia en campo muestra que solo los centros de cultivo de Aysén poseen cargas parasitarias relevantes, no existiendo reportes oficiales hasta el momento de presencia en la región de Magallanes. Sin embargo, estudios en peces nativos en la zona demuestran la presencia de Calígidos de los géneros *Lepeophtheirus* y *Caligus* (González et al., 2016). Al presente, no existe confirmación morfológica y molecular que demuestre la presencia de *C. rogercresseyi* en centros de cultivos de salmónidos en la región de Magallanes.

Objetivo

El objetivo de este estudio fue analizar muestras de Calígidos proporcionadas por el Servicio Nacional de Pesca y obtenidos desde la región de Magallanes con la finalidad de determinar su categoría taxonómica.

Metodología

Recepción de muestras

El día 17 de julio de 2017 se recibieron 16 ejemplares de Calígidos en tres tubos de 15 mL fijados en etanol. A partir de estas muestras se procedió a realizar dos tipos de análisis: (1) Morfología mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y (2) DNA "Barcoding" mediante partidores para los genes COI, 18S y 28S. Los análisis de DNA "Barcoding" se realizaron utilizando como referencia la cepa de *Caligus rogercresseyi* del laboratorio de Referencia de Caligus, obtenida desde la Región de Los Lagos.

Resultados

Análisis de morfología mediante MEB

Los análisis morfológicos de los ejemplares recolectados por el personal del servicio en Magallanes sobre salmones del Atlántico infectados, indican la presencia Calígidos de un tamaño mayor a lo descrito para *C. rogercresseyi* obtenidos desde centros de cultivo de salmones. El cefalotórax, abdomen y complejo genital muestran tamaños de 2200, 1650 y 550 μm de longitud, respectivamente (Fig. 31). En promedio la longitud total observada para *C. rogercresseyi* es de 3200 μm para, mientras que las muestras obtenidas desde salmones de cultivo de Magallanes superan los 4400 μm , equivalentes a casi un 30% mayor en tamaño. Sin embargo, tamaños cercanos a 4400 μm han sido reportado para hembras de *C. rogercresseyi* infectando róbalo en el sur de Chile (González et al., 2012). Si bien el tamaño corporal no es una característica taxonómica para el género, si refleja historias de vida y patrones que pueden ser indicadores de morfotipos. El complejo genital de las muestras de Magallanes son más cortos que lo reportado para *L. salmonis*, lo que permite descartar que los Caligus de Magallanes sean del género *Lepeophtheirus* (Pike and Wadsworth, 1999) (Fig. 31C). De hecho, una vista en detalle del cefalotórax de la muestra de Magallanes comparado con *C. rogercresseyi* obtenida desde el laboratorio de referencia, evidencia patrones similares de las placas cefálicas, pero con una bifurcación de las placas a nivel central

(Fig. 32). Un hallazgo interesante es que en el mismo grupo de muestras provenientes de Magallanes, se detectó otro tipo Calígido de morfología y tamaño similar a la cepa referencia de *C. rogercresseyi* (Fig. 33). En este último grupo de individuos se analizó la morfología de caracteres taxonómicos en vista ventral, evidenciado una gran similitud en anténulas, mandíbula, maxilulas y maxilípedos (Fig. 34A-B), así como furca esternal (Fig. 35C-D) y apéndices bucales (Fig. 35E-F).

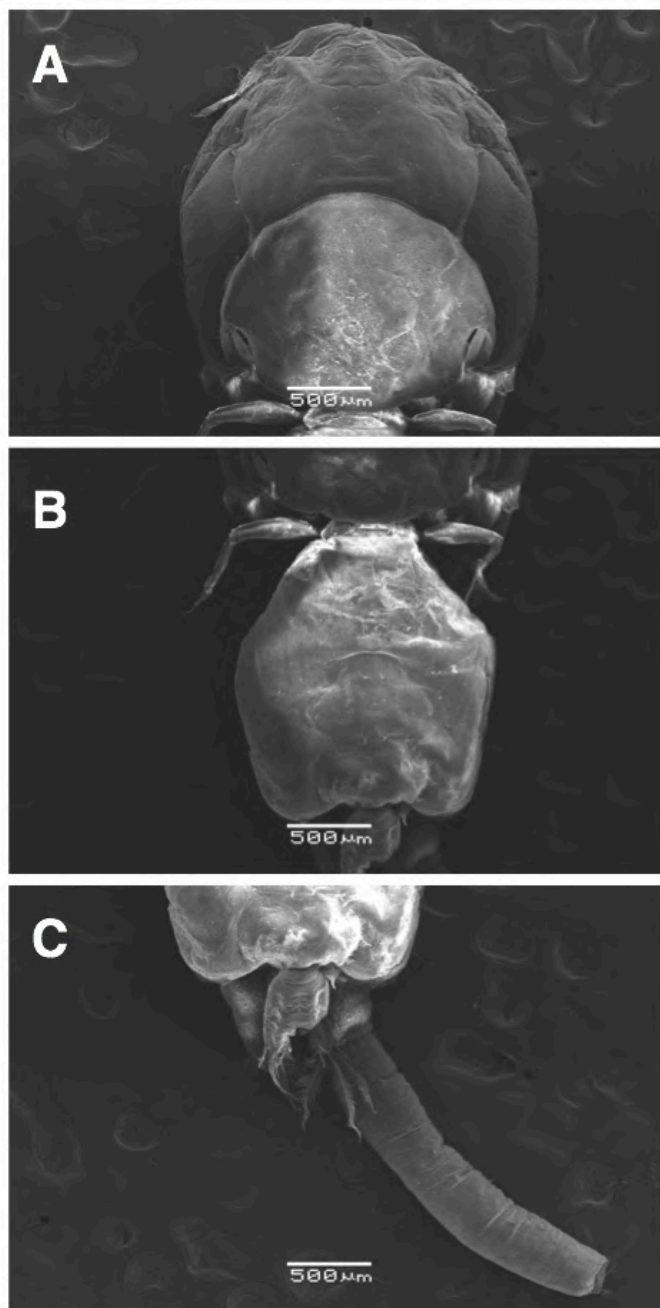


Figura 31. Hembra de Calígido muestreado sobre salmón del Atlántico. A) vista dorsal del cefalotórax, B) abdomen y C) complejo genital.

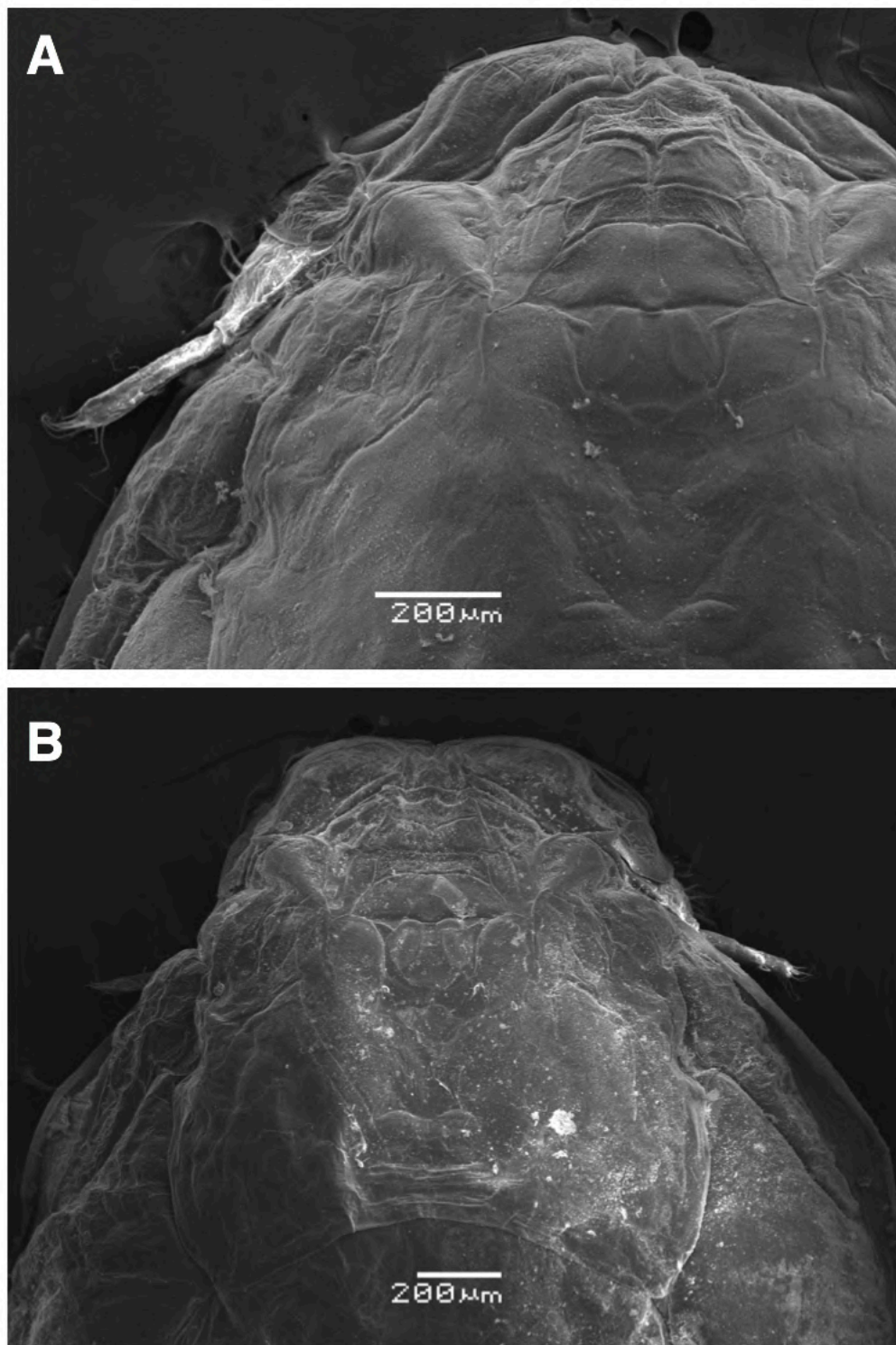


Figura 32. Detalle de vista dorsal de cefalotórax para A) Caligidos en estudio y B) muestra de *C. rogercresseyi* obtenida por el laboratorio de referencia de Caligus.

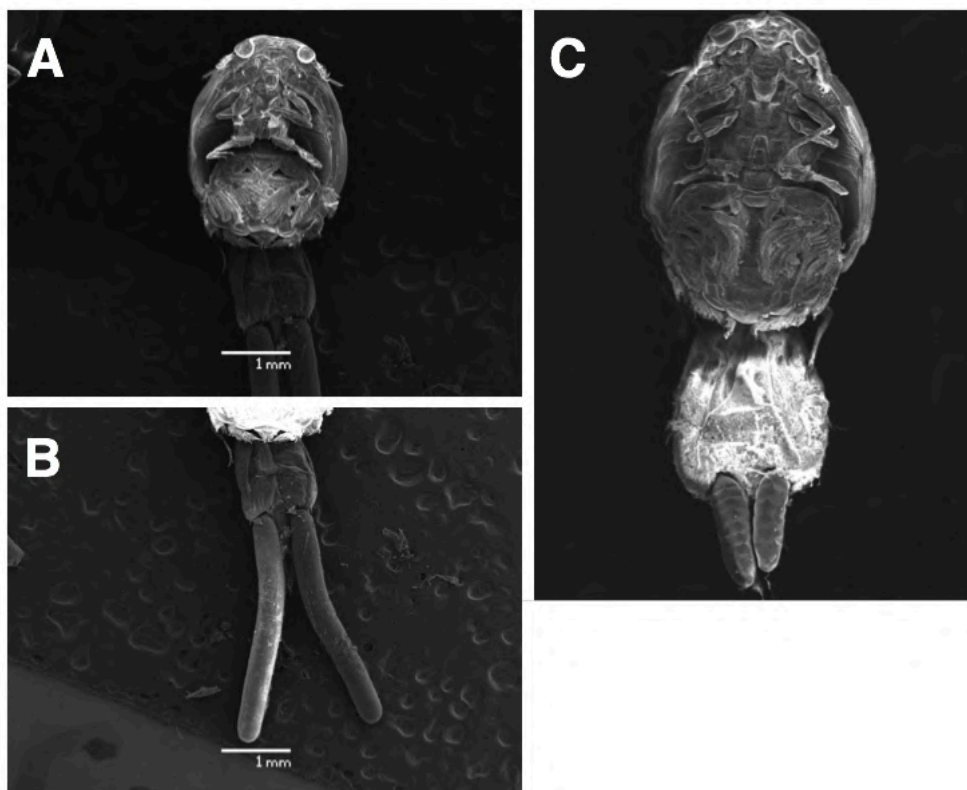


Figura 33. Vista ventral de hembras de (A y B) Calígidos en estudio y (C) *C. rogercresseyi*.

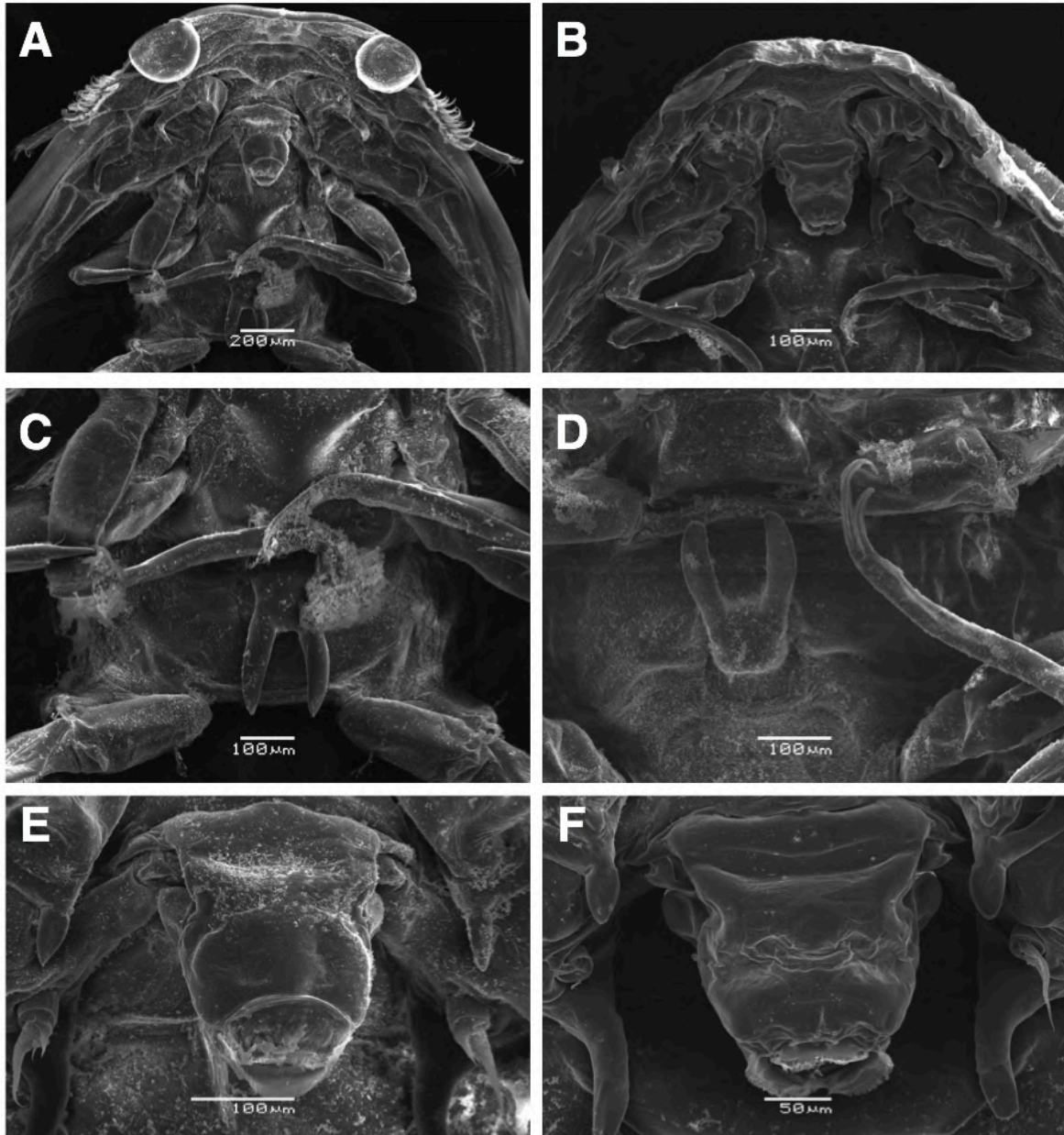


Figura 34. Detalle de vista ventral de hembras de (A, C y E) Calígidos en estudio y (B, D y F) muestra de referencia de *C. rogercresseyi*.

Análisis de DNA barcoding

Para la identificación molecular de los ejemplares en estudio, se utilizaron tres genes descritos en la literatura como DNA barcoding para Calígidos. Dichos genes, COI, 18S y 28S fueron exitosamente amplificados por PCR y secuenciados por Sanger. Los resultados demuestran alta homología (sobre 96%) entre las secuencias de los tres genes analizados entre la cepa de *C. rogercresseyi* y las muestras de obtenidas desde Magallanes y proporcionadas por el servicio. Esto permite concluir que las muestras de caligus provenientes desde Magallanes corresponden a *C. rogercresseyi*.

Tabla 8. Resultados de análisis de DNA barcoding para COI, 18S y 20S en muestras de Calígidos obtenidas desde Magallanes y desde el laboratorio de referencia de Caligus.

Name	Length	AC	Gene	EValue	Match	Total	Pct.(%)
COI							
<i>Crogercresseyi_1_referencia_Forw</i>	702	HQ157565.1	Caligus rogercresseyi mitochondrial sequence	0.0	655	661	99
<i>Crogercresseyi_1_referencia_Rev</i>	694	HQ157565.1	Caligus rogercresseyi mitochondrial sequence	0.0	644	649	99
<i>Crogercresseyi_2_referencia_Forw</i>	685	HQ157565.1	Caligus rogercresseyi mitochondrial sequence	0.0	636	643	99
<i>Crogercresseyi_2_referencia_Rev</i>	671	HQ667348.1	Caligus rogercresseyi isolate CalR3 cytochrome c oxidase subunit I (cox1) ζ	0.0	638	644	99
<i>Crogercresseyi_3_referencia_Forw</i>	685	HQ157565.1	Caligus rogercresseyi mitochondrial sequence	0.0	641	647	99
J16_1_Rev	691	HQ157565.1	Caligus rogercresseyi mitochondrial sequence	0.0	643	650	99
J16_2_Forw	703	HQ157565.1	Caligus rogercresseyi mitochondrial sequence	0.0	650	658	99
J16_2_Rev	684	HQ157565.1	Caligus rogercresseyi mitochondrial sequence	0.0	644	650	99
J5_1_Forw	693	HQ157565.1	Caligus rogercresseyi mitochondrial sequence	0.0	638	650	98
J5_1_Rev	695	HQ157565.1	Caligus rogercresseyi mitochondrial sequence	0.0	636	650	98
J5_2_Forw	703	HQ157565.1	Caligus rogercresseyi mitochondrial sequence	0.0	637	652	98
J5_2_Rev	686	HQ157565.1	Caligus rogercresseyi mitochondrial sequence	0.0	634	650	98
18S							
<i>Crogercresseyi_1_referencia_Forw</i>	1471	HM545887.1	Caligus sp. 1 JYW-2010 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	1235	1265	98
<i>Crogercresseyi_1_referencia_Rev</i>	1480	HM545887.1	Caligus sp. 1 JYW-2010 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	1300	1350	96
<i>Crogercresseyi_2_referencia_Forw</i>	1267	HM545887.1	Caligus sp. 1 JYW-2010 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	1240	1285	96
<i>Crogercresseyi_2_referencia_Rev</i>	1253	HM545887.1	Caligus sp. 1 JYW-2010 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	1172	1206	97
J16_1_Forw	1276	KC569363.1	Caligus uniartus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	1159	1224	95
J16_1_Rev	1234	HM545887.1	Caligus sp. 1 JYW-2010 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	1190	1233	97
J16_2_Forw	1234	HM545887.1	Caligus sp. 1 JYW-2010 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	1152	1193	97
J16_2_Rev	1241	HM545887.1	Caligus sp. 1 JYW-2010 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	1162	1195	97
J5_1_Forw	1155	HM545887.1	Caligus sp. 1 JYW-2010 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	1104	1143	97
J5_Rev	1389	HM545887.1	Caligus sp. 1 JYW-2010 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	1273	1318	97
J5_2_Forw	1136	HM545887.1	Caligus sp. 1 JYW-2010 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	1092	1132	96
J5_2_Rev	1404	HM545887.1	Caligus sp. 1 JYW-2010 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	1233	1263	98
28S							
<i>Crogercresseyi_1_referencia_Forw</i>	505	HQ667333.1	Caligus rogercresseyi isolate CalR5 28S ribosomal RNA gene, partial seque	0.0	449	468	96
<i>Crogercresseyi_1_referencia_Rev</i>	718	HQ667332.1	Caligus rogercresseyi isolate CalR4 28S ribosomal RNA gene, partial seque	0.0	693	696	99
<i>Crogercresseyi_2_referencia_Forw</i>	710	HQ667332.1	Caligus rogercresseyi isolate CalR4 28S ribosomal RNA gene, partial seque	0.0	659	661	99
<i>Crogercresseyi_2_referencia_Rev</i>	792	HQ667332.1	Caligus rogercresseyi isolate CalR4 28S ribosomal RNA gene, partial seque	0.0	688	688	100
J16_1_Forw	611	HQ667332.1	Caligus rogercresseyi isolate CalR4 28S ribosomal RNA gene, partial seque	0.0	599	601	99
J16_1_Rev	775	HQ667332.1	Caligus rogercresseyi isolate CalR4 28S ribosomal RNA gene, partial seque	0.0	669	670	99
J16_2_Forw	710	HQ667332.1	Caligus rogercresseyi isolate CalR4 28S ribosomal RNA gene, partial seque	0.0	661	668	99
J16_2_Rev	729	HQ667332.1	Caligus rogercresseyi isolate CalR4 28S ribosomal RNA gene, partial seque	0.0	681	682	99
J5_1_Forw	710	HQ667332.1	Caligus rogercresseyi isolate CalR4 28S ribosomal RNA gene, partial seque	0.0	655	658	99
J5_Rev	810	HQ667332.1	Caligus rogercresseyi isolate CalR4 28S ribosomal RNA gene, partial seque	0.0	685	686	99
J5_2_Forw	709	HQ667332.1	Caligus rogercresseyi isolate CalR4 28S ribosomal RNA gene, partial seque	0.0	660	664	99
J5_2_Rev	713	HQ667332.1	Caligus rogercresseyi isolate CalR4 28S ribosomal RNA gene, partial seque	0.0	692	695	99

*en azul se marcan se destacan las muestras de *C. rogercresseyi* referencia y aquellas denominadas J16 y J5 corresponden a muestras de Caligus traídas desde Magallanes.

Adicionalmente, se realizó un análisis filogenético utilizando los resultados obtenidos desde la secuenciación de los marcadores COI, 18S y 28S. En el análisis se observa que las muestras de Caligus de Magallanes presentan cercanía filogenética con *C. rogercresseyi*. El árbol filogenético construido para cada uno de los marcadores (18S, 28S y COI) agrupa en el mismo clado las secuencias de referencia para *C. rogercresseyi* reportadas en GeneBank con las secuencias obtenidas de la secuenciación de estos marcadores amplificados en muestras de Caligus de Magallanes. Con valores de conservación entre la secuencia referencia y Magallanes de 86.5%, 100%, 99.9% para los marcadores 18S, 28S y COI, respectivamente.

Informe preparado por:

1. Dr. Cristian Gallardo Escárate, Universidad de Concepción.
2. Dr. Gabriel Arriagada Acevedo, Universidad de Concepción.
3. Dr. Gustavo Núñez, Universidad de Concepción.
4. Dra. Valentina Valenzuela Muñoz, Universidad de Concepción.
5. Bio.Mar. Ana María Arriagada, Universidad de Concepción.

Anexo Figuras y Tablas



Figura 1A. ACS de las regiones de Los Lagos y Aysén.

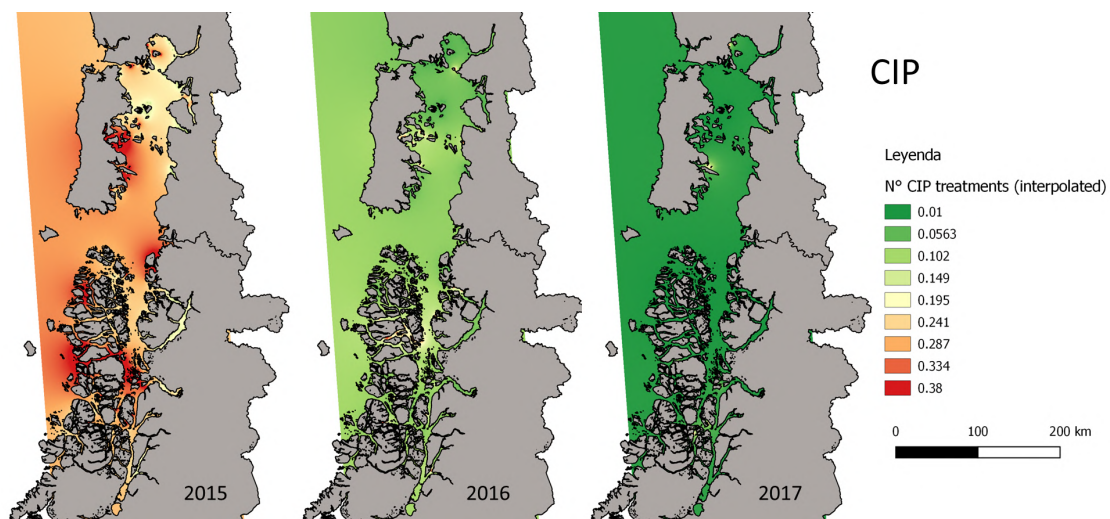
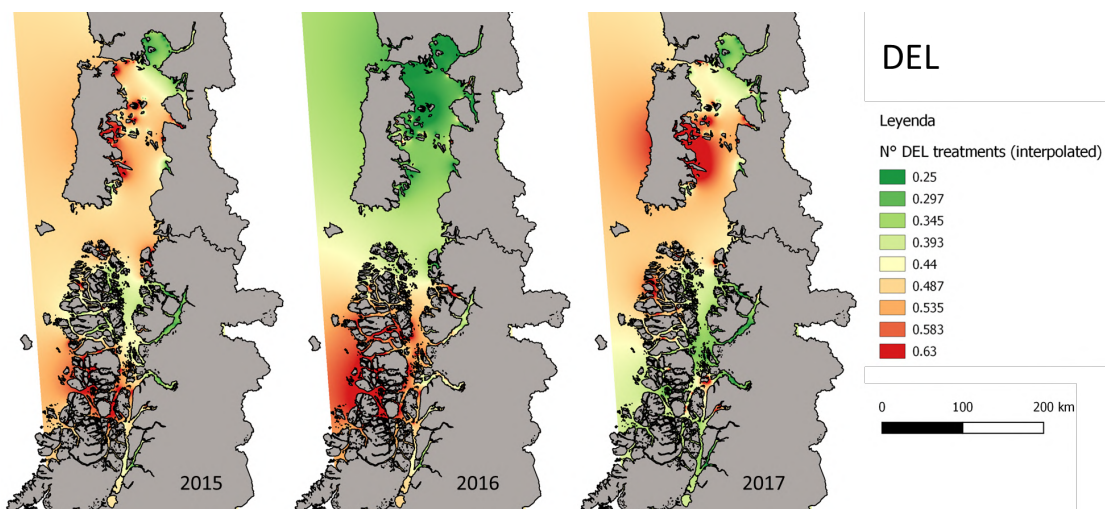
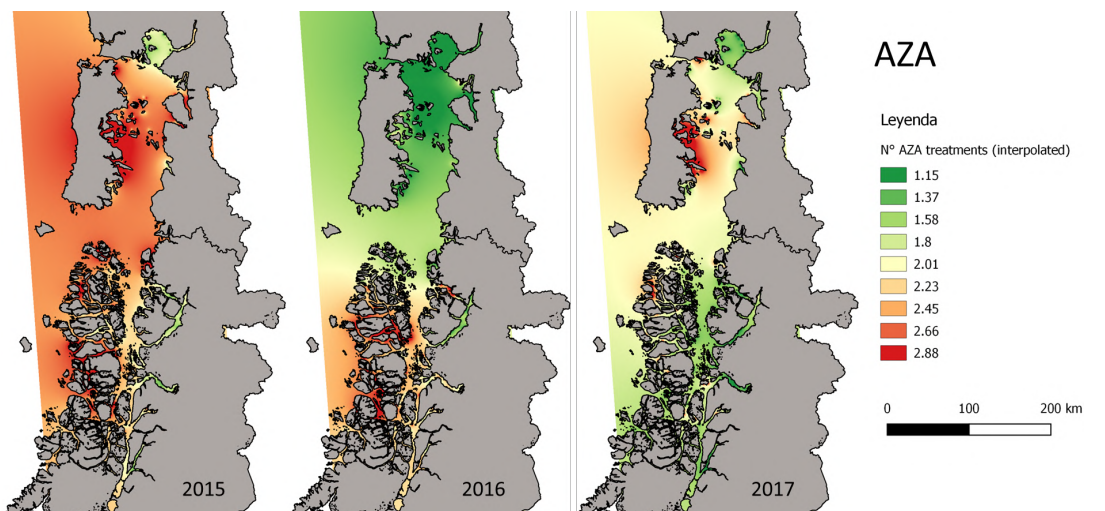


Figura 2A. Intensidad de uso de azametifós (AZA), deltametrina (DEL) y cipermetrina (CIP) para 2015, 2016 y 2017. Expresado como número (interpolado) de tratamientos por centro.

Tabla 1A. Número de tratamientos a nivel de centro en cada ACS por año durante 2015, 2016 y 2017.

ACS	AZA			DEL			CIP		
	2015	2016	2017	2015	2016	2017	2015	2016	2017
2	10	14	7	0	3	1	4	1	1
3a	0	0	4	0	1	1	0	0	0
3b	17	5	26	5	0	5	3	0	0
6	15	0	0	4	0	0	0	0	0
7	3	1	6	0	0	0	0	0	0
8	41	2	15	10	0	4	0	0	0
9a	7	20	11	0	2	1	0	0	0
9b	29	1	30	7	0	9	3	0	0
9c	9	4	0	0	3	0	0	1	0
10a	74	29	66	12	9	19	13	5	0
10b	58	14	68	10	2	20	8	1	0
11	41	13	52	10	2	14	5	1	2
12a	8	3	1	1	1	0	0	0	0
12b	6	4	3	0	1	1	1	0	0
14	11	13	5	2	3	1	0	1	0
15	1	0	0	0	0	0	0	0	0
16	29	8	26	8	3	7	1	1	1
17a	48	7	27	6	2	4	4	0	0
17b	9	27	8	0	5	0	0	1	0
18a	21	0	13	5	0	4	0	0	0
18b	10	5	6	0	2	2	1	0	0
18c	27	31	22	1	6	3	2	3	0
18d	35	12	16	7	3	5	2	0	0
19a	43	24	50	7	6	13	9	0	0
19b	5	12	1	1	2	0	0	0	0
20	7	16	18	0	2	6	0	1	0
21	0	0	1	0	0	1	0	0	0
21a	20	60	19	1	12	6	3	4	0
21b	6	61	3	1	11	2	0	7	0
21c	66	27	38	12	8	3	14	1	1
21d	19	6	11	5	1	4	2	0	0
22a	22	30	6	7	10	1	3	0	0
22b	26	2	18	6	0	4	0	0	0
22c	16	7	9	4	3	1	3	0	0
22d	20	30	9	7	9	0	2	1	0

23a	22	31	6	3	8	2	1	0	0
23b	4	12	0	0	4	0	1	2	0
23c	10	14	10	2	3	3	0	0	0
24	26	8	24	13	2	5	2	0	2
25a	0	5	1	0	0	0	0	0	0
25b	0	8	0	0	1	0	0	1	0
26a	4	4	0	0	1	0	0	0	0
26b	5	14	5	2	3	2	2	1	0
27	6	4	10	1	0	4	0	0	0
28a	11	9	25	2	0	9	3	1	1
28b	0	20	0	0	2	0	0	0	0
28c	2	0	2	1	0	0	1	0	0
29	4	16	0	0	6	0	0	0	0
30a	2	7	1	0	2	0	0	0	0
30b	20	24	6	5	8	0	7	1	0
31a	8	0	3	3	0	0	0	0	0
31b	1	10	1	0	2	0	0	1	0
32	17	0	22	0	4	3	0	0	0
33	7	45	9	2	12	1	0	1	0
34	57	12	31	13	1	8	11	1	0

AZA: azametifós

DEL: deltametrina

CIP: cipermetrina

Tabla 2A. Estadísticos descriptivos de eficacia de tratamientos a nivel de ACS para tratamientos antiparasitarios llevados a cabo con AZA en las regiones de Los Lagos y Aysén desde 2015 a 2017.

ACS	n	Eficacia de tratamiento %			
		Media	DE	Mediana	CV
2	125	94.77	11.17	99.23	0.12
3a	16	98.68	2.09	99.62	0.02
3b	184	94.94	9.21	97.72	0.10
6	60	96.26	6.88	99.24	0.07
7	40	95.73	5.70	99.12	0.06
8	218	96.26	7.61	98.99	0.08
9a	150	97.25	6.86	99.71	0.07
9b	241	93.92	9.64	97.73	0.10
9c	49	98.25	2.95	100.00	0.03
10a	669	94.99	7.43	97.96	0.08
10b	556	94.31	9.99	98.40	0.11
11	415	93.67	9.57	97.67	0.10
12a	44	96.11	3.85	96.54	0.04
12b	52	97.96	2.91	99.02	0.03
14	112	91.16	14.82	98.20	0.16
15	4	59.09	9.07	57.36	0.15

16	257	96.19	10.20	100.00	0.11
17a	323	97.08	5.72	100.00	0.06
17b	176	96.43	6.88	100.00	0.07
18a	139	92.06	10.60	95.83	0.12
18b	84	98.74	3.95	100.00	0.04
18c	309	95.73	10.14	99.00	0.11
18d	250	93.96	11.97	97.91	0.13
19a	470	96.47	7.00	99.47	0.07
19b	68	94.12	10.19	97.97	0.11
20	163	94.46	9.26	97.53	0.10
21	4	92.43	2.93	92.59	0.03
21a	390	94.20	12.79	98.44	0.14
21b	276	92.11	14.51	97.60	0.16
21c	518	95.91	8.96	98.59	0.09
21d	145	96.19	9.48	100.00	0.10
22a	235	93.73	11.89	98.44	0.13
22b	185	94.16	8.91	97.96	0.09
22c	128	94.01	11.88	98.12	0.13
22d	233	94.94	11.52	100.00	0.12
23a	232	96.29	7.81	99.17	0.08
23b	60	93.56	13.73	99.11	0.15
23c	124	90.40	16.30	97.53	0.18
24	231	98.14	6.23	100.00	0.06
25a	27	94.26	12.46	100.00	0.13
25b	30	94.07	12.20	99.14	0.13
26a	32	90.24	18.88	100.00	0.21
26b	92	93.90	9.22	98.18	0.10
27	75	93.77	9.38	100.00	0.10
28a	177	93.97	11.64	98.70	0.12
28b	77	89.83	19.44	98.48	0.22
28c	16	98.71	4.82	100.00	0.05
29	75	93.94	12.05	99.22	0.13
30a	36	91.72	18.69	98.85	0.20
30b	199	97.04	8.07	100.00	0.08
31a	44	97.80	3.91	100.00	0.04
31b	45	93.94	11.24	98.70	0.12
32	151	94.79	10.61	98.75	0.11
33	233	93.14	15.30	98.84	0.16
34	389	93.67	8.16	96.49	0.09

Tabla 3A. Estadísticos descriptivos de eficacia de tratamientos a nivel de ACS para tratamientos antiparasitarios llevados a cabo con DEL en las regiones de Los Lagos y Aysén desde 2015 a 2017.

ACS	n	Eficacia de tratamiento %			
		Media	DE	Mediana	CV
2	10	26.11	22.52	25.16	0.86
3a	5	81.57	5.80	83.09	0.07
3b	36	66.75	29.82	71.89	0.45
6	16	57.49	30.25	52.48	0.53
8	53	67.59	18.70	65.75	0.28
9a	12	66.04	17.60	72.11	0.27
9b	60	84.70	15.89	89.19	0.19
9c	11	79.33	17.53	75.14	0.22
10a	150	69.79	24.06	75.79	0.34
10b	124	60.08	23.91	56.53	0.40
11	99	69.21	17.92	69.23	0.26
12a	8	74.41	11.59	73.71	0.16
12b	8	60.70	30.74	61.82	0.51
14	22	80.59	13.55	83.41	0.17
16	71	72.08	21.19	74.60	0.29
17a	47	81.89	18.95	88.89	0.23
17b	18	52.95	23.31	50.86	0.44
18a	36	54.85	21.82	57.19	0.40
18b	16	74.68	19.97	77.95	0.27
18c	39	71.82	25.95	73.53	0.36
18d	59	66.35	21.01	71.43	0.32
19a	108	69.41	25.73	68.81	0.37
19b	12	66.22	31.72	75.99	0.48
20	32	72.24	21.24	72.13	0.29
21	4	64.95	2.04	65.54	0.03
21a	75	76.74	26.67	86.21	0.35
21b	56	81.89	25.05	92.71	0.31
21c	88	77.29	16.52	78.90	0.21
21d	34	73.22	24.90	72.89	0.34
22a	68	73.55	24.28	77.74	0.33
22b	40	71.69	16.45	77.56	0.23
22c	30	82.42	17.41	87.06	0.21
22d	64	80.48	18.56	83.33	0.23
23a	51	84.11	16.12	87.21	0.19
23b	12	88.17	13.91	93.75	0.16
23c	27	73.95	26.85	85.71	0.36
24	77	78.69	15.24	80.95	0.19
25b	4	80.39	11.56	77.06	0.14
26a	3	91.95	8.77	93.24	0.10
26b	27	79.40	17.51	80.00	0.22
27	20	49.98	27.81	59.18	0.56
28a	43	76.87	13.02	80.85	0.17
28b	8	88.53	24.23	98.07	0.27
28c	4	95.88	3.07	95.09	0.03
29	23	81.69	18.40	83.50	0.23

30a	8	80.15	32.15	98.55	0.40
30b	48	89.80	15.85	95.45	0.18
31a	12	83.86	6.43	85.35	0.08
31b	8	88.81	12.90	94.69	0.15
32	28	81.00	18.60	86.04	0.23
33	57	85.41	18.31	93.62	0.21
34	81	72.99	22.51	76.54	0.31

Tabla 4A. Estadísticos descriptivos de eficacia de tratamientos a nivel de ACS para tratamientos antiparasitarios llevados a cabo con cipermetrina en las regiones de Los Lagos y Aysén desde 2015 a 2017.

ACS	n	Eficacia de tratamiento %			
		Media	DE	Mediana	CV
2	24	87.93	12.60	93.92	0.14
3b	12	65.20	10.26	67.56	0.16
9b	10	61.51	26.53	59.32	0.43
9c	4	91.70	1.47	91.07	0.02
10a	71	70.82	22.86	79.37	0.32
10b	35	73.37	18.30	75.00	0.25
11	32	78.64	12.53	75.06	0.16
12b	4	95.40	0.26	95.39	0.00
14	4	67.46	8.32	66.66	0.12
16	12	88.72	8.37	88.05	0.09
17a	16	84.06	12.20	85.34	0.15
17b	4	73.70	6.80	71.73	0.09
18b	4	81.87	10.74	87.02	0.13
18c	20	80.83	27.15	90.84	0.34
18d	7	57.04	22.87	61.82	0.40
19a	29	71.52	20.91	68.75	0.29
20	4	91.43	17.14	100.00	0.19
21a	27	81.36	18.04	88.24	0.22
21b	28	86.00	16.89	94.40	0.20
21c	64	78.02	15.46	80.00	0.20
21d	8	78.16	10.84	79.33	0.14
22a	12	74.27	17.25	77.56	0.23
22c	12	80.69	13.01	76.05	0.16
22d	12	85.71	7.62	84.47	0.09
23a	1	25.86	-	25.86	-
23b	11	76.88	22.98	80.50	0.30
24	16	84.06	12.07	79.75	0.14
25b	4	79.77	34.31	96.03	0.43
26b	12	76.53	19.03	82.14	0.25
28a	20	85.81	14.57	90.07	0.17
28c	4	91.39	4.13	91.20	0.05
30b	32	84.37	19.04	89.66	0.23
31b	4	92.36	14.65	99.52	0.16
33	4	65.43	30.93	65.97	0.47
34	40	66.73	22.54	73.31	0.34

Anexo Referencias

- Montory JA, Cumillaf JP, Cubillos VM, Paschke K, Urbina MA, Gebauer P. Early development of the ectoparasite *Caligus rogercresseyi* under combined salinity and temperature gradients. *Aquaculture*. 2018 486: 68 - 74.
- Gonzalez L, Carvajal J. Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture*. 2003 220:101- 17.
- Bravo S, Erranz F, Lagos C. A comparison of sea lice, *Caligus rogercresseyi*, fecundity in four areas in southern Chile. *Journal of fish diseases*. 2009 32:107- 13.
- Bravo S, Pozo V, Silva M. The tolerance of *Caligus rogercresseyi* to salinity reduced in southern Chile. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 2008 28:197-204.
- Consortium, S., 2006. Sea lice resistance to chemotherapeutants: A handbook in resistance management. SEARCH: Sacramento, CA.
- Fatihah, S.N., Jasmani, S., Abol-Munafi, A.B., Noorbaiduri, S., Muhd-Farouk, H., Ikhwanuddin, M., 2016. Development of a sperm cryopreservation protocol for the mud spiny lobster, *Panulirus polyphagus*. *Aquaculture* 462, 56-63.
- Gallardo-Escárate, C., Valenzuela-Muñoz, V., Núñez-Acuña, G., 2014. RNA-Seq Analysis Using De Novo Transcriptome Assembly as a Reference for the Salmon Louse *Caligus rogercresseyi*. *PLoS ONE* 9, e92239.
- González, M.T., Castro, R., Muñoz, G., López, Z., 2016. Sea lice (Siphonostomatoida: Caligidae) diversity on littoral fishes from the south-eastern Pacific coast determined from morphology and molecular analysis, with description of a new species (*Lepeophtheirus confusum*). *Parasitology International* 65, 685-695.
- González, M.T., Molinet, C., Arenas, B., Asencio, G., Carvajal, J., 2012. Fecundity of the sea louse *Caligus rogercresseyi* on its native host *Eleginops maclovinus* captured near salmon farms in southern Chile. *Aquaculture Research* 43, 853-860.
- Gwo, J.C., 2000. Cryopreservation of sperm of some marine fishes. *Cryopreservation in aquatic species* 7.
- Israel, R., Leffler, K.S., Walters, C.A., 1996. A comparison of time, temperature, and refreezing variables on frozen sperm motility recovery. *Fertility and sterility* 65, 272-274.
- Jamieson, B.G.M., 1991. Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa: with a survey of lophophorate, echinoderm and protochordate sperm and an account of gamete cryopreservation. Cambridge University Press.
- Jenkins, J.A., Tiersch, T.R., 1997. A preliminary bacteriological study of refrigerated channel catfish sperm. *Journal of the World Aquaculture Society* 28, 282-288.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R., 1996. Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*). *Aquaculture* 144, 265-274.
- Myhre Jensen, E., Sevatdal, S., Bakke, M.J., Kaur, K., Horsberg, T.E., 2017. A selection study on a laboratory-designed population of salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) using organophosphate and pyrethroid pesticides. *PLOS ONE* 12, e0178068.
- Ohs, C.L., Rhyne, A.L., Stenn, E., 2009. Viability of subitaneous eggs of the copepod, *Acartia tonsa* (Dana), following exposure to various cryoprotectants and hypersaline water. *Aquaculture* 287, 114-119.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29, e45.

- Pike, A.W., Wadsworth, S.L., 1999. Sealice on Salmonids: Their Biology and Control, in: Baker, J.R., Muller, R., Rollinson, D. (Eds.), *Advances in Parasitology*. Academic Press, pp. 233-337.
- Taşdemir, U., Büyükleblebici, S., Tuncer, P.B., Coşkun, E., Özgürtaş, T., Aydın, F.N., Büyükleblebici, O., Gürcan, İ.S., 2013. Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. *Cryobiology* 66, 38-42.
- Tiersch, T.R., Goudie, C.A., Carmichael, G.J., 1994. Cryopreservation of channel catfish sperm: storage in cryoprotectants, fertilization trials, and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm. *Transactions of the American Fisheries Society* 123, 580-586.
- Tiersch, T.R., Mazik, P.M., 2000. Cryopreservation in aquatic species. World aquaculture society Baton Rouge, LA.
- Valenzuela-Muñoz, V., Chavez-Mardones, J., Gallardo-Escárate, C., 2015. RNA-seq analysis evidences multiple gene responses in *Caligus rogercresseyi* exposed to the anti-salmon lice drug azamethiphos. *Aquaculture* 446, 156-166.
- Gwo, J.C., 2000. Cryopreservation of sperm of some marine fishes. *Cryopreservation in aquatic species* 7.
- Israel, R., Leffler, K.S., Walters, C.A., 1996. A comparison of time, temperature, and refreezing variables on frozen sperm motility recovery. *Fertility and sterility* 65, 272-274.
- Jamieson, B.G.M., 1991. Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa: with a survey of lophophorate, echinoderm and protochordate sperm and an account of gamete cryopreservation. Cambridge University Press.
- Jenkins, J.A., Tiersch, T.R., 1997. A preliminary bacteriological study of refrigerated channel catfish sperm. *Journal of the World Aquaculture Society* 28, 282-288.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R., 1996. Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*). *Aquaculture* 144, 265-274.
- Pike, A.W., Wadsworth, S.L., 1999. Sealice on Salmonids: Their Biology and Control, in: Baker, J.R., Muller, R., Rollinson, D. (Eds.), *Advances in Parasitology*. Academic Press, pp. 233-337.
- Taşdemir, U., Büyükleblebici, S., Tuncer, P.B., Coşkun, E., Özgürtaş, T., Aydın, F.N., Büyükleblebici, O., Gürcan, İ.S., 2013. Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. *Cryobiology* 66, 38-42.
- Tiersch, T.R., Goudie, C.A., Carmichael, G.J., 1994. Cryopreservation of channel catfish sperm: storage in cryoprotectants, fertilization trials, and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm. *Transactions of the American Fisheries Society* 123, 580-586.
- Tiersch, T.R., Mazik, P.M., 2000. Cryopreservation in aquatic species. World aquaculture society Baton Rouge, LA.
- Arriagada G, Marín S. 2018. Evaluating the spatial range of the effect of synchronized antiparasitic treatments on the abundance of sea lice *Caligus rogercresseyi* (Boxshall & Bravo, 2000) in Chile. *Aquac Res* 49:816-831.
- Arriagada G, Stryhn H, Campistó JL, Rees E, Sanchez J, Ibarra R, St-Hilaire, S. 2018. A multivariable assessment of the spatio-temporal distribution of pyrethroids performance on the sea lice *Caligus rogercresseyi* in Chile. *Spat Spatiotemporal Epidemiol* 26:1-13.

- Arriagada G, Stryhn H, Campistó JL, Rees EE, Sanchez J, Ibarra R, Medina M, St-Hilaire S. 2014. Evaluation of the performance of pyrethroids on different life stages of *Caligus rogercresseyi* in southern Chile. *Aquaculture* 426/427:231–237.
- Arriagada G, Stryhn H, Sanchez J, Vanderstichel R, Campistó JL, Rees EE, Ibarra R, St-Hilaire S. 2017. Evaluating the effect of synchronized sea lice treatments in Chile. *Prev Vet Med* 136:1–10.
- Jimenez DF, Ibarra R, Artacho P, Primus AE, Tello A. 2018. Prolonging azamethiphos bath increases the effectiveness of field treatments against *Caligus rogercresseyi* in Atlantic salmon in Chile (*Salmo salar*). *Aquaculture* 493:186-191.
- Jones PG, Hammell KL, Dohoo IR, Revie CW. 2012. Effectiveness of emamectin benzoate for treatment of *Lepeophtheirus salmonis* on farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in the Bay of Fundy, Canada. *Dis Aquat Org* 102:53-64.
- Lees F, Baillie M, Gettinby G, Revie CW. 2008. The efficacy of emamectin benzoate against infestations of *Lepeophtheirus salmonis* on farmed Atlantic salmon (*Salmon salar* L.) in Scotland, 2002-2006. *PLoS One* 3(2), e1549.
- Fatihah, S.N., Jasmani, S., Abol-Munafi, A.B., Noorbaiduri, S., Muhd-Farouk, H., Ikhwanuddin, M., 2016. Development of a sperm cryopreservation protocol for the mud spiny lobster, *Panulirus polyphagus*. *Aquaculture* 462, 56-63.
- González, M.T., Castro, R., Muñoz, G., López, Z., 2016. Sea lice (Siphonostomatoida: Caligidae) diversity on littoral fishes from the south-eastern Pacific coast determined from morphology and molecular analysis, with description of a new species (*Lepeophtheirus confusum*). *Parasitology International* 65, 685-695.
- González, M.T., Molinet, C., Arenas, B., Asencio, G., Carvajal, J., 2012. Fecundity of the sea louse *Caligus rogercresseyi* on its native host *Eleginops maclovinus* captured near salmon farms in southern Chile. *Aquaculture Research* 43, 853-860.
- Gwo, J.C., 2000. Cryopreservation of sperm of some marine fishes. *Cryopreservation in aquatic species* 7.
- Israel, R., Leffler, K.S., Walters, C.A., 1996. A comparison of time, temperature, and refreezing variables on frozen sperm motility recovery. *Fertility and sterility* 65, 272-274.
- Jamieson, B.G.M., 1991. Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa: with a survey of lophophorate, echinoderm and protochordate sperm and an account of gamete cryopreservation. Cambridge University Press.
- Jenkins, J.A., Tiersch, T.R., 1997. A preliminary bacteriological study of refrigerated channel catfish sperm. *Journal of the World Aquaculture Society* 28, 282-288.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R., 1996. Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*). *Aquaculture* 144, 265-274.
- Ohs, C.L., Rhyne, A.L., Stenn, E., 2009. Viability of subitaneous eggs of the copepod, *Acartia tonsa* (Dana), following exposure to various cryoprotectants and hypersaline water. *Aquaculture* 287, 114-119.
- Pike, A.W., Wadsworth, S.L., 1999. Sealice on Salmonids: Their Biology and Control, in: Baker, J.R., Muller, R., Rollinson, D. (Eds.), *Advances in Parasitology*. Academic Press, pp. 233-337.
- Taşdemir, U., Büyükleblebici, S., Tuncer, P.B., Coşkun, E., Özgürtaş, T., Aydın, F.N., Büyükleblebici, O., Gürcan, İ.S., 2013. Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. *Cryobiology* 66, 38-42.

- Tiersch, T.R., Goudie, C.A., Carmichael, G.J., 1994. Cryopreservation of channel catfish sperm: storage in cryoprotectants, fertilization trials, and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm. *Transactions of the American Fisheries Society* 123, 580-586.
- Tiersch, T.R., Mazik, P.M., 2000. Cryopreservation in aquatic species. World aquaculture society Baton Rouge, LA.