

Medición de los efectos de la carga de caligus y los tratamientos de baños piojicidas sobre la piscirickettsiosis en la industria acuícola salmonera chilena

Entregable 4.1: Realización de estudio en Prioridad de investigación 2

Preparado para Sernapesca
Septiembre de 2018

A. Meyer, R. Sadler, B. Cowled, A. Cameron, J. Happold, A. Burroughs, C. Mackenzie

Descargo de responsabilidad

Este informe es para el uso exclusivo del cliente y se considera como información confidencial. Si ha recibido una copia de este informe por error, por favor elimínela y notifique al remitente. Ausvet no entrega garantías de que la información contenida en este reporte sea correcta o esté completa y no será responsable por ninguna pérdida causada, ya sea por negligencia o por otras circunstancias, que surja del uso de esta información o de la confianza puesta en esta última.

© 2018 Ausvet Pty Ltd

Este trabajo está protegido por derecho de autor y, aparte de cualquier uso legítimo permitido según la *Ley sobre Derecho de Autor de 1968*, ninguna parte de él se puede reproducir sin la autorización por escrito de los editores, Ausvet Pty Ltd. Las solicitudes o consultas relacionadas con la reproducción y los derechos se deberían dirigir a Ausvet, a la siguiente dirección.

Ausvet
Level 1, 34 Thynne St, Bruce, ACT 2617 Australia
www.ausvet.com.au
ABN: 64 613 142 9
Contacto: Angus Cameron
angus@ausvet.com.au

Contenidos

Lista de figuras.....	v
Lista de tablas.....	vi
Abreviaturas y siglas	vii
Resumen ejecutivo.....	1
1 Introducción.....	5
2 Objetivos	6
3 Métodos.....	7
3.1 Población de estudio y fuentes de datos.....	7
3.1.1 Fuentes de datos y manejo	7
3.1.2 Limpieza de datos y criterios de inclusión	8
3.2 Diseño del estudio.....	8
3.2.1 Tipo de estudio y unidad epidemiológico	8
3.2.2 Exposiciones primarias.....	9
3.2.3 Resultado de interés.....	9
3.2.4 Otras variables explicativas.....	9
3.2.5 Estudio e hipótesis de trabajo.....	10
3.3 Análisis estadístico.....	11
3.3.1 Enfoque general.....	11
3.3.2 Modelamiento de regresión estadística.....	11
3.3.3 Diagnóstico del modelo.....	12
3.3.4 Medias marginales posteriores	12
4 Resultados.....	13
4.1 Descripción general de los datos	13
4.2 Análisis de datos exploratorios.....	14
4.2.1 Carga de caligus al comienzo del período de observación.....	14
4.2.2 Tasa de tratamientos de baños recibidos desde el comienzo del ciclo hasta el período de observación.....	17
4.3 Modelamiento de efectos mixtos multinivel de los efectos de la carga de caligus y la tasa de tratamientos de baños sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis	18
4.3.1 Modelo del salmón del Atlántico	18
4.3.2 Modelo de trucha arcoíris.....	23
5 Discusión	27
5.1 Resumen e interpretación de resultados.....	27
5.1.1 Salmón del Atlántico.....	27
5.1.2 Trucha arcoíris.....	29
5.1.3 Ambas especies	29
5.1.4 Recomendaciones para el manejo de la carga de caligus con efectos adversos mínimos sobre la severidad de la piscirickettsiosis	30
5.2 Características del diseño y los métodos del estudio.....	31
5.2.1 Visión general del enfoque.....	31
5.2.2 Fuentes potenciales de sesgo.....	32

5.2.3 Aplicación de enfoques teóricos de la información	33
6 Otros enfoques potenciales al análisis.....	34
7 Conclusión	35
Agradecimientos.....	36
Referencias.....	37

Lista de figuras

Figura 1: Esquema de la relación propuesta entre la carga de caligus, tratamientos de baños piojicidas y la severidad de la piscirickettsiosis.	6
Figura 2 Distribución del conteo promedio de caligus al comienzo del período de observación, por especie.	14
Figura 3 Cantidad de períodos de observación con mortalidad atribuida a piscirickettsiosis igual a cero o al menos una mortalidad atribuida a piscirickettsiosis, por categoría de cantidad media de caligus por pez y especie de pez [panel superior]. Proporción de centros con mortalidad por piscirickettsiosis observada en los períodos de observación, por categoría de cantidad media de caligus por pez al comienzo del período y por especie de pez [panel inferior] Todas las etapas del caligus se consideraron en el conteo medio de caligus.	15
Figura 4 Mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación, por cantidad media de caligus por pez al comienzo del período, para observaciones con un riesgo de mortalidad distinto a cero. Todas las etapas del caligus se consideraron en el conteo medio de caligus.	16
Figura 5 Distribución de la tasa de tratamientos de baños (como cantidad de días de tratamiento desde la entrada al mar dividida por la cantidad total de días desde la entrada al mar hasta el período de observación) al comienzo del período de observación, por especie. Consulte Figure 2 para ver una nota sobre los diagramas de violín.....	17
Figura 6 Distribución de riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación, por tasa de tratamiento de baños desde la entrada al mar. La tasa de tratamiento de baños se calculó como la proporción de días de producción en los que se aplicó un tratamiento de baño.	17
Figura 7 Medias posteriores marginales y comparaciones del efecto de la carga de caligus sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis observadas durante el período de observación para diferentes tasas de tratamientos de baños en el salmón del Atlántico.	22
Figura 8 Medias marginales posteriores y comparaciones del efecto de la tasa de tratamientos de baños en el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis observadas durante el período de observación para diferentes valores de carga de caligus en el salmón del Atlántico.	23
Figura 9 Medias posteriores marginales y comparaciones del efecto de la tasa de tratamientos de baños en el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis observadas durante el período de observación para la trucha arcoíris.	26

Lista de tablas

Tabla 1 Normativas de SIFA relacionadas con los conteos de caligus (según Sernapesca, <i>Establece Programa Sanitario específico de vigilancia y control de Caligidosis: PSEVC-Caligidosis</i> . Resolución exenta N. 013, 09/01/2015).....	8
Tabla 2 Cantidad de ciclos de producción a nivel de jaula excluidos del análisis, por razón.....	13
Tabla 3 Cantidad de centros de producción en agua marina y ciclos de producción para los que se incluyeron observaciones a nivel de jaula, por empresa.....	13
Tabla 4 Estadística de resumen para el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis, por especie de pez	15
Tabla 5 Coeficientes de correlación entre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación y el conteo promedio de caligus por pez al comienzo del período de observación, para diferentes etapas del caligus incluidas en la variable de conteo de caligus.	16
Tabla 6 Selección y soporte de hipótesis para modelos de mortalidad por piscirickettsiosis, usando el enfoque de la teoría de la información, para observaciones de salmón del Atlántico.....	18
Tabla 7 Coeficientes de riesgo ajustados (o sea, coeficientes exponenciales del modelo) de mortalidad atribuida a piscirickettsiosis en promedio de modelo para observaciones de salmón Atlántico (N= 20 526).....	18
Tabla 8 Estadística de ajuste del modelo para los modelos mínimo y soportado para observaciones en el salmón del Atlántico	20
Tabla 9 Selección y soporte de hipótesis para modelos de riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación, usando un enfoque de teoría de la información, para observaciones de trucha arcoíris.	23
Tabla 10 Coeficientes de riesgo ajustados (o sea, coeficientes de modelo exponenciales) de riesgo de mortalidad atribuida a piscirickettsiosis durante el período de observación en base al promedio del modelo para las observaciones en trucha arcoíris (N= 4 438).	23
Tabla 11 Estadística de ajuste del modelo para los modelos mínimo y soportado para observaciones en la trucha arcoíris	25

Abreviaturas y siglas

Abreviatura	Definición
AICc	criterio de información de Akaike corregido
CI	intervalo de confianza
PIISAC	Plataforma Integrada de Investigación Sanitaria para la Acuicultura Chilena
Sernapesca	Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura
SIFA	Sistema de Información para la Fiscalización de Acuicultura
SRS	Piscirickettsiosis
VIF	Factor de inflación de varianza

Resumen ejecutivo

Introducción

Este estudio es el tercero en una serie de estudios epidemiológicos integrados sobre piscirickettsiosis y caligidosis (infestación con caligus) financiado por el gobierno de Chile y realizado por Ausvet, en colaboración con la industria acuícola salmonera chilena. Involucra el análisis de los datos generados por la industria recolectados en una plataforma de investigación segura. Esta plataforma fue desarrollada específicamente para apoyar estudios epidemiológicos de interés sanitario, importantes para la acuicultura salmonera. Este estudio apunta a cuantificar el efecto de la carga de caligus y el tratamiento de baños piojicidas sobre la mortalidad por piscirickettsiosis en los salmones de cultivo en Chile.

Objetivos

Aunque la evidencia sugiere una fuerte interacción entre la carga de caligus y la severidad de la piscirickettsiosis, la investigación a la fecha se ha realizado en estanques bajo condiciones ambientales controladas. Además, hay poca evidencia disponible para describir el efecto de los tratamientos de baños piojicidas sobre la severidad de la piscirickettsiosis. Este estudio apunta a medir el efecto de la carga de caligus (específicamente, *C. rogerresseyi*), los tratamientos de baños piojicidas y la interacción entre la carga y los baños sobre la severidad de la piscirickettsiosis en los sistemas de acuicultura comercial en Chile. Este estudio no está diseñado para evaluar la efectividad de los baños como medida de control para la infestación de caligus.

Hallazgos clave

Hallazgos clave del estudio

Nuestro estudio confirma que la carga de caligus afecta la supervivencia de los salmones infectados con *P. salmonis* y demuestra que los tratamientos de baños utilizados para controlar el caligus pueden, en sí mismos, contribuir a una mayor severidad de la piscirickettsiosis.

Salmón del Atlántico

La carga de caligus y la tasa de tratamientos de baños tienen un efecto acumulativo sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis cuando la tasa de baños es menor a 5% de los días de producción. Para jaulas con baños más frecuentes (tasa de baños de 5% o más días de producción), el efecto del aumento de la carga de caligus sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis ya no es estadísticamente significativo.

Trucha arcoíris

La tasa de baños para el tratamiento del caligus tiene un mayor efecto en el aumento del riesgo de la mortalidad por piscirickettsiosis que mayores cargas de caligus.

Recomendación en ambas especies

Minimizar los tratamientos de baños para el control del caligus puede resultar en reducciones sustanciales del riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis, particularmente para la trucha arcoíris. Recomendamos que los productores de salmón del Atlántico y de trucha arcoíris evalúen la tasa de baños y el umbral del conteo de caligus que, en conjunto, minimizan la pérdida asociada a la piscirickettsiosis y a otras

enfermedades. Los centros de cultivo pueden explorar el uso de otros métodos de control del caligus que tienen menor probabilidad de influir sobre la susceptibilidad a la piscirickettsiosis.

Métodos

Este estudio se realizó en la industria acuícola comercial en el sur de Chile, usando datos sanitarios y de manejo desde las empresas, obtenidos desde sus sistemas de manejo de datos de rutina. Los datos de conteos de caligus y de presión de infección por piscirickettsiosis se obtuvieron desde la base de datos del Sistema de Información para la Fiscalización de la Acuicultura (SIFA) y se integraron con los datos generados por la industria para formar un conjunto de datos único y holístico.

El diseño del estudio fue un estudio longitudinal retrospectivo, con un nivel de observación a nivel de jaula como la unidad estadística. Se inició una observación a nivel de jaula cada vez que se realizó un conteo de caligus en una jaula de agua marina. Por ende, cada ciclo de producción a nivel de jaula incluido en el estudio contribuyó con una o más observaciones al conjunto de datos. El resultado de interés fue el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis a nivel de jaula durante el período de observación, definido como un período de 30 días después del conteo de caligus.

Las exposiciones primarias de interés fueron la carga de caligus y los tratamientos piojicidas. La carga de caligus se definió como la cantidad promedio de caligus por pez al comienzo del período de observación. La exposición al tratamiento contra el caligus se definió como una tasa de tratamientos por baños; la proporción de días desde la entrada al mar hasta el comienzo del período de observación durante el que ocurrió el baño. Se identificaron otras variables desde la literatura, desde consultas con expertos y desde los resultados del estudio anterior de Ausvet, que identificó otros factores de riesgo asociados con la mortalidad por piscirickettsiosis. Estas variables se incluyeron en el modelo, para controlar confusiones potenciales.

Se definieron siete hipótesis biológicamente plausibles, que se investigaron usando un enfoque de teoría de la información. El enfoque de modelamiento se basó en modelos mixtos y binomiales negativas. Los modelos en competencia se organizaron en base a su ponderación de Akaike calculada desde su criterio de información de Akaike corregido (AICc). El modelamiento se realizó por separado para el salmón del atlántico y para la trucha arcoíris debido a diferencias probables en la susceptibilidad de la especie a la coinfección y a las prácticas de manejo.

Resultados

Se incluyó un total de 4 778 ciclos de producción válidos en el estudio, que van desde el 1° de enero de 2012 al 6 de junio de 2018, y que cubren 157 centros marinos en 47 barrios. Se definió un total de 25 263 observaciones a nivel de jaula.

El análisis de datos exploratorios mostró que hubo muy poca variación en la carga de caligus en el salmón Coho, y que no se aplicaron tratamientos piojicidas a esta especie durante nuestro período de estudio. Consecuentemente, no consideramos al salmón Coho en este estudio. Los resultados descriptivos mostraron que la asociación entre la mortalidad por piscirickettsiosis y la carga de caligus apareció levemente más sólida cuando se dio cuenta de todas las etapas del caligus en la variable de carga de caligus; se usaron todas las etapas en la parte de modelamiento multivariable del estudio.

Salmón del Atlántico

En el salmón del atlántico, el modelo con mejor soporte fue el modelo completo multivariable incluyendo la carga de caligus, la tasa de tratamientos de baños como un predictor cuadrático, y el término de interacción entre el conteo de caligus y la tasa de tratamientos de baños. El otro modelo soportado contuvo las mismas variables, menos el término de interacción. Hubo una diferencia de AICc de 43 puntos con el siguiente modelo, lo que sugiere que los dos mejores modelos tuvieron un ajuste significativamente mejor con los datos que el modelo mínimo.

El promedio de modelos reveló una asociación lineal positiva importante entre la carga de caligus y el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación, o sea, las jaulas con mayores conteos de caligus promedio tuvieron un riesgo de mortalidad significativamente mayor en los 30 días después del conteo de caligus. Debido a una asociación lineal y cuadrática relevante entre los tratamientos de baños y el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis, la dirección del efecto de la tasa de baños anteriores cambió a medida que la tasa de baños aumentó. El efecto lineal de la tasa de tratamientos de baños fue mayor que el efecto lineal de la carga de caligus, lo que sugiere una mayor influencia de tasas anteriores de baños en el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis (comparado con la carga de caligus) para jaulas bañadas relativamente con poca frecuencia.

Los resultados del modelamiento soportaron un efecto de interacción entre la carga de caligus y la tasa de tratamiento de baños, que influyó sobre el efecto de cada exposición en el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación. Para una carga de caligus dada, el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación fue mayor si era antecedido por mayores tasas de baños (para tasas de baños de 5% o menos). Para una tasa de baños dada (para tasas de baños menores al 5%), el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación es mayor si se antecede por mayores conteos de caligus. A tasas de baños mayores a 5%, el efecto de un aumento de la carga de caligus sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación ya no fue significativo. En otras palabras, cuando se antecede por una tasa de baños mayor a 5%, el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación fue el mismo, independiente de si el conteo de caligus fue cero o 10.

Trucha arcoíris

En la trucha arcoíris, los dos modelos que incluyeron la carga de caligus y la tasa de tratamiento de baños como un predictor cuadrático, con y sin una interacción entre las dos exposiciones, fueron los que contaron con el mayor soporte de los datos. Hubo una diferencia de ocho puntos de AICc con el modelo con menos soporte, lo que indica que, en general, las diferencias entre todos los modelos fueron pequeñas.

La asociación entre la carga de caligus y el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación no fue estadísticamente significativo, ni tampoco lo fue el término de interacción entre la carga de caligus y la tasa de tratamientos de baños. La tasa de tratamientos de baños tuvo una asociación positiva y estadísticamente significativa con el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación.

Ambas especies

En ambas especies, la inclusión de la carga de caligus y la tasa de tratamientos de baños no aumentó la potencia explicativa de los modelos, comparados con el modelo mínimo, según lo indica el porcentaje de varianza explicado por los modelos multivariable. Esto sugiere que aunque estas variables tienen un efecto sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis, mucha de la variabilidad en la mortalidad por piscirickettsiosis sigue sin explicación mediante factores de carga de caligus y de tratamientos piojicidas. Además, las variables incluidas en el modelo mínimo (potenciales confusores, así como las variables relacionadas con la agrupación espaciotemporal) solo explicaron alrededor de 22% y 31% de la variabilidad total en el resultado de la mortalidad por piscirickettsiosis, en el salmón del Atlántico y en la trucha arcoíris, respectivamente. Este hallazgo es consistente con los hallazgos de nuestro estudio anterior, que mostraron que aunque varias variables estuvieron asociadas con la mortalidad por piscirickettsiosis, el efecto de cada una fue de pequeño a mediano. Esto destaca la alta variabilidad de la incidencia de piscirickettsiosis y sugiere la existencia de otros factores que tienen una influencia mayor en la mortalidad por piscirickettsiosis de los que aún no se da cuenta.

Este estudio entregó evidencia adicional para soportar las siguientes variables como factores que reducen la supervivencia de los peces cuando hay piscirickettsiosis presente: latitudes más altas, temperatura mayor del agua marina, menores niveles de oxígeno, mayor presión de infección del barrio y mayor duración en el mar. En este análisis se dio cuenta de la estacionalidad, en parte incluyendo la temperatura del agua marina en los modelos.

Discusión y conclusiones

Los resultados de este análisis demuestran la compleja naturaleza de la interacción entre la carga de caligus, los tratamientos de baños y su efecto combinado sobre la severidad de la piscirickettsiosis. Es importante mencionar que muchos resultados clave se relacionan a decisiones o prácticas de manejo e indican formas prácticas y accionables en las que las pérdidas y el uso de antimicrobianos asociados con la piscirickettsiosis se podrían minimizar (vea el cuadro anterior).

La fortaleza de nuestros resultados está soportada por el gran conjunto de datos y la exhaustividad del análisis; sin embargo, existen algunas salvedades importantes. Primero, aunque los resultados son altamente válidos para las empresas participantes (sobre cuyos datos se realizaron los análisis), estas empresas pueden no ser representativas de la industria. Entonces, estos resultados no se pueden extrapolar fácilmente a la industria en su totalidad. Segundo, se espera que la precisión de la medición y el registro de la exposición y las variables de resultado (incluyendo la clasificación de mortalidad atribuida a piscirickettsiosis en la ausencia de un diagnóstico de laboratorio) sean imperfectos. Tales errores pueden introducir un sesgo en los resultados (y debilitar la validez interna del estudio), pero el grado y la dirección de cualquier sesgo no se puede determinar fácilmente. Sin embargo, este análisis se basa en los datos de empresas que representan los mejores datos disponibles actualmente.

Finalmente, recomendaciones sólidas acerca de programas óptimos de control de caligus deberían considerar los hallazgos de este estudio en conjunto con otras investigaciones, además de análisis económicos que consideren los costos y externalidades del tratamiento. El trabajo futuro puede enfocarse en la evaluación de resultados económicos y en el desarrollo de herramientas de soporte a la toma de decisiones basadas en las formas económicamente óptimas de controlar la infestación por caligus.

1 Introducción

El efecto combinado de la piscirickettsiosis (SRS) y el amplio uso de antimicrobianos son una gran amenaza para la rentabilidad y la sustentabilidad de la industria acuícola salmonera chilena. Además de las pérdidas directas asociadas con la piscirickettsiosis, las grandes cantidades de antimicrobianos administrados ha contribuido a precios persistentemente menores para el salmón chileno en los mercados internacionales. Globalmente, hay cada vez más preocupación acerca de los efectos del uso de antimicrobianos en la acuicultura; el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos; y las amenazas asociadas para la salud de las personas, los animales y el medio ambiente marino. Un manejo exitoso y sustentable de la piscirickettsiosis lógicamente recae en la prevención más que en la cura. En la industria acuícola hay factores que compiten y que interactúan (por ej., otras enfermedades e intervenciones de rutina) que pueden influir en la severidad de la piscirickettsiosis (Jakob et al., 2014). Saber cómo y en qué magnitud estos factores tienen un papel sobre la morbilidad y mortalidad por piscirickettsiosis permitirán tomar decisiones informadas sobre la mejor forma de reducir las pérdidas y evitar el uso innecesario de antimicrobianos.

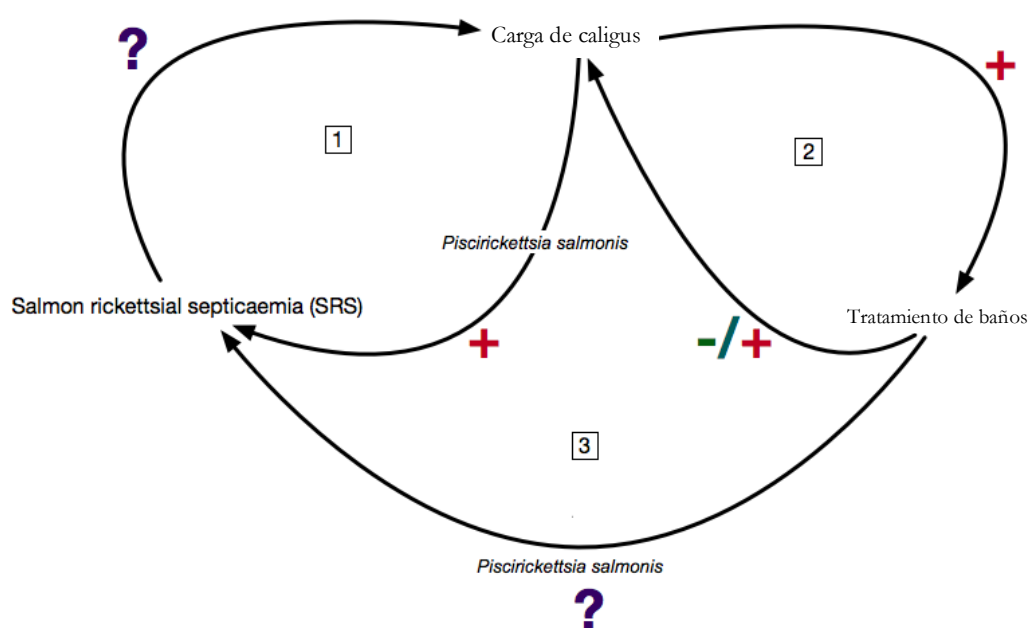
La creciente evidencia sugiere que la coinfección de salmónidos con caligus aumenta la severidad de la infección por *Piscirickettsia salmonis*, que resulta en una mayor mortalidad por piscirickettsiosis (Figueroa et al., 2017; Lhorente, Gallardo, Villanueva, Carabano y Neira, 2014). Bajo condiciones controladas, las tasas de mortalidad por piscirickettsiosis en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) coinfectado con *P. salmonis* y caligus *Caligus rogerresseyi* se demuestran como significativamente mayores que las tasas observadas sin infestación por caligus (Figueroa et al., 2017; Lhorente et al., 2014). Los efectos perjudiciales del caligus en la fisiología del pez y la integridad de su piel se piensa que aumentan la susceptibilidad del pez a una infección inicial con *P. salmonis* o, si ya está infectado, aumenta la progresión de la enfermedad y empeora los resultados de esta (M. P. González, Marín y Vargas-Chacoff, 2015; Tadiso et al., 2011).

Los fármacos antiparasitarios administrados en el alimento y los fármacos administrados a través de tratamientos de inmersión (o sea, baños) son métodos utilizados para el control del caligus en la acuicultura comercial (L. González, Robles y Cortéz San Martín, 2016). La efectividad de los tratamientos farmacológicos contra el caligus pueden variar dependiendo de factores como la sensibilidad del caligus al químico y el riesgo de una nueva infestación desde centros de cultivo aledaños (Arriagada et al., 2017). Sernapesca implementa un monitoreo sanitario y programas de control para *C. rogerresseyi* diseñados para mantener los conteos de caligus bajo un promedio por centro de tres hembras ovígeras (Orrego, 2015). Los tratamientos de baños usualmente involucran concentrar a los peces en un volumen menor de agua; estas condiciones pueden estresar a los peces y aumentar la transmisión de patógenos. Jakob et al. (2014) encontraron una asociación significativa entre la cantidad de tratamientos contra el caligus y la severidad de la piscirickettsiosis para la trucha arcoíris, pero no para el salmón del Atlántico. El estudio de Jakob et al. (2014) no especificó el método de los tratamientos contra el caligus ni dio cuenta de la magnitud de la carga de caligus en sus análisis. Los efectos específicos de los baños sobre la severidad de la piscirickettsiosis, son, así, desconocidos. En un programa sanitario holístico diseñado para minimizar las pérdidas asociadas con la piscirickettsiosis, los beneficios de reducir la carga de caligus a través de baños se debería equilibrar con un conocimiento de si el baño mismo puede influir en la cantidad de enfermedad a causa de la piscirickettsiosis.

Este estudio es el tercero de una serie de estudios epidemiológicos integrados sobre la piscirickettsiosis y la caligidosis (infestación por caligus *C. rogerresseyi*) financiados por el gobierno chileno y realizados por Ausvet en colaboración con la industria acuícola salmonera chilena. Involucra el análisis de datos generados por la industria recolectados en una plataforma de investigación segura, desarrollada específicamente para apoyar estudios epidemiológicos sobre temas sanitarios que son de importancia para la acuicultura salmonera.

2 Objetivos

Figura 1 presenta un esquema para las interacciones propuestas entre la carga de caligus (*C. rogerresseyi*), tratamientos de baños piojicidas y contra la piscirickettsiosis en los sistemas de acuicultura comercial en Chile. El esquema muestra tres bucles de retroalimentación que interactúan, donde la dirección del efecto propuesto (positivo, negativo o desconocido) se basa en la evidencia científica o, en la ausencia de evidencia, en la plausibilidad biológica.



[1] En combinación con la infección por *P. salmonis*, la infestación por caligus puede reducir las defensas inmunes y/o crear rutas de entrada para la infección, que resultan en una mayor cantidad de enfermedad por piscirickettsiosis (M. P. González et al., 2015; Tadiso et al., 2011). La dirección del efecto de la piscirickettsiosis sobre la carga de caligus es desconocida. Proponemos que una mayor morbilidad y mortalidad por piscirickettsiosis puede aumentar la infestación por caligus a través de una mayor reducción de la defensa inmune o que puede reducir la carga de caligus general al sacar a los peces muertos infestados desde la población; [2] El nivel de carga de caligus puede dictar la cantidad de tratamientos de baños. Desde un punto de vista normativo, una vez que los conteos de caligus exceden cierto umbral, se deben implementar medidas de control para reducir la carga (Orrego, 2015). A su vez, el tratamiento puede reducir o aumentar la infestación dependiendo de la efectividad del tratamiento (Arriagada et al., 2017); [3] Hay poca evidencia disponible para describir el efecto de los tratamientos de baños piojicidas en la severidad de la piscirickettsiosis. Se propone que, en combinación con la infección por *P. salmonis*, los tratamientos de baños predisponen una mayor enfermedad por piscirickettsiosis a través de un mayor estrés y una mayor transmisión de patógenos.

Figura 1: Esquema de la relación propuesta entre la carga de caligus, tratamientos de baños piojicidas y la severidad de la piscirickettsiosis.

Aunque la evidencia sugiere una fuerte interacción entre la carga de caligus y la severidad de la piscirickettsiosis, la investigación a la fecha se ha realizado en estanques bajo condiciones ambientales controladas. Además, hay poca evidencia disponible para describir el efecto de los tratamientos de baños piojicidas sobre la severidad de la piscirickettsiosis. Este estudio apunta a medir el efecto de la carga de caligus (específicamente, *C. rogerresseyi*), los tratamientos de baños piojicidas y la interacción entre la carga y los baños sobre la severidad de la piscirickettsiosis en los sistemas de acuicultura comercial en Chile. Este estudio no está diseñado para evaluar la efectividad de los baños como medida de control para la infestación de caligus.

3 Métodos

3.1 Población de estudio y fuentes de datos

3.1.1 Fuentes de datos y manejo

Datos generados por la industria

Este estudio se realizó en la industria acuícola salmonera comercial en el sur de Chile. Actualmente, hay 21 empresas involucradas en el cultivo de salmón del Atlántico, salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) y/o trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en la región de Los Lagos, la región de Aysén y la región de Magallanes. De estas, siete empresas entregan voluntariamente datos sanitarios y de manejo detallados desde sus sistemas de manejo de datos rutinarios (Fishtalk, Mercatus y Farmcontrol) hacia una plataforma de investigación segura diseñada para dar soporte a estudios epidemiológicos. Una copia de seguridad completa de la base de datos de cada empresa se carga semanalmente a un almacenamiento seguro en la nube, donde se integra y se pone a disposición para el análisis epidemiológico. La mayor parte de los datos usados en este estudio se originó en los datos generados por la industria.

Datos normativos

El conteo de caligus (*C. rogerresseyi*) y los datos de presión de infección por piscirickettsiosis del barrio se obtuvieron desde la base de datos del Sistema de Información para la Fiscalización de Acuicultura (SIFA) y se integraron con los datos generados por la industria, para formar un solo conjunto de datos holístico. Las observaciones de SIFA a nivel de jaula se hermanaron con los datos de las empresas a nivel de jaula, usando un identificador único de jaula, un identificador único de centro y una fecha de observación común. Toda vez que se mencione al caligus en este informe, se hace referencia a *C. rogerresseyi*. Los registros de mortalidad y el conteo de caligus se extrajeron de la base de datos SIFA entregados por el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (Sernapesca). La base de datos SIFA se lanzó a finales de 2010 y contiene datos completos desde enero de 2012. Por lo tanto, los datos generados por la industria y los datos normativos se usaron desde 2012 en adelante. Además, el identificador de centro de SIFA no estuvo disponible para algunos centros marinos en los datos de empresas (4 centros de 252). Debido a que estos centros no se pudieron hermanar con sus registros en SIFA, se excluyeron desde el conjunto de datos.

El esquema de monitoreo del caligus de Sernapesca impone conteos regulares de caligus en las jaulas de agua marina (Tabla 1). Para cada muestreo, se muestrean 10 peces desde 4 jaulas (o desde todas las jaulas si el centro tiene menos de 4 jaulas sembrados). Las jaulas se deberían elegir de manera aleatoria en cada muestreo. El caligus se cuenta por etapas, juveniles, hembras ovígeras (HO) y adultos móviles (AM, se excluye a HO). Los muestreos de caligus comienzan en un máximo de 30 días después de que la siembra de la primera jaula en el centro se ha completado.

Tabla 1 Normativas de SIFA relacionadas con los conteos de caligus (según Sernapesca, *Establece Programa Sanitario específico de vigilancia y control de Caligidosis: PSEVC-Caligidosis*. Resolución exenta N. 013, 09/01/2015).

Clasificación de centro	Condiciones	Frecuencia de conteos de caligus
Centros de Alta Vigilancia	Centros de salmón del Atlántico y de trucha arcoíris en la región de Los Lagos y de Aysén, excepto los barrios 4A y 4B.	semanalmente
Centros de Baja Vigilancia	Centros de salmón del Atlántico y de trucha arcoíris en la región de Magallanes y en los barrios 4A y 4B de la región de Los Lagos Todos los centros de salmón Coho	mensualmente

3.1.2 Limpieza de datos y criterios de inclusión

Los datos desde cada empresa se extrajeron desde las tablas relevantes de su software de manejo, y se compilaron como un solo conjunto de datos. Los códigos comunes como los nombres de las especies, de las enfermedades y de los tipos de tratamiento, se extrajeron y unificaron para producir una sola denominación para cada elemento. Se inspeccionaron los valores numéricos, se armonizaron las unidades de medición y se eliminaron los valores biológicamente improbables.

En este estudio, solo consideramos la fase de producción en agua marina. Un ciclo de producción se definió como desde la primera fecha de siembra a la última fecha de cosecha de un grupo de peces sembrados en una jaula marina dada. Desde el punto de vista administrativo de la empresa, comúnmente se acepta que los ciclos de producción incluyen todas las jaulas en un centro marino dado, sembrados durante un intervalo de tiempo establecido. Sin embargo, para los fines de nuestro análisis, la definición de ciclo consideró que cada jaula contribuyó al análisis como una unidad individual. Consecuentemente, para los fines de este informe, el término "ciclo de producción" se refiere a un grupo de peces a nivel de jaula. Los ciclos de producción se consideraron como válidos por una duración de 6 meses o más y el peso promedio de salmones jóvenes en su entrada al mar fue menor a 500 g. Estos criterios garantizaron que los centros de stock de reproducción no se incluyeran erróneamente en el conjunto de datos.

3.2 Diseño del estudio

3.2.1 Tipo de estudio y unidad epidemiológico

Este estudio se basó en la integración y el análisis de datos generados de manera rutinaria por las empresas acuícolas. Constituyó un estudio observacional que ocurre en un escenario comercial en el "mundo real", y tuvo todas las características de un estudio longitudinal retrospectivo. Las jaulas se clasificaron de manera retrospectiva en base a su estado de exposición (con respecto a la carga de caligus y el tratamiento de baños piojicidas) y a los resultados relacionados con la piscirickettsiosis por un período de observación definido.

La unidad epidemiológica de interés fue el ciclo de producción a nivel de jaula; este fue el nivel en el que se realizaron los conteos de caligus, en el que ocurrió el tratamiento piojicida y el nivel más bajo en el que se registraron muchas variables. Además, el análisis de datos exploratorio inicial mostró que la varianza entre jaulas de los conteos de caligus fue frecuentemente alta, con cerca de 40% de los conteos siendo significativamente diferentes entre jaulas, lo que limita el potencial de uso de un promedio a nivel de centro.

La unidad estadística para el análisis fue la observación a nivel de jaula. Una observación a nivel de jaula se inició cada vez que se realizó un conteo de caligus en una jaula de agua marina. El resultado de interés

fue el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis a nivel de jaula durante un período de 30 días después de un conteo de caligus (en adelante, el "período de observación"). El período de observación se estableció en 30 días, ya que corresponde aproximadamente al doble del período de incubación hipotético de la piscirickettsiosis (Rozas & Enríquez, 2014; Smith et al., 2004) y dentro del tiempo requerido para observar una diferencia medible en la tasa de mortalidad por piscirickettsiosis entre peces infestados y peces libres de caligus (Figueroa et al., 2017; Lhorente et al., 2014).

A lo largo de un ciclo de producción, se puede seleccionar una sola jaula para el conteo de caligus más de una vez. Si el período de observación de 30 días para un conteo de caligus se superpuso con evento(s) de conteos de caligus posteriores, solo la primera observación a nivel de jaula se incluyó en el análisis para evitar contar dos veces (pseudo conteo) entre las unidades estadísticas. Para obtener observaciones completas de 30 días a nivel de jaula, y para evitar una censura por la derecha de los datos, se retiraron las observaciones que ocurrieron en menos de 30 días antes de la cosecha.

3.2.2 Exposiciones primarias

Las exposiciones primarias de interés son la carga de caligus y los tratamientos de baños piojicidas. Las variables de exposición usadas en el modelo se definen como sigue:

- **carga de caligus:** cantidad promedio de caligus por pez al comienzo del período de observación (MeanLice, CaligusPromedio). Se usó un análisis exploratorio de datos para determinar cuáles etapas de caligus se incluirían en la variable de exposición de carga de caligus (consulte Tabla 5)
- **tratamiento de baño piojicida:** tasa diaria de tratamientos de baños usados para controlar el caligus, calculada como la cantidad total de días de baños dividida por el período, en días, desde la entrada al mar a la observación a nivel de jaula (BathTreatmentRate, TasaTratamientoBaños). Los tratamientos de baños usados para controlar otras infecciones e infestaciones no se consideraron en este estudio. Esta variable entrega una medida del efecto acumulativo de los baños hasta el momento del período de observación. Esta variable se denomina "tasa de tratamientos de baños" en el resto de este documento.

3.2.3 Resultado de interés

Como una medida de la severidad de la piscirickettsiosis, el resultado de interés es la mortalidad atribuida a la piscirickettsiosis durante el período de observación, medido como un riesgo de mortalidad. El riesgo de mortalidad se calculó de la siguiente forma:

$$\text{riesgo de mortalidad} = \frac{\text{suma de piscirickettsiosis} - \text{conteo de mortalidad atribuido durante el período de observación}}{\text{cantidad de peces presentes al comienzo del periodo de observación}}$$

3.2.4 Otras variables explicativas

Se ha realizado una investigación previa sobre el efecto del caligus sobre la mortalidad por piscirickettsiosis, realizada en estanques cerrados donde los factores ambientales y de otra naturaleza se podían controlar. En este estudio utilizamos datos de peces cultivados en ambientes muy poco controlados, donde factores diferentes a la carga de caligus y a la tasa de tratamientos de baños pueden afectar el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis. Hemos identificado una cantidad de estos factores de riesgo desde la literatura científica, a través de consultas con expertos y desde los resultados de un estudio previo realizado por Ausvet. Incluimos estos factores (variables) en el análisis para aislar su efecto desde aquel de la carga de caligus y la tasa de tratamiento de baños. Las variables incluidas en el modelamiento son las siguientes:

- Factores a nivel de pez
 - Edad del pez: edad del pez al comienzo del período de observación, en cantidad de días desde su entrada al mar (FishAge, EdadPez).
- Factores ambientales

- Temperatura: temperatura promedio del agua durante el período de observación de un mes, en grados Celsius (Temperature, Temperatura).
- Oxígeno: nivel promedio de oxígeno disuelto durante el período de observación, en miligramos por litro (Oxygen, Oxígeno).
- Latitud: latitud del centro en grados decimales (Latitude, Latitud). La latitud se incluyó como una variable numérica y fue desde -53.23 grados para el centro más al sur a -41.69 grados para el centro más al norte. La longitud del centro no se incluyó ya que la variable tiene una relevancia mínima en Chile debido a la forma elongada del país. Además, la variable no fue significativa en los estudios anteriores hechos por Ausvet y, por lo tanto, no se incluyó aquí para ahorrar trabajo.
- Presión del barrio: la presión de infección del barrio, calculada como el promedio ponderado de densidad de la tasa de mortalidad por piscirickettsiosis al inicio del período de observación, en todos los centros marinos dentro de un radio de 20 kms. Estos cálculos se basaron en una metodología publicada anteriormente (Rees et al., 2014). La ponderación tuvo una relación inversa a las distancias marinas entre centros (NeighbourhoodPressure, PresiónBarrio).
- Cofactores temporales incluidos para dar cuenta de la agrupación temporal:
 - Año calendario: año calendario al comienzo del período de observación (CalendarYear, AñoCalendario).

3.2.5 Estudio e hipótesis de trabajo

Se identificaron tres hipótesis biológicamente plausibles, que representan la naturaleza de la interacción entre la carga de caligus, la tasa de tratamientos de baños y el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis, en base a conversaciones con las partes interesadas y la literatura existente:

1. Los peces con más caligus tienen un mayor riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis debido a los cambios fisiológicos asociados con la infestación y/o con lesiones cutáneas causadas por la parasitosis, que permiten una ruta de entrada para *P. salmonis*.
2. Los peces expuestos a una mayor tasa de tratamientos de baños para el control de caligus tienen un mayor riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis debido al estrés y/o a una mayor oportunidad para la transmisión de patógenos causada por las condiciones del baño. En base a los hallazgos de Jakob et al. (2014), la posible asociación no lineal entre el resultado y la tasa de los tratamientos de baños se consideró incluyendo BathTreatmentRate (TasaTratamientoBaño) como términos lineales y cuadráticos en los modelos correspondientes.
3. El nivel de carga de caligus y la tasa de baños interactúan para influir sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis. Es probable que la interacción sea compleja debido a factores biológicos y no biológicos (por ej., requerimientos normativos). Por esta razón, no se hacen supuestos anteriores acerca de la dirección y la naturaleza de esta interacción.

Estas hipótesis biológicas se representan con siete hipótesis estadísticas de trabajo, que se usan en el análisis para medir el soporte para las tres hipótesis biológicas.

- Hipótesis 1: La carga de caligus y la tasa de tratamientos de baños piojicidas no se asocian con el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis.
- Hipótesis 2: La carga de caligus está linealmente asociada con el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis.
- Hipótesis 3: La tasa de tratamientos de baños piojicidas está linealmente asociada con el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis.
- Hipótesis 4: Tanto la carga de caligus como la tasa de tratamientos de baño están linealmente asociadas con el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis.

- Hipótesis 5: La carga de caligus está linealmente asociada con la mortalidad por piscirickettsiosis y la tasa de tratamientos de baños piojicidas no está linealmente asociada con el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis.
- Hipótesis 6: Tanto la carga de caligus como la tasa de tratamientos de baños piojicidas están linealmente asociados con la mortalidad por piscirickettsiosis y hay una interacción entre ambas exposiciones.
- Hipótesis 7: La carga de caligus está linealmente asociada con el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis, la tasa de tratamientos de baños piojicidas no está linealmente asociada con el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis y hay una interacción entre estas dos exposiciones.

3.3 Análisis estadístico

3.3.1 Enfoque general

Se tomaron varios pasos para controlar la agrupación en los datos dada la estructura jerárquica de los centros y los factores de manejo. Se incluyó al ciclo de producción a nivel de jaula, centro y barrio como efectos aleatorios anidados. Como solo hubo datos disponibles para seis empresas, se incluyó un factor de empresa como un efecto fijo. La región geográfica no se incluyó ya que no fue un predictor significativo en el estudio anterior hecho por Ausvet. Se definió un modelo mínimo y uno de ordenada en el origen. El modelo de ordenada en el origen incluyó solo los efectos aleatorios y el efecto fijo de la empresa, mientras que el modelo mínimo incluyó tanto los efectos aleatorios como los confusores potenciales mencionados en la anterior sección 3.2.4.

Consistente con el enfoque de teoría de la información (Burnham y Anderson, 2002), se desarrollaron siete modelos estadísticos en base a las hipótesis de trabajo. Los modelos *a priori* considerados se obtuvieron agregando la(s) variable(s) explicativa(s), correspondientes a cada hipótesis, al modelo mínimo. El modelo para la hipótesis 1 fue, efectivamente, el modelo mínimo sin exposiciones primarias.

Los modelos se clasificaron según su ponderación de Akaike, calculada desde su criterio de información de Akaike corregido (AICc) (Akaike, 1974). Estas ponderaciones reflejan la importancia relativa de cada modelo, dato el conjunto de hipótesis *a priori* consideradas. Luego, las ponderaciones de Akaike se aplicaron en un promedio ponderado de los modelos, generando el modelo final desde el que se sacaron las inferencias y las predicciones del modelo. Debido a que los modelos fueron ponderados por su ponderación de Akaike en la estimación del modelo final, solo los modelos con una ponderación de Akaike diferente a cero estaban, efectivamente, contribuyendo a los coeficientes del modelo final. Además, los modelos con una diferencia entre AICc y el modelo con mejor soporte mayor a diez puntos se consideraron como que se desempeñan de manera marginalmente buena en relación a otros modelos, y se les asignó una ponderación igual a cero (Burnham y Anderson, 2002).

3.3.2 Modelamiento de regresión estadística

Los datos se describieron primero a través de resúmenes descriptivos exploratorios, como se informó en la sección 4.2. Una evaluación bruta de la potencia y la dirección de las asociaciones entre cada variable de exposición primaria y el resultado se midieron usando la correlación de rangos de Spearman. Donde hubo sospechas de relaciones segmentadas entre exposiciones primarias y resultados, se usó un modelo de regresión lineal de una variable para evaluar la naturaleza de tales relaciones.

La distribución de la variable de resultado mostró que muchos de los eventos de muestreo de caligus no tuvieron mortalidad por piscirickettsiosis asociada a ellos (7 799 de 20 526 (38%) eventos en salmón del Atlántico y 1 850 de 4 438 (42%) eventos en trucha arcoíris). Sin embargo, el análisis primario mostró que el AICc de un modelo binomial negativo inflado por ceros equivalente no fue diferente al AICc del modelo binomial negativo. Como regla general de ahorro en los modelos, el modelo con el menor número de parámetros (binomial negativo) se seleccionó como el modelo de preferencia. La gran cantidad de observaciones con una mortalidad por piscirickettsiosis igual a cero se representó con el modelo binomial negativo de sobre dispersión.

Aplicamos modelamiento multivariable usando un modelo binomial negativo de efecto mixto de los datos de conteo de mortalidad atribuida a piscirickettsiosis durante el período de observación. El modelamiento adoptó un marco de regresión de efecto mixto lineal generalizado usando el paquete *lme4* (Bates, Mächler, Bolker y Walker, 2015), implementado en el ambiente estadístico R (R Development Core Team, 2018). Se hizo un offset de la suma de conteos de mortalidad atribuida a piscirickettsiosis usando el logaritmo natural del tamaño de la población al comienzo del período de observación, modelando efectivamente el resultado como un riesgo de mortalidad (Cameron y Trivedi, 2013). Además, cada variable explicativa valorizada continuamente se escaló a un puntaje z (o sea, centrado en tener una media de 0 y escalado para tener una desviación estándar de 1).

El salmón del Atlántico y la trucha arcoíris se modelaron por separado debido a diferencias importantes en los ciclos de producción y en el manejo. O sea, el conjunto de datos completo se estratificó por especie y ocurrieron análisis independientes para el salmón del Atlántico y la trucha arcoíris. El análisis de datos exploratorios mostró que las jaulas de salmón Coho en general tienen pequeñas cantidades de caligus, con poca variabilidad, y no fueron objeto de tratamientos de baños. Además, estudios previos han demostrado la baja susceptibilidad del salmón Coho a la infestación por *C. rogerresseyi* (Bravo, 2003; Yatabe, Arriagada, Hamilton-West y Urcelay, 2011). Consecuentemente, el salmón Coho no fue analizado en la parte de modelamiento del estudio.

Las variables con un alto factor de inflación de varianza (VIF) (>3) indican que se debería eliminar una alta colinealidad para mejorar la estimación del coeficiente (Zuur, Ieno y Elphick, 2010). El ajuste de la colinealidad no se requirió en este estudio, ya que todos los factores de inflación de varianza calculados fueron menores a tres.

3.3.3 Diagnóstico del modelo

El diagnóstico del modelo se implementó a través de un gráfico de residuales de modelo en valores ajustados.

3.3.4 Medias marginales posteriores

Las medias marginales posteriores son un método para obtener predicciones desde un modelo y para promediar aquellas predicciones de forma de comunicar los efectos primarios de un término de regresión dentro de un modelo. Las medias marginales son relevantes para los modelos complejos con muchos términos de modelo, y para datos observacionales que pueden estar muy desequilibrados a lo largo de diferentes valores de términos de regresión. Las medias marginales posteriores entregan un método para la comparación de pareados entre los niveles de factor de un término de regresión, aplicado aquí como comparación de pareado de Tukey, promediado a lo largo de los valores de los otros términos de regresión y de efecto aleatorio. Además, como las medias marginales posteriores se construyen sobre la escala de predictor lineal, también se pueden construir intervalos de confianza para los efectos principales sobre la escala de respuesta (Lenth, 2018).

4 Resultados

4.1 Descripción general de los datos

Al momento de este estudio (agosto de 2018), siete empresas acuícolas fueron participantes voluntarios de la plataforma de investigación, representando 36% de la biomasa total del salmón de cultivo en producción y 27% de los centros activos a marzo de 2018. El conjunto de datos entregado por una empresa no contenía los registros diarios necesarios para realizar el análisis, por lo que este se basó en los ciclos de producción de seis empresas.

Los datos considerados como válidos se describen en Tabla 2.

Tabla 2 Cantidad de ciclos de producción a nivel de jaula excluidos del análisis, por razón

Cantidad de ciclos de producción a nivel de jaulas disponible		8 169
De los cuales, la cantidad de ciclos de producción con:	Duración de ciclo anormal	1 356
	Peso de siembra anormal	429
	Registros de conteo de caligus de SIFA coincidentes faltantes	1 606
	Cantidad de ciclos de producción a nivel de jaula incluidos en el conjunto de datos para este estudio	4 778

El conjunto de datos fue desde el 1° de enero de 2012 al 6 de junio de 2018 e incluyó 4 778 ciclos de producción en 157 centros de agua marina, en 47 barrios. Se definió un total de 25 263 observaciones a nivel de jaula. La distribución de centros, ciclos y observaciones a nivel de jaula, por empresa, se presenta en Tabla 3. Note que Tabla 3 contiene datos para el salmón del Atlántico, la trucha arcoíris y el salmón Coho.

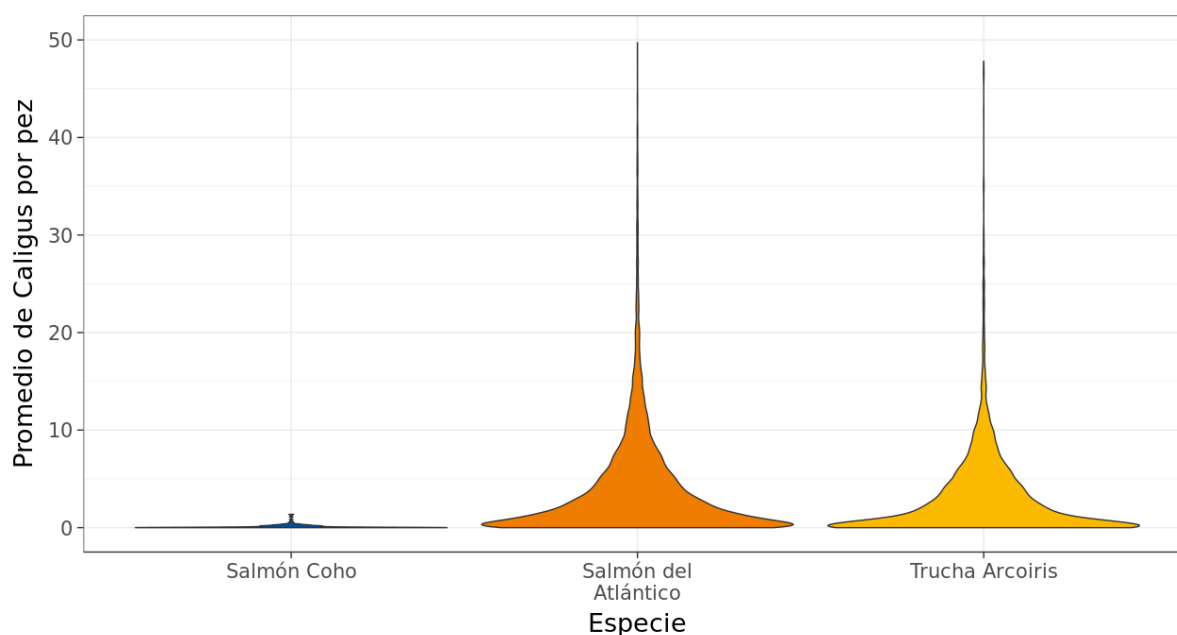
Tabla 3 Cantidad de centros de producción en agua marina y ciclos de producción para los que se incluyeron observaciones a nivel de jaula, por empresa

Empresa	Cantidad de centros incluidos	Cantidad de ciclos de producción a nivel de jaula incluidos	Cantidad de observaciones a nivel de jaula incluidas
1	14	315	1 487
2	15	554	3 442
3	26	892	3 500
4	27	1 184	6 600
5	29	632	2 627
6	46	1 201	7 607
Total	157	4 778	25 263
(Trucha arcoíris)	(42)	(1 204)	(4 438)
(salmón Coho)	(13)	(184)	(299)

Para el salmón del Atlántico, la cantidad máxima de observaciones para una sola jaula dentro de un ciclo de producción fue de 18, con una mediana de 6. Para la trucha arcoíris, la cantidad máxima de observaciones para una sola jaula dentro de un ciclo de producción fue de 10, con una mediana de 3,5. Para el salmón Coho, la cantidad máxima de observaciones para una sola jaula dentro de un ciclo de producción fue de 4, con una mediana de 1,0.

4.2 Análisis de datos exploratorios

4.2.1 Carga de caligus al comienzo del período de observación



Los conteos medios por sobre 50 caligus no se incluyen. Los diagramas de violín son similares a los diagramas de caja, excepto que muestran también la densidad de la probabilidad tipo núcleo de los datos. La envoltura exterior contiene todos los valores posibles para cada especie, mientras que el área del violín es proporcional al número de observaciones disponibles para esta especie. El ancho del violín a un valor dado de carga de caligus es proporcional a la frecuencia de este valor en los datos para esta especie. Todos los violines tienen el mismo ancho, independiente de la cantidad de observaciones disponibles para esta especie.

Figura 2 Distribución del conteo promedio de caligus al comienzo del período de observación, por especie.

Hubo poca variación en los conteos medios de caligus en el salmón Coho (entre 0 y 1,4 caligus por pez en todas las observaciones) (Figura 2) y no se aplicaron tratamientos de baños a esta especie durante nuestro período de estudio. Consecuentemente, el salmón Coho se excluyó de análisis posteriores.

Para el salmón del Atlántico, se registraron cero caligus para 11,70% de los períodos de observación. El conteo medio máximo de caligus para un período de observación fue de 173,10 caligus, con un percentil 25° de 0,64 caligus, una mediana de 2,27 caligus y un percentil 75° de 5,64 caligus. Para la trucha arcoíris, se registraron cero caligus para 23,34% de los períodos de observación. El conteo medio máximo de caligus para un período de observación fue de 79,82 caligus, con un percentil 25° de 0,18 caligus, una mediana de 1,64 caligus y un percentil 75° de 4,46 caligus.



Figura 3 Cantidad de períodos de observación con mortalidad atribuida a piscirickettsiosis igual a cero o al menos una mortalidad atribuida a piscirickettsiosis, por categoría de cantidad media de caligus por pez y especie de pez [panel superior]. Proporción de centros con mortalidad por piscirickettsiosis observada en los períodos de observación, por categoría de cantidad media de caligus por pez al comienzo del período y por especie de pez [panel inferior] Todas las etapas del caligus se consideraron en el conteo medio de caligus.

Tabla 4 presenta un resumen del rango y la distribución del riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación para el salmón del Atlántico y la trucha arcoiris. Para el salmón del Atlántico, no se atribuyó mortalidad por piscirickettsiosis para 38,00% de los períodos de observación, comparada con el 41,69% para la trucha arcoiris.

Tabla 4 Estadística de resumen para el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis, por especie de pez

Especie	Mínimo (%)	Percentil 25° (%)	Mediana (%)	Percentil 75° (%)	Máximo (%)
Salmón del Atlántico	0,00	0,00	0,01	0,06	13,94
Trucha arcoiris	0,00	0,00	0,01	0,27	26,22

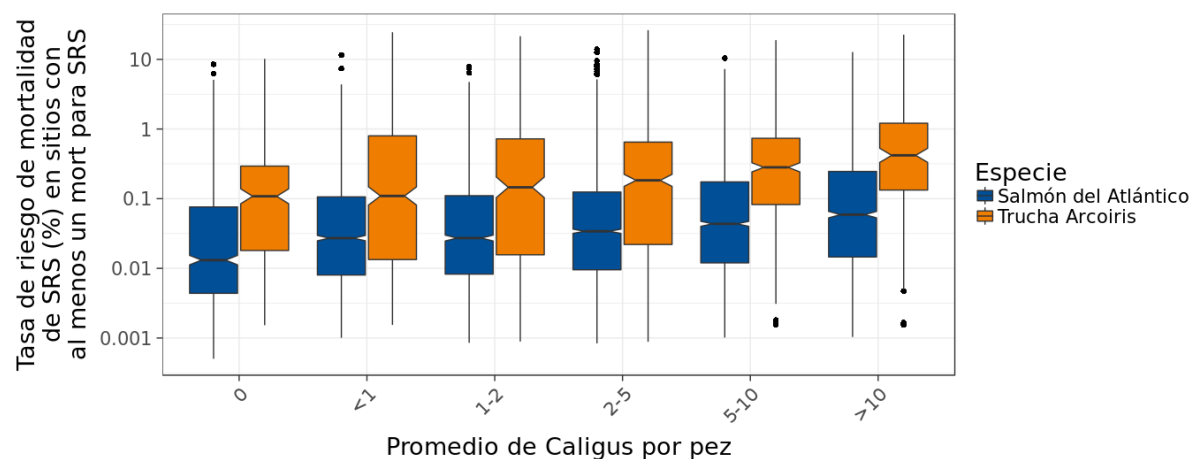


Figura 4 Mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación, por cantidad media de caligus por pez al comienzo del período, para observaciones con un riesgo de mortalidad distinto a cero. Todas las etapas del caligus se consideraron en el conteo medio de caligus.

La carga de caligus parece estar asociada con un mayor riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación (Figura 3 y Figura 4). Hubo una correlación débil y positiva entre el riesgo de mortalidad durante el período de observación y la carga de caligus, que fue estadísticamente significativa en ambas especies ($p < 0,001$ para todas) (Figura 4). En general, la correlación entre diferentes etapas del caligus y el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis fue relativamente similar (Tabla 5). Debido a que la asociación entre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis en el período de observación y la carga de caligus parece ser levemente más fuerte cuando se da cuenta de todas las etapas del caligus en la variable de carga de caligus, se usaron todas las etapas en la parte del modelamiento multivariable del estudio.

Tabla 5 Coeficientes de correlación entre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación y el conteo promedio de caligus por pez al comienzo del período de observación, para diferentes etapas del caligus incluidas en la variable de conteo de caligus.

Especie	Etapas del caligus	Coefficiente de correlación de Spearman
Salmón del Atlántico	Todas las etapas	0,30
	Juveniles	0,29
	Hembras ovígeras	0,22
	Adultos móviles	0,27
Trucha arcoíris	Todas las etapas	0,35
	Juveniles	0,30
	Hembras ovígeras	0,31
	Adultos móviles	0,32

4.2.2 Tasa de tratamientos de baños recibidos desde el comienzo del ciclo hasta el período de observación

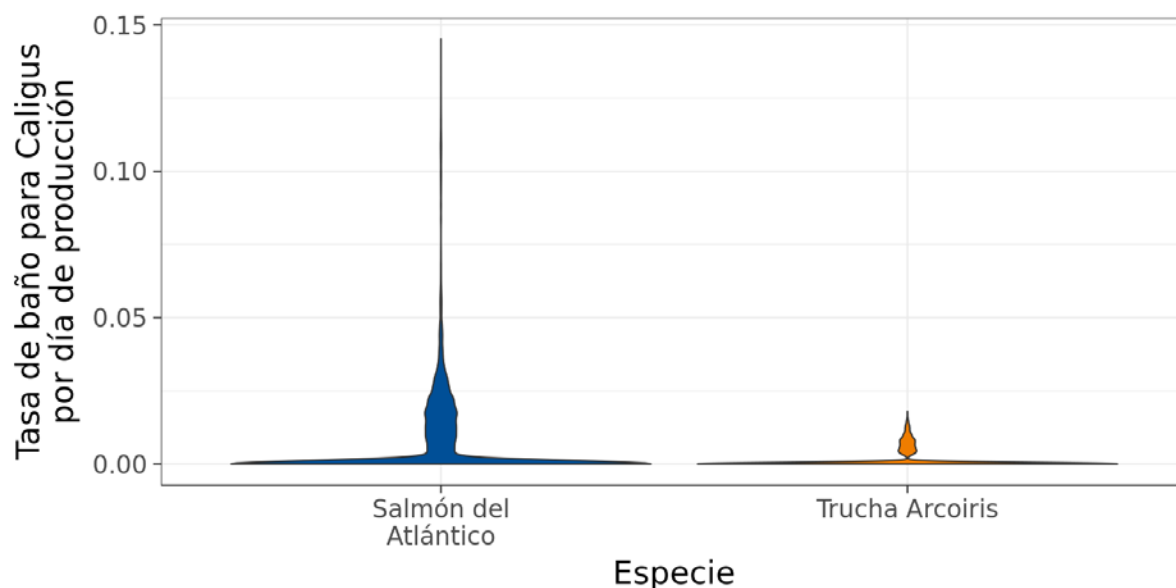


Figura 5 Distribución de la tasa de tratamientos de baños (como cantidad de días de tratamiento desde la entrada al mar dividida por la cantidad total de días desde la entrada al mar hasta el período de observación) al comienzo del período de observación, por especie. Consulte Figura 2 para ver una nota sobre los diagramas de violín.

Para el salmón del Atlántico, no se registraron tratamientos de baños anteriores para 59,76% de las observaciones. La tasa máxima de tratamientos de baños para una observación fue 14,52% con un percentil 25° de 0,00%, una mediana de 0,00% y un percentil 75° de 1,32%. Para la trucha arcoiris, no se registraron tratamientos de baños anteriores para 81,16% de las observaciones de ciclos. La tasa máxima de tratamientos de baños para una observación fue 1,80% con un percentil 25° de 0,00%, una mediana de 0,00% y un percentil 75° de 0,00%.

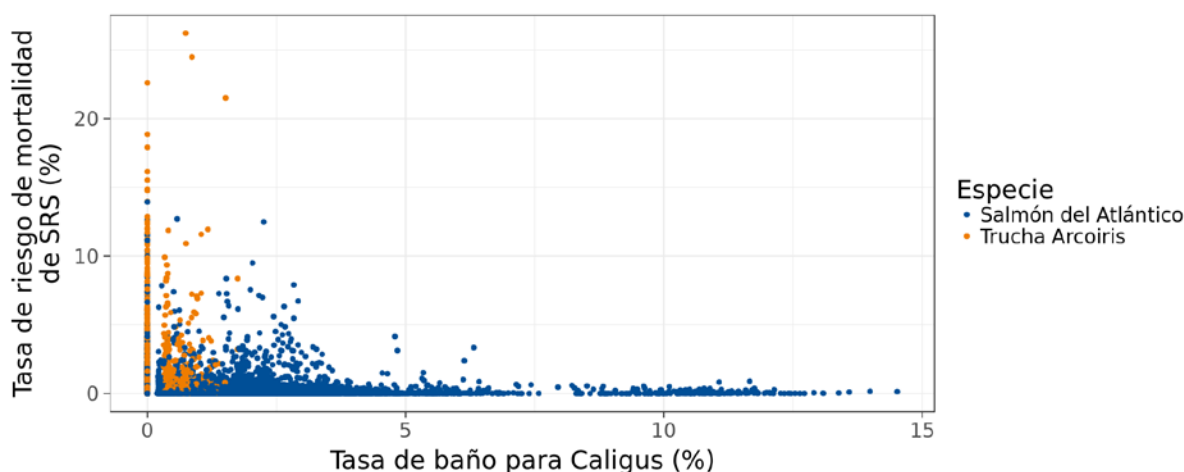


Figura 6 Distribución de riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación, por tasa de tratamiento de baños desde la entrada al mar. La tasa de tratamiento de baños se calculó como la proporción de días de producción en los que se aplicó un tratamiento de baño.

La asociación entre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación y la tasa de tratamientos de baños pareció no ser lineal en el salmón del Atlántico, y una regresión lineal

univariable dividida en segmentos sugirió una pendiente positiva para valores bajos (<2,20%) de la tasa de tratamientos de baños, seguida por una pendiente negativa para los valores más altos. En la trucha arcoíris, la asociación entre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación y la tasa de tratamientos de baños pareció ser monótonica y hubo una correlación moderada y positiva entre estas variables (coeficiente de correlación de Spearman 0,36, $p < 0,01$).

4.3 Modelamiento de efectos mixtos multinivel de los efectos de la carga de caligus y la tasa de tratamientos de baños sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis

4.3.1 Modelo del salmón del Atlántico

Selección del modelo

Los datos soportaron dos modelos en el salmón del Atlántico (Tabla 6). El modelo más soportado fue el modelo completo multivariable, incluyendo el conteo medio de caligus, la tasa de tratamientos de baños como un predictor cuadrático y una interacción entre el conteo medio de caligus y la tasa de tratamientos de baños (hipótesis 7). El otro modelo soportado contuvo las mismas variables, menos el término de interacción (hipótesis 5). Hubo una diferencia de AICc de cuatro puntos entre estos dos modelos, y de 43 puntos con el siguiente modelo (hipótesis 6), lo que sugiere que los dos mejores modelos entregan un ajuste significativamente mejor con los datos. Los estimados de parámetros presentados en Tabla 7 se obtuvieron a través de un promedio de los estimados del modelo de componente, ponderados por las respectivas ponderaciones de Akaike de cada modelo.

Tabla 6 Selección y soporte de hipótesis para modelos de mortalidad por piscirickettsiosis, usando el enfoque de la teoría de la información, para observaciones de salmón del Atlántico

Hipótesis correspondiente	df	AICc	Δ AICc	Ponderación
Hipótesis 7	24	141 089	0	0,89
Hipótesis 5	23	141 094	4	0,11
Hipótesis 6	23	141 132	43	0,00
Hipótesis 4	22	141 135	46	0,00
Hipótesis 2	21	141 156	67	0,00
Hipótesis 3	21	141 185	96	0,00
Hipótesis 1 (sin exposiciones primarias)	20	141 206	117	0,00

Medidas estimadas de efecto derivado de promedio de modelo de los modelos soportados

Coefficientes de riesgo calculados como los coeficientes exponenciales del modelo. Las asociaciones positivas entre la variable de exposición y el resultado se indican por coeficientes de riesgo mayores a 1, y las asociaciones negativas se indican por coeficientes de riesgo de entre 0 y 1.

Tabla 7 Coeficientes de riesgo ajustados (o sea, coeficientes exponenciales del modelo) de mortalidad atribuida a piscirickettsiosis en promedio de modelo para observaciones de salmón Atlántico (N= 20 526).

Las variables que tienen un valor P estadísticamente significativo ($< 0,05$) se resaltan en color verde. Las estimaciones de parámetro de variables continuas se presentan para las *variables escaladas*. CI = Intervalo de confianza.

Variable		Coeficiente de riesgo (coeficiente exponencial del modelo)	límite inferior CI 95%	límite superior CI 95%	P
MeanLice (MediaCaligus) lineal		1,18	1,13	1,23	<0,01
BathTreatmentRate (TasaTratamientoBaño) lineal		1,81	1,61	2,04	<0,01
BathTreatmentRate (TasaTratamientoBaño) cuadrática		0,68	0,62	0,75	<0,01
Interacción entre BathTreatmentRate (TasaTratamientoBaño) y MeanLice (MediaCaligus)		0,96	0,92	1,00	0,05
Latitud		3,16	2,11	4,71	<0,01
Temperatura		446,90	304,67	655,53	<0,01
Oxígeno		0,90	0,86	0,94	<0,01
NeighbourhoodPressure (PresiónBarrio)		1,23	1,18	1,29	<0,01
FishAge (EdadPez)		3,28	3,13	3,43	<0,01
CalendarYear (AñoCalendario)	2012	referencia			
	2013	1,98	1,55	2,54	<0,01
	2014	1,56	1,20	2,03	<0,01
	2015	5,02	3,87	6,50	<0,01
	2016	2,41	1,84	3,15	<0,01
	2017	3,91	2,99	5,12	<0,01
	2018	6,30	4,66	8,52	<0,01

El conteo medio de caligus estuvo asociado positivamente con el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación (Tabla 7). El coeficiente de riesgo fue de 1,18, indicando que el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación aumentó en 18% cuando el conteo medio de caligus por pez aumentó en una desviación estándar desde la media.

Hubo una relación cuadrática significativa entre la tasa de tratamientos de baños piojicidas y el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación. Hay una asociación positiva para el término lineal y una asociación negativa para el término cuadrático. Estas observaciones indican que, a medida que la tasa de tratamiento de baños sigue aumentando, el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación aumenta inicialmente, seguido por una reducción en la tasa de aumento en el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis y, eventualmente, una reducción en el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis.

Si el efecto de una variable de exposición (en el resultado) varía según el nivel de otra variable de exposición, esto implica que está ocurriendo una interacción entre las dos variables de exposición y el resultado. El efecto de la interacción entre la carga de caligus y la tasa de tratamientos de baños sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación tuvo un valor p de 0.05 en el modelo promediado, y fue estadísticamente significativo en el modelo con mejor soporte (hipótesis 7). Esto sugiere que el efecto de la carga de caligus sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis en el período de observación puede variar según la tasa de tratamientos de baños (y el efecto de la tasa de tratamientos de baños sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis puede variar según la carga de caligus). La naturaleza y la dirección de esta interacción se explorarán en mayor detalle con medias posteriores marginales.

El efecto de todas las variables de confusión sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación fue estadísticamente significativo. El riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación aumentó con:

- un aumento en la latitud: observaciones a mayores valores de latitud (o sea, ubicados más al norte) se asociaron con un aumento en el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación
- un aumento en la temperatura del agua marina
- una reducción en los niveles de oxígeno
- un aumento de la presión de infección del barrio
- un aumento en la edad del pez.

Ajuste del modelo

La estimación ajustada r^2 para términos fijos en los modelos multivariable fue 22%, condicional a la inclusión de efectos aleatorios en el cálculo r^2 . En general, la varianza residual se redujo en 14% al pasar del modelo de solo ordenada de origen, incluyendo efectos aleatorios, a modelos multivariable (Tabla 8). Note que un r^2 condicional de 22%, y una reducción en la varianza condicional de 14%, implica que 8% de la varianza se explica por efectos aleatorios no residuales en el modelo nulo ahora se explican por los términos de efecto fijo. Los coeficientes de partición de varianza (VPC) muestran que las exposiciones primarias capturaron algo de la varianza observada a nivel de barrio, comparada con el modelo mínimo sin exposiciones primarias (hipótesis 1). Aunque la interacción entre la carga de caligus y la tasa de baños fue estadísticamente significativa en el modelo con mejor soporte, esta interacción solo mejoró la varianza explicada marginalmente (o sea, por 0,5% a lo más).

Dos observaciones se asociaron con valores ajustados y residuales muy grandes y pueden haber influido indebidamente en las estimaciones de parámetros de cada uno de los modelos. Los modelos se volvieron a ajustar sin estos puntos de datos para evaluar su influencia. Las estimaciones de coeficientes resultadas y sus errores estándar no variaron de manera notoria. Consecuentemente, los puntos de datos atípicos se mantuvieron en el conjunto de datos.

Tabla 8 Estadística de ajuste del modelo para los modelos mínimo y soportado para observaciones en el salmón del Atlántico

Especificación del modelo		Modelo nulo (%)	Hipótesis 1 (%)	Hipótesis 5 (%)	Hipótesis 7 (%)
r^2 condicional		0	22	22	22
Proporción adicional relativa de varianza explicada por la hipótesis, comparada con el modelo nulo		0	14	14	14
Coeficiente de partición de varianza ^a	Barrio	67	38	34	34
	Centro	8	26	26	26
	Ciclo de producción a nivel de jaula	10	14	15	15
	Residuales (nivel de observación) ^b	12	18	20	20
	Empresa	3	5	5	5

a Los coeficientes de partición de varianza para todos los niveles, excepto el nivel residual, son equivalentes a coeficientes de correlación intraclase.

b Los efectos aleatorios para el centro, ciclo de producción y tratamiento contra caligus (residual) están anidados dentro del efecto aleatorio en la línea superior (o sea, tratamientos contra caligus dentro de ciclos de producción, dentro de centros, dentro de barrios). Se puede pensar que los efectos de la empresa están cruzados con los efectos aleatorios de ubicación anidados. Sin embargo, este efecto aleatorio de la empresa se modeló como un efecto fijo porque había muy pocas empresas como para permitir el modelamiento del efecto aleatorio.

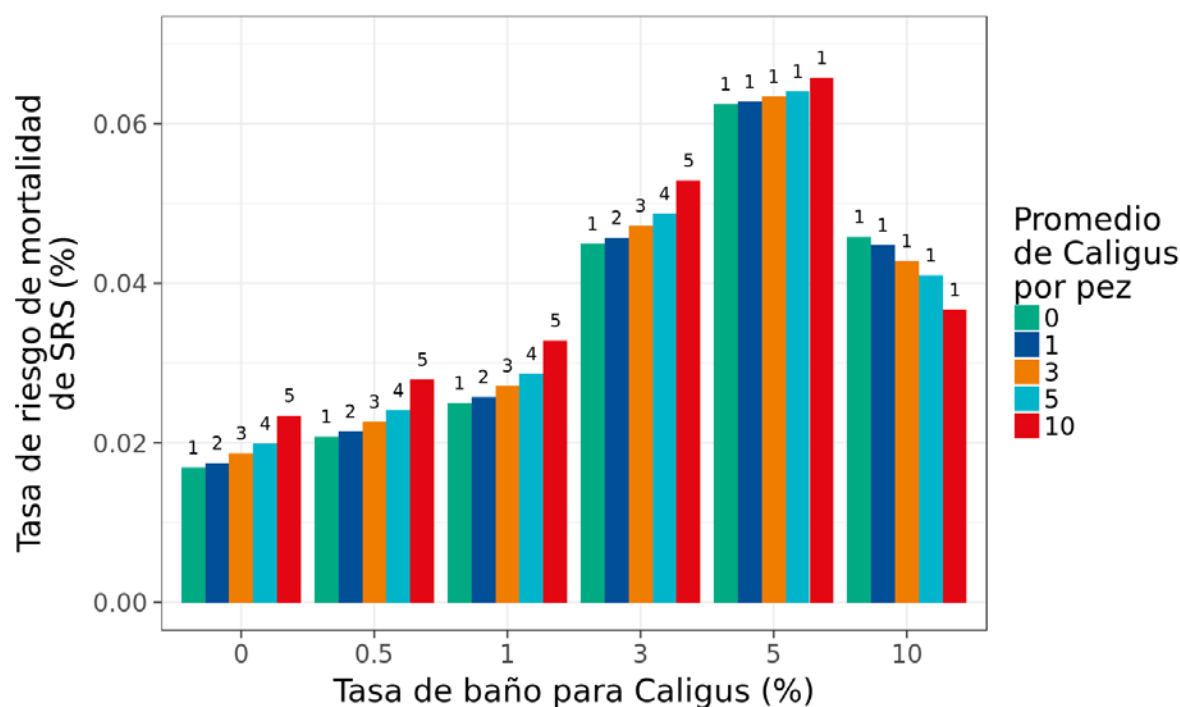
Medias marginales posteriores

Para jaulas con baños relativamente poco frecuentes (5% de los días de producción o menos), la tasa de tratamientos de baños tuvo una asociación positiva y significativa con el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación (Figura 7). Las jaulas que nunca se trataron con baños tuvieron 29% a 32% menos de riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación que las jaulas tratadas cada 3 meses (tasa de tratamientos de baño de alrededor de 1%). Las jaulas tratadas cada 3 meses tuvieron 38% a 44% menos mortalidad por piscirickettsiosis que las jaulas tratadas de manera mensual (tasa de tratamientos de baños de alrededor de 3%).

En jaulas con baños más frecuentes (>5% de los días de producción), la asociación entre la tasa de baños y el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación parecieron disminuir (Figura 8). Sin embargo, no hubo una diferencia estadísticamente significativa en el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación al aumentar la tasa de tratamientos de baños de 5% a 10%, excepto cuando la carga media de caligus fue mayor a 10 caligus por pez. La reducción aparente se puede explicar por una mayor incertidumbre para tasas de tratamientos de baños muy frecuentes debido a una cantidad limitada de datos.

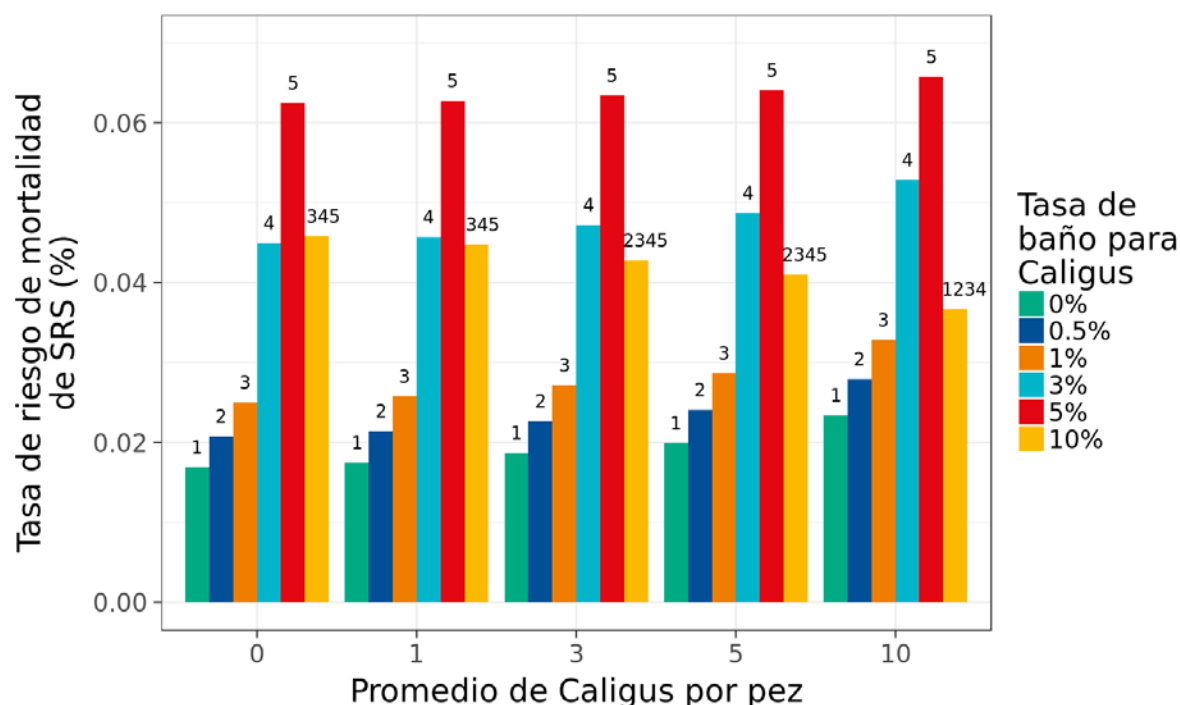
En jaulas sin baños, o jaulas con baños a una tasa menor a 5% de los días de producción, un aumento en la carga de caligus se asoció a un aumento pequeño, pero significativo, en el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación (Figura 7). Por ejemplo, el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación aumentó entre 7% y 9% (en términos relativos) al aumentar la cantidad promedio de caligus por pez de cero a tres, y entre 10% a 12% (en términos relativos) al aumentar la cantidad promedio de caligus de 1 a 5. En jaulas con baños a una tasa de 5% de los días de producción o más, la asociación entre el conteo medio de caligus y el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación ya no fue significativa.

Note que la significancia aquí se basa en comparaciones de pareados ajustados de Tukey entre diferentes valores de un factor de riesgo, anidados dentro de valores de un segundo término. Por ejemplo, los números por sobre cada barra en el diagrama de tasa de baños (Figura 7), para cuando la tasa de baños fue 0%, indica que la media posterior marginal de un nivel de factor de riesgo se consideró como significativamente diferente de otros niveles factoriales si el etiquetado del número es diferente. Por ende, el efecto del conteo medio de caligus sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación aumenta significativamente con un conteo medio de caligus si la tasa de baños es menor o igual a 3% de los días de producción, pero no hay efecto de la cantidad de caligus sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación cuando la tasa de baños es muy frecuente (5% o más). Aparte del efecto del factor de riesgo sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación, también hay un efecto del tamaño de la muestra en la asignación de la pertenencia de un grupo a diferentes niveles del factor de riesgo. Por ejemplo, se observaron menos datos a tasas mayores de baños (o sea, tasas de baños de 10% fueron mayoritariamente excepcionales a 373/20 526 de períodos de observación (1,82%)), que lleva a errores estándar más grandes de cada estimación media posterior, que a su vez resultaron en una baja potencia para diferenciar entre los efectos de diferentes niveles de un factor de riesgo, incluso cuando las diferencias entre los niveles de un factor parecen ser considerables.



Los diferentes superíndices asignados a los valores de carga de caligus indican riesgos de mortalidad por piscirickettsiosis significativamente diferentes durante los períodos de observación para una tasa de tratamientos de baños dada (múltiples comparaciones con ajuste de Tukey). Estas figuras se derivaron desde el modelo correspondiente a la hipótesis 7.

Figura 7 Medias posteriores marginales y comparaciones del efecto de la carga de caligus sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis observadas durante el período de observación para diferentes tasas de tratamientos de baños en el salmón del Atlántico.



Los diferentes superíndices asignados a los valores de la tasa de tratamientos de baños indican riesgos de mortalidad por piscirickettsiosis significativamente diferentes durante los períodos de observación para una carga de caligus dada (múltiples comparaciones con ajuste de Tukey). Estas figuras se derivaron desde el modelo correspondiente a la hipótesis 7.

Figura 8 Medias marginales posteriores y comparaciones del efecto de la tasa de tratamientos de baños en el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis observadas durante el período de observación para diferentes valores de carga de caligus en el salmón del Atlántico.

4.3.2 Modelo de trucha arcoíris

Selección del modelo

Dos modelos tuvieron el soporte de los datos para la trucha arcoíris (Tabla 9), como lo refleja la ponderación relativa: los dos modelos incluyendo la carga de caligus y la tasa de tratamientos de baños como un predictor cuadrático, con y sin una asociación entre los dos efectos (hipótesis 7 y 5, respectivamente). Hubo solo una diferencia de un punto de AICc entre estos dos modelos, lo que indica un ajuste similar a los datos. La diferencia con los otros modelos fue pequeña, con ocho puntos de AICc separando los modelos más y el menos soportado, lo que indica que los siete modelos entregaron un ajuste similar a los datos. Los estimados de parámetros presentados a continuación se obtuvieron a través de un promedio de siete estimados del modelo de componente, ponderados por las respectivas ponderaciones de Akaike de cada modelo.

Tabla 9 Selección y soporte de hipótesis para modelos de riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación, usando un enfoque de teoría de la información, para observaciones de trucha arcoíris.

Hipótesis correspondiente	df	AICc	Δ AICc	Ponderación
Hipótesis 7	24	37 354	0	0,46
Hipótesis 5	23	37 355	1	0,32
Hipótesis 6	23	37 358	4	0,08
Hipótesis 4	22	37 358	4	0,07
Hipótesis 3	21	37 359	4	0,05
Hipótesis 2	21	37 362	8	0,01
Hipótesis 1 (sin exposiciones primarias)	20	37 363	8	0,01

Medidas estimadas de efecto derivado de promedio de modelo de los modelos soportados

Tabla 10 Coeficientes de riesgo ajustados (o sea, coeficientes de modelo exponenciales) de riesgo de mortalidad atribuida a piscirickettsiosis durante el período de observación en base al promedio del modelo para las observaciones en trucha arcoíris (N= 4 438).

Las variables que tienen un valor P estadísticamente significativo (<0,05) se resaltan en color verde. Las estimaciones de parámetro de variables continuas se presentan para las variables escaladas. CI = Intervalo de confianza.

Variable	Coeficiente de riesgo (coeficiente exponencial del modelo)	límite inferior CI 95%	límite superior CI 95%	P
MeanLice (MediaCaligus) lineal	1,10	0,98	1,24	0,11
BathTreatmentRate (TasaTratamientoBaño) lineal	1,68	1,07	2,65	0,03
BathTreatmentRate (TasaTratamientoBaño) cuadrática	0,75	0,51	1,12	0,16
Interacción entre BathTreatmentRate (TasaTratamientoBaño) y MeanLice (MediaCaligus)	0,95	0,83	1,07	0,39
Latitud	84,97	17,82	405,11	<0,01
Temperatura	116,16	46,84	288,05	<0,01
Oxígeno	0,74	0,66	0,84	<0,01

Variable		Coficiente de riesgo (coeficiente exponencial del modelo)	límite inferior CI 95%	límite superior CI 95%	P
NeighbourhoodPressure (PresiónBarrio)		1,50	1,32	1,70	<0,01
FishAge (EdadPez)		18,42	16,20	20,94	<0,01
CalendarYear (AñoCalendario)	2012	referencia			
	2013	0,40	0,26	0,62	<0,01
	2014	0,66	0,43	1,02	<0,01
	2015	0,08	0,04	0,13	<0,01
	2016	0,70	0,40	1,22	0,21
	2017	0,44	0,21	0,91	0,03
	2018	8 217,42	1 028,95	65 626,24	<0,01

La asociación entre la carga de caligus y el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación no fue significativa (Tabla 10).

Hubo una relación lineal positiva entre la tasa de tratamientos de baños y el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación. El coeficiente de riesgo fue de 1,68 que indica que el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis aumento en 68% cuando la tasa de tratamientos de baños aumentó en una desviación estándar por sobre la media.

El efecto de la interacción de la carga de caligus y la tasa de tratamientos de baños sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación no fue estadísticamente significativo. Así, el efecto de la carga de caligus sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis en el período de observación es el mismo en todas las tasas de tratamientos de baños.

Los efectos de todas las variables de confusión sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación fueron estadísticamente significativos. El riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación aumentó con:

- un aumento en la latitud: observaciones a mayores valores de latitud (o sea, ubicados más al norte) se asociaron con un aumento en el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación
- un aumento en la temperatura del agua marina
- una reducción en los niveles de oxígeno
- un aumento en la presión de infección del barrio
- un aumento de la edad del pez.

Ajuste del modelo

La estimación ajustada r^2 para modelos multivariable fue 30% y 31%, condicional a la inclusión de los efectos aleatorios en el cálculo de r^2 . La reducción neta en la varianza residual fue 26% al pasar del modelo de solo ordenada de origen, incluyendo efectos aleatorios, a modelos multivariable (Tabla 11). Los efectos de escala de los barrios tuvieron una varianza mayor que los efectos específicos del ciclo de producción, una vez que se incluyeron los factores de riesgo, lo que indica que la variación en los factores de riesgo se correlacionó, en parte, con diferencias a nivel de empresa (ya que estas diferencias a nivel de empresa se redujeron cuando se comparan con el modelo nulo). Nuevamente, la cantidad de variación explicada por un modelo mejoró solo marginalmente cuando se incorporan interacciones entre los factores de riesgo.

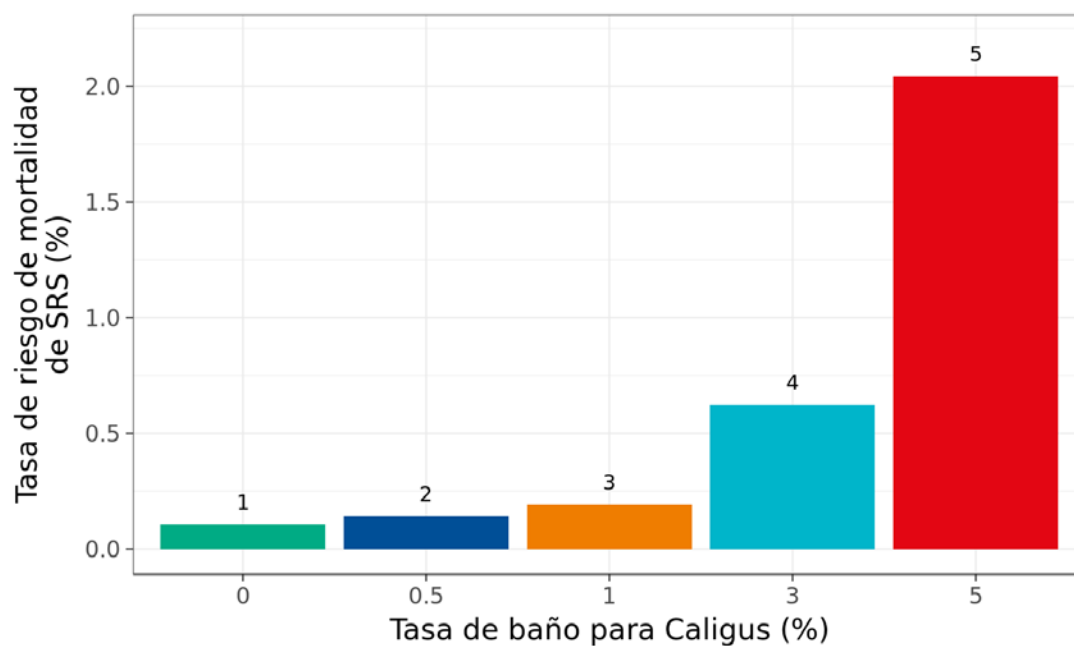
Como ya se observó en los datos de salmón del Atlántico, una pequeña cantidad de observaciones (cinco en la trucha arcoíris) se asoció con valores ajustados muy grandes y residuales. Se mantuvieron en el conjunto de datos ya que las estimaciones de coeficientes del modelo no se modificaron cuando estos puntos de datos se dejaron de lado.

Tabla 11 Estadística de ajuste del modelo para los modelos mínimo y soportado para observaciones en la trucha arcoíris

Especificación del modelo	Modelo nulo (%)	Hipótesis 1 (%)	Hipótesis 5 (%)	Hipótesis 7 (%)
r^2 condicional	0	30	31	31
Proporción explicada adicional relativa de varianza comparada con modelo nulo	0	26	26	26
Barrio	39	64	67	66
Centro	7	12	10	11
Ciclo de producción a nivel de jaula	0	0	0	0
Residuales (nivel de observación) ^b	8	8	6	6
Empresa	46	17	17	17

Medias marginales posteriores

La tasa de tratamientos de baños tuvo una asociación positiva y significativa con el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación (Figura 9). Las jaulas que nunca tuvieron baños tuvieron un riesgo 45% menos de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación que las jaulas tratadas cada 3 meses (tasa de tratamientos de baños de alrededor de 1%). Las jaulas tratadas cada 3 meses tuvieron un riesgo 69% menor de mortalidad por piscirickettsiosis que las jaulas tratadas mensualmente (tasa de tratamientos de baños de alrededor de 3%).



Los diferentes superíndices indican riesgos de mortalidad por piscirickettsiosis significativamente diferentes (múltiples comparaciones con ajuste de Tukey). Estas figuras se derivaron del modelo correspondiente a la hipótesis 3 (solo efecto lineal de la tasa de tratamientos de baños).

Figura 9 Medias posteriores marginales y comparaciones del efecto de la tasa de tratamientos de baños en el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis observadas durante el período de observación para la trucha arcoíris.

5 Discusión

Esta serie de estudios epidemiológicos integrados se diseñó para identificar los factores de riesgo que afectan a la enfermedad y la pérdida debido a la piscirickettsiosis. Conocer la medida en la que las condiciones de comorbilidad y las prácticas de manejo influyen en la severidad de la piscirickettsiosis permitirá diseñar una estrategia sanitaria integrada que minimice las pérdidas y el uso de antimicrobianos asociado con la piscirickettsiosis. En este estudio, hemos medido el efecto de la carga de caligus y de los tratamientos de baños sobre la severidad de la piscirickettsiosis.

La investigación a la fecha ha evaluado la influencia de la carga de caligus sobre la severidad de la piscirickettsiosis de manera independiente a la influencia de los tratamientos piojicidas. Al diseñar este estudio, consideramos que puede haber un bucle de retroalimentación complejo, donde la carga de caligus influye en la cantidad de tratamientos piojicidas (y viceversa) y que, en conjunto, estos factores pueden interactuar para aumentar o reducir la severidad de la piscirickettsiosis. De manera importante, nuestro análisis incluye una evaluación del efecto combinado de los tratamientos piojicidas y la carga de caligus sobre la severidad de la piscirickettsiosis (medida por el riesgo de mortalidad). Considerando las diferencias en la susceptibilidad a la piscirickettsiosis, la infestación de caligus y otros factores de producción, se realizaron análisis independientes para el salmón del Atlántico y la trucha arcoíris.

En esta sección, interpretamos los resultados de este estudio por especie de pez, conversamos sobre las implicancias de los resultados para la industria y presentamos sus limitaciones. La sección 6 presenta un enfoque alternativo para el análisis.

5.1 Resumen e interpretación de resultados

5.1.1 Salmón del Atlántico

Las jaulas con una mayor media de conteos de caligus tuvieron un riesgo mayor de mortalidad por piscirickettsiosis en los 30 días después del conteo de caligus. Este resultado soporta las pruebas controladas en estanques que encontraron mayores tasas de mortalidad en salmón del Atlántico infestado con caligus, comparados con peces libres de este (Figuerola et al., 2017; Lhorente et al., 2014). En estos estudios, se observaron mayores tasa de mortalidad por piscirickettsiosis independiente de si la infestación ocurrió antes o después de la infección por *P. salmonis* (Figuerola et al., 2017; Lhorente et al., 2014). De manera interesante, la carga de caligus en estos experimentos controlados fue mucho mayor a las cargas medias de caligus observadas bajo condiciones comerciales en las jaulas marinas para nuestra población de estudio. Estos estudios experimentales observaron un efecto significativo de la carga de caligus sobre la tasa de mortalidad por piscirickettsiosis para conteos de caligus que van desde 44 a 88 copépodos por pez. En nuestro estudio, la mayoría (75%) de las observaciones de jaulas tuvieron un promedio máximo por jaula de 5.64 caligus por pez. Note que la carga de caligus se mide como un promedio; habrá peces en la jaula con conteos de caligus mayores o menores. Nuestros resultados indican que cargas de caligus relativamente pequeñas pueden tener un efecto negativo sobre la supervivencia de peces cuando están infectados con *P. salmonis*. De hecho, M. P. Gonzáles (2015) identificó un umbral de seis *C. rogerresseyi* adultos por pez, por sobre el cual la fisiología del pez se ve afectada de manera negativa. También vale la pena notar que el coeficiente de riesgo para la asociación entre la carga de caligus y el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis en este estudio fue relativamente pequeño (1,18, 95% CI 1,13-1,23). Puede ser posible que poblaciones de peces con mayores cargas de caligus verían un mayor efecto de conteos de caligus sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis.

Debido a las asociaciones significativas lineales y cuadráticas entre los tratamientos de baños y el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis, la dirección del efecto de la tasa de baños cambió a medida que aumentaron los baños. Para jaulas bañadas de manera poco frecuente (5% o menos de los días de producción), tasas mayores de baños se asociaron con un mayor riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación. Las jaulas bañadas muy frecuentemente (10% de los días de producción) parecieron tener un efecto más pequeño de la tasa de baños sobre un creciente riesgo

de mortalidad por piscirickettsiosis o incluso a un efecto decreciente sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación. El efecto lineal de la tasa de tratamientos de baños fue mayor que el efecto lineal de la carga de caligus, lo que sugiere una influencia mayor de tasas anteriores de baños sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis (comparada con la carga de caligus) para jaulas bañadas poco frecuentemente.

Estos resultados no soportan a aquellos de Jakob et al. (2014) que no encontraron una asociación entre la cantidad de tratamientos de caligus y el riesgo promedio de mortalidad por piscirickettsiosis durante brotes para el salmón del Atlántico. En el estudio realizado por Jakob et al. (2014), se usó un conjunto de datos menor (para el salmón del Atlántico, 252 jaulas comparadas con 3 390 jaulas en nuestro estudio) y el método del tratamiento piojicida no se especificó. Es probable que nuestro estudio haya entregado una mayor potencia para detectar la asociación entre tratamientos piojicidas (baños, específicamente) y el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis. Estos resultados también difieren de los resultados del estudio previo de Ausvet ¹, que encontró una asociación negativa significativa entre la cantidad de tratamientos piojicidas y el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante los brotes. Nuevamente, el estudio anterior de Ausvet no especificó el método del tratamiento piojicida y midió la cantidad de tratamientos en vez de la tasa de tratamientos. Los resultados del estudio actual sugieren que el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis aumenta debido a la proporción de días de producción donde se administró tratamiento, en vez de un simple conteo de la cantidad de días de tratamiento.

Hipotetizamos que los baños pueden crear un ambiente estresante donde los peces son más susceptibles a la infección y/o donde la transmisión de patógenos aumenta a través de un contacto más frecuente y prolongado entre los peces. Nuestros resultados soportan esta hipótesis solo para jaulas que reciben baños poco frecuentemente. Para jaulas con baños más frecuentes, puede haber un umbral sobre el cual más baños no aumentan más el riesgo de mortalidad debido a piscirickettsiosis (o sea, para la teoría de la transmisión de patógenos, todos los peces susceptibles ya están infectados). En este estudio, el tiempo desde el baño al período de la medición de la mortalidad por piscirickettsiosis puede variar. Si las jaulas que recibieron baños muy frecuentemente tuvieran un mayor intervalo entre el baño y la medición de mortalidad por piscirickettsiosis, esto puede dar cuenta del efecto de reducción de la tasa de baños sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación. Además, los resultados para tasas muy frecuentes de tratamientos de baños tuvieron un mayor grado de incertidumbre debido a la limitada cantidad de datos, y se deberían interpretar con precaución.

Nuestro estudio demuestra que la interacción entre la carga de caligus y la tasa de tratamiento de baños influye en el efecto de cada exposición sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación. Mientras el valor *p* del efecto de interacción fue 0.05 para el modelo promediado, el efecto fue significativo para el modelo más soportado y los resultados del modelamiento de las medias posteriores marginales soportan un efecto de interacción. Las tasas de baños de 10% se excluirán desde nuestra interpretación de interacción debido al bajo número de observaciones disponible para modelar los niveles definidos de la carga de caligus a esta alta tasa de baños. Para una carga de caligus dada, el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis es mayor si está precedido por tasas de baños más altas (para tasas de baños de 5% o menos). Para una tasa de baños dada (para tasas de baños menores al 5%), el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación es mayor si se antecede por mayores conteos de caligus. En otras palabras, para tasas de baños menores a 5%, la carga de caligus y la tasa de baños tienen un efecto acumulativo sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis. Más baños y una carga más alta de caligus pueden resultar en un estrés acumulativo y en una mejor oportunidad para la transmisión de patógenos, que resulta en una mayor severidad de la piscirickettsiosis.

A una tasa de baños de 5%, el efecto de una mayor carga de caligus sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación ya no fue significativo. En otras palabras, cuando se antecede por una tasa de baños de 5%, el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis durante el período de observación fue el mismo, independiente de si el conteo de caligus fue cero o 10. Esto se puede explicar por un efecto de umbral para la transmisión de *P. salmonis* como se describió anteriormente. El

¹ Efectividad del tratamiento antimicrobiano de la piscirickettsiosis en los salmones de cultivo en los sistemas de acuicultura comercial en Chile, informe de entregable 3.1 del Proyecto

tratamiento antimicrobiano para la piscirickettsiosis no se examinó en este estudio. Si las jaulas expuestas a baños regulares también tienen mayor probabilidad de recibir tratamiento terapéutico para la piscirickettsiosis, esto puede explicar la falta de efecto del aumento de los conteos de caligus.

5.1.2 Trucha arcoíris

En nuestro estudio, la carga de caligus en esta especie no estuvo significativamente asociada con el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis. Esto contradice la evidencia disponible sobre el efecto de la coinfección con caligus sobre la susceptibilidad de los salmones a la infección. Es importante notar que hay muy poca información disponible específica para la trucha arcoíris; la mayoría de los estudios han examinado la coinfección en el salmón del Atlántico. En promedio, las jaulas de trucha arcoíris tuvieron conteos de caligus relativamente bajos. La mayoría (75%) de las observaciones de jaulas tuvo conteos promedio de caligus por jaula menores a 4,46 caligus por pez; por debajo del umbral observado para parámetros sanguíneos alterados significativamente en el salmón del Atlántico (M. P. González et al., 2015). Es posible que para los centros de cultivo de trucha arcoíris en este estudio, las cantidades de caligus se mantuvieran a niveles bajos debido a métodos de control (baños, en el alimento u otros); niveles por debajo de cierto umbral fisiológico requerido para tener efectos fisiológicos adversos. Otra explicación para la ausencia de un efecto observado de la carga de caligus sobre la severidad de la piscirickettsiosis puede ser que la trucha incluida en este estudio es genéticamente resistente a la coinfección de *P. salmonis* y *C. rogerresseyi*. La resistencia a la coinfección es una característica hereditaria y la trucha puede ser más resistente genéticamente que el salmón del Atlántico (Lhorente et al., 2014). No se observó un efecto de interacción significativo entre la carga de caligus y la tasa de tratamiento de baños sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis para la trucha arcoíris. Esto es probablemente debido a una ausencia de una asociación entre la carga de caligus y el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis.

Encontramos una asociación lineal positiva significativa entre la tasa de tratamientos de baños y el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis; mientras mayor es la tasa de baños, mayor es el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis. Estos resultados soportan aquellos de un estudio anterior de Ausvet² que encontró una asociación positiva significativa entre la cantidad de días del tratamiento contra el caligus y la tasa de mortalidad durante brotes de piscirickettsiosis para la trucha arcoíris. Jakob et al. (2014) demostró una relación cuadrática entre los tratamientos contra el caligus y el riesgo promedio de mortalidad por piscirickettsiosis durante brotes. Estos estudios previos no pudieron demostrar una asociación para métodos de tratamiento de caligus participales, ya que no se especificó la naturaleza del tratamiento. Para la trucha arcoíris, nuestro estudio entrega evidencia de que tasas más altas de tratamientos de baños piojicidas son seguidos por mayores riesgos de mortalidad por piscirickettsiosis.

5.1.3 Ambas especies

Este estudio dio más evidencias para soportar las siguientes variables como factores que reducen la supervivencia de los peces durante episodios de piscirickettsiosis: mayores latitudes, mayor temperatura del agua marina, menores niveles de oxígeno, mayor presión de infección del barrio y mayor duración en el mar. En este análisis se dio cuenta de la estacionalidad, en parte incluyendo la temperatura del agua marina en los modelos.

Es importante notar que, en general, la inclusión de la tasa de caligus y la tasa de tratamientos de baños no aumentó la potencia explicativa de los modelos, comparados con el modelo mínimo.

Además, las variables incluidas en el modelo mínimo (que describen a potenciales confusores, así como variables relacionadas con la agrupación jerárquica en los datos) solo explicaron alrededor de 22 y 31% de la variabilidad total en el resultado de la mortalidad por piscirickettsiosis, en el salmón del Atlántico y la trucha arcoíris, respectivamente. Este hallazgo es consistente con los hallazgos de nuestro estudio previo, que mostró que aunque varias variables estuvieron asociadas con la mortalidad por piscirickettsiosis después del tratamiento para la piscirickettsiosis, el efecto de cada una fue pequeño a mediano. Esto

² Efectividad del tratamiento antimicrobiano de la piscirickettsiosis en los salmones de cultivo en los sistemas de acuicultura comercial en Chile, informe de entregable 3.1 del Proyecto

destaca la alta variabilidad de la incidencia de piscirickettsiosis y quizás la existencia de otros factores que tienen una influencia mayor en la mortalidad por piscirickettsiosis de los que aún no se da cuenta. Los estimados del coeficiente estadísticamente significativos para la latitud en ambas especies sugieren que es probable que tales factores estén distribuidos espacialmente. Aunque estamos dando cuenta de confusores importantes, hasta donde sabemos y con los datos disponibles, es posible que variables de las que no se da cuenta pudieran influir en las relaciones entre carga de caligus, tratamientos de baños y el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis de maneras que no se consideraron en este estudio.

Aunque la carga de caligus y los tratamientos de baños pueden tener efectos relativamente pequeños sobre la severidad de la piscirickettsiosis en relación con todos los factores de riesgo, el control del caligus puede manipularse más fácilmente comparado con los factores oceanográficos, por ejemplo. Nuestro estudio midió el efecto de la variable de exposición por un período breve (30 días). Sumando estos efectos en todas las jaulas y todos los ciclos de producción, alterando la carga de caligus y/o la tasa de tratamiento de baños puede tener una reducción comercialmente relevante de la pérdida y el uso de antimicrobianos asociados con la piscirickettsiosis.

5.1.4 Recomendaciones para el manejo de la carga de caligus con efectos adversos mínimos sobre la severidad de la piscirickettsiosis

Recomendamos reducir la tasa de tratamientos de baños a lo que se requiera para manejar la carga de caligus.

Tanto para el salmón del Atlántico como para la trucha arcoíris, nuestros resultados muestran que los tratamientos de baños piojicidas pueden afectar negativamente la supervivencia de los peces durante episodios de piscirickettsiosis. Note que no recomendamos detener los tratamientos de baños completamente, ya que también hemos demostrado que la carga de caligus está asociada a un aumento en la severidad de la piscirickettsiosis. No solo es importante el control del caligus para reducir la morbilidad y la mortalidad de la infección con *P. salmonis*, para ambas especies es esencial mantener el bienestar animal, reducir las pérdidas atribuibles directamente a la caligidosis y, además, reducir la prevalencia de otras coinfecciones asociadas al *C. rogerresseyi* (Figueroa et al., 2017).

Debe haber una compensación entre la reducción de la severidad de la piscirickettsiosis asociada con mantener los conteos de caligus por debajo de un umbral definido, y el aumento de la severidad de la piscirickettsiosis asociada con el aumento de la tasa de tratamientos de baños a un nivel necesario para lograr este nivel deseado. Un umbral para el conteo de caligus se puede basar en umbrales fisiológicos (M. P. González et al., 2015), umbrales óptimos calculados usando modelamiento de la enfermedad y económico, o requerimientos normativos. Este estudio no permite una evaluación de las combinaciones de carga de caligus y tasas de tratamientos de baños que minimice la severidad de la piscirickettsiosis; este tipo de toma de decisión podría ser informado por el tipo de análisis de extensión descrito en la sección 6.

Nuestra recomendación (reducir la tasa de tratamientos de baños a lo que se requiera para mantener el conteo de caligus por debajo del umbral deseado) requiere de una eficiencia óptima de tratamientos de baños. Esto puede involucrar garantizar que se administre la dosis terapéutica correcta y el uso de estrategias tales como la sincronización de baños con centros de cultivo aledaños (Arriagada et al., 2017). Cuando sea posible, las condiciones del baño se pueden alterar para reducir el estrés potencial y la mayor transmisión de patógenos (por ej., minimizar el tiempo del baño y minimizar la densidad de peces). El control de caligus mediante el baño se puede minimizar complementándolo o reemplazándolo con opciones diferentes a la inmersión, como tratamientos en el alimento de acción prolongada (Elanco., 2018), barbecho dirigido y métodos innovadores como cultivar peces en jaulas flotantes cerradas (Nilsen, Nielsen, Biering, & Bergheim, 2017). Debido a que otros estudios han encontrado asociaciones entre tratamientos de control de caligus no especificados y la severidad de la piscirickettsiosis, el efecto de estrategias alternativas de control del caligus se debería evaluar antes de que se hagan grandes cambios en el manejo.

Hallazgos clave del estudio

Nuestro estudio confirma que la presencia de caligus afecta la supervivencia de los salmones infectados con *P. salmonis* y demuestra que los tratamientos de baños usados para controlar el caligus pueden, en sí mismos, contribuir a una mayor severidad de la piscirickettsiosis.

Salmón del Atlántico

La carga de caligus y la tasa de tratamientos de baños tienen un efecto acumulativo sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis cuando la tasa de baños es menor a 5% de los días de producción. Para jaulas con baños más frecuentes (tasa de baños de 5% o más días de producción), el efecto del aumento de la carga de caligus sobre el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis ya no es estadísticamente significativo.

Trucha arcoíris

La tasa de baños para el tratamiento del caligus tiene un mayor efecto en el aumento del riesgo de la mortalidad por piscirickettsiosis que mayores cargas de caligus.

Recomendación en ambas especies

Minimizar los tratamientos de baños para el control del caligus puede resultar en reducciones sustanciales del riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis, particularmente para la trucha arcoíris. Recomendamos que los productores de salmón del Atlántico y de trucha arcoíris evalúen la tasa de baños y el umbral del conteo de caligus que, en conjunto, minimizan la pérdida asociada a la piscirickettsiosis y a otras enfermedades. Los centros de cultivo pueden explorar el uso de otros métodos de control del caligus que tienen menor probabilidad de influir sobre la susceptibilidad a la piscirickettsiosis.

5.2 Características del diseño y los métodos del estudio

5.2.1 Visión general del enfoque

Este estudio se basa en el análisis de un conjunto de datos muy exhaustivo manejado de manera segura en la plataforma de investigación PIISAC, que se desarrolló específicamente para dar soporte a la investigación epidemiológica de relevancia para la industria acuícola chilena. Las empresas acuícolas que funcionan en Chile entregan voluntariamente los datos que se encuentran en la PIISAC e incluyen datos sobre tratamientos de control de caligus y muchos factores de riesgo que pueden influir sobre la severidad de la piscirickettsiosis. Los sistemas de software de las empresas entregan los datos directamente (como Fishtalk y Mercatus), con una resolución temporal (diaria) y espacial (a nivel de jaula) muy fina. La PIISAC entrega una capacidad sin precedentes para realizar investigación epidemiológica de manera eficiente y a una escala que no es posible con métodos tradicionales, que requieren muchos recursos para la recolección de datos. Debido a que la mayoría de la investigación existente ha examinado el efecto de la coinfección de caligus sobre la severidad de la piscirickettsiosis en ambientes controlados (Figueroa et al., 2017; Lhorente et al., 2014), el uso de la PIISAC nos permite examinar relaciones entre factores de riesgo y la enfermedad que son relevantes en un escenario acuícola comercial.

El resultado (riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis) se midió por un período definido de 30 días después del conteo de caligus; período considerado como lo suficientemente extenso para que la carga de caligus ejerza su efecto negativo sobre la susceptibilidad del pez a la enfermedad. Este diseño nos permitió hacer pruebas sobre el supuesto de la carga de caligus como una causa de mayor severidad de la piscirickettsiosis, ya que la temporalidad es un indicador de causación. Se pueden diseñar estudios futuros para evaluar el efecto general de la carga de caligus sobre la pérdida debido a piscirickettsiosis durante un ciclo de producción. Además, estudios futuros pueden incluir otras medidas de efecto negativo del caligus sobre la salud de los peces. En este estudio evaluamos el conteo medio de caligus por jaula, por pez. Otros estudios pueden evaluar la prevalencia del caligus, su densidad y otros indicadores para determinar la mejor medida del efecto negativo de la carga de caligus sobre la susceptibilidad de los peces a la enfermedad. Tal enfoque sería particularmente pertinente para la trucha arcoíris, ya que los efectos de la carga de caligus sobre la fisiología y la susceptibilidad a la enfermedad de esta especie son desconocidos.

5.2.2 Fuentes potenciales de sesgo

Todos los estudios epidemiológicos incluyen el potencial de error, y es importante entender los tipos de error que pueden ocurrir en estudios como este, que se basa en datos generados por la industria. Este estudio se realizó poco después de que se desarrolló la plataforma de investigación PIISAC. En este momento, solo 7 de las 21 empresas que operaban en Chile eran participantes de la plataforma de investigación, y estas empresas pueden no ser representativas de la industria completa. Por ejemplo, los centros de cultivo incluidos en este estudio pueden tener mayor probabilidad de tener menores cargas de caligus y menores tasas de tratamientos de baños (por ej., preferencia de uso de baños por sobre tratamientos en los alimentos). Por esta razón, los resultados no se pueden extrapolar fácilmente a la industria completa. Aunque la participación limitada actualmente limita la validez externa de los análisis usando PIISAC, este problema se superará con la participación de otras empresas; es completamente factible que todas las empresas pudieran estar involucradas en la plataforma de investigación, por lo que análisis futuros se podrían realizar en un conjunto de datos completo de toda la industria. Los resultados presentados aquí deberían considerarse como resultados preliminares, que se actualizarán a medida que datos adicionales (desde otras empresas) estén disponibles para su análisis.

Estudios observacionales como estas pruebas, pero no demuestran, la causación. Las características de las asociaciones entre exposiciones y el resultado encontrados en este estudio como efectos positivos significativos, dependencia de dosis y plausibilidad temporal soportan, pero no demuestran, la causación. Sabemos desde nuestra evaluación del ajuste del modelo, que una cantidad sustancial de la variabilidad en el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis se puede explicar por factores que no se incluyeron en el modelo. Factores no identificados pueden confundir la relación entre carga de caligus, tratamientos de baños y severidad de la piscirickettsiosis, dando resultados falsos. Tales factores pueden incluir la vacunación contra la piscirickettsiosis, tratamiento antimicrobiano contra la piscirickettsiosis y tiempo desde el último tratamiento de baño hasta la medición de la mortalidad por piscirickettsiosis. Figueroa et al. (2017) mostró que el efecto de la infestación de caligus sobre la severidad de la piscirickettsiosis fue significativo, independiente del estado de vacunación. Debido a que pudimos detectar asociaciones positivas entre la carga de caligus y la mortalidad por piscirickettsiosis, es poco probable que la exclusión de estados de anteriores de vacunación contra la piscirickettsiosis afecte a nuestro estudio de manera negativa. El tiempo desde el último tratamiento de baños no se incluyó en este estudio, ya que no se encontró que afectara significativamente a la severidad de la piscirickettsiosis en un estudio anterior de Ausvet³. El tratamiento antimicrobiano se debería incluir en evaluaciones adicionales sobre el efecto de la carga de caligus, los tratamientos contra este y la severidad de la piscirickettsiosis. Se espera que mientras más análisis se realicen para identificar factores de riesgo de la severidad de la piscirickettsiosis, se minimizarán confusores no identificados, aumentando nuestra confianza de que las exposiciones asociadas son verdaderos factores de riesgo.

Entre las empresas que actualmente participan en la plataforma de investigación, todos los centros y jaulas se incluyeron en el análisis a menos que errores u omisiones de datos los excluyeran desde el conjunto de datos. Este nivel de inclusión tiene dos beneficios importantes: elimina la posibilidad de un sesgo de selección a nivel de centro o de jaula, y entrega un tamaño de muestra muy grande, con la consecuente reducción del error aleatorio, y un aumento en la potencia para detectar asociaciones significativas entre factores de riesgo y resultados. La exclusión de registros incompletos o inválidos (ilógicos) es una fuente potencial de sesgo. Este estudio tuvo un ejemplo extremo en el que una empresa se excluyó del análisis porque sus registros diarios completos no estuvieron disponibles en una forma que se ajustara al análisis. En general, la tasa de errores y omisiones de datos en el resto del conjunto de datos fue relativamente baja.

Las fuentes de error potenciales más grandes en este estudio son la mala clasificación de mortalidad atribuida a la piscirickettsiosis, el sesgo asociado con la selección de jaulas para el conteo de caligus y el sesgo asociado con el uso de conjuntos de datos normativos para el conteo de caligus. Los signos clínicos de la piscirickettsiosis no son patognómicos, y tampoco son siempre evidentes sin una necropsia. Por lo

³ Efectividad del tratamiento antimicrobiano de la piscirickettsiosis en los salmones de cultivo en los sistemas de acuicultura comercial en Chile, informe de entregable 3.1 del Proyecto

tanto, es razonable suponer que la mala clasificación de mortalidad si ocurre; sin embargo, no pudimos determinar la extensión de la mala clasificación, el coeficiente de diagnósticos falsos positivos y los falsos negativos de piscirickettsiosis, y si es que la mala clasificación de la mortalidad está relacionada a las diferentes exposiciones que se están estudiando. Aunque la selección aleatoria de jaulas del conteo de caligus se especifica, los métodos de selección utilizados son desconocidos y pueden ser objeto de sesgo. Las consecuencias normativas de altas cargas de caligus pueden haber probado ser un desincentivo para informar el grado completo de los conteos de caligus. La falta de informes podría sesgar nuestros resultados hacia la hipótesis nula.

5.2.3 Aplicación de enfoques teóricos de la información

En este estudio, hemos usado un enfoque "teórico de la información" a las pruebas de hipótesis científicas y para obtener inferencias desde modelos estadísticos. Este enfoque se basa en el desarrollo *a priori* de múltiples hipótesis biológicamente plausibles acerca de las relaciones causales entre exposiciones (factores de riesgo) y resultados de interés. La clasificación de modelos estadísticos (uno para cada hipótesis) usando la selección de modelos AIC entrega una forma robusta de cuantificar el nivel de evidencia en soportes de cada modelo. Cuando se soportan múltiples modelos, el promedio de los modelos permite que las inferencias se basen en todos los modelos soportados y no solo en uno.

El enfoque de la teoría de información difiere de los enfoques estadísticos tradicionales para la prueba de las hipótesis nulas y los enfoques de construcción de modelos "mecánicos". Se adapta bien al análisis de conjuntos de datos exhaustivos, como los de la plataforma de investigación PIISAC. En particular, explícitamente se basa en conocimiento existente (a través del desarrollo de hipótesis) y permite que se desarrollen modelos relativamente complejos que entregan medidas sobre el efecto de numerosas exposiciones (factores de riesgo), habiendo tomado en cuenta los efectos de otras variables.

6 Otros enfoques potenciales al análisis

Alternativas al diseño del estudio

Este estudio informa un mayor riesgo en la mortalidad por piscirickettsiosis a medida que la carga de caligus y la tasa de baños también aumentan. Sin embargo, una relación causal clave entre la tasa de baños y la carga de caligus no fue el enfoque de este estudio y, por ende, no se consideró. Si se aumenta la tasa de baños, entonces la infestación de caligus puede reducirse. Por ende, puede ser deseable permitir algo de mortalidad por piscirickettsiosis relacionada con el mayor estrés de los baños y el manejo si esto reduce la carga de caligus a un grado potencialmente relevante y, así, mitigar los efectos de una carga mayor de caligus sobre la mortalidad por piscirickettsiosis. La compensación entre el aumento de la tasa de baños o permitir una mayor carga de caligus es probable que ocurra cerca de una tasa de baños de 1% o menos, ya que es aquí donde la mortalidad por piscirickettsiosis comienza a acelerarse en respuesta a la tasa de baños (Figura 7). Este punto de compensación bajo se evidencia también porque el coeficiente de riesgo estimado relativo es más alto para la tasa de baños (al menos para el término lineal) que para la carga de caligus. Sin embargo, tales aseveraciones siguen siendo hipótesis *a priori*.

Un enfoque de modelamiento en la identificación del punto de compensación entre la tasa de baños y la carga de caligus podría ser encadenar el modelo de riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis en respuesta a la carga de caligus, y la tasa de baños desarrollada en este estudio, a un segundo modelo estadístico de la relación entre la carga de caligus y la tasa de baños. Las simulaciones de Monte Carlo del modelo de carga de caligus podrían, entonces, alimentar al modelo de riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis para dar cuenta de la probable dependencia de la carga de caligus sobre la tasa de baños en el riesgo de mortalidad por piscirickettsiosis. El modelo encadenado se puede, entonces, optimizar para encontrar la tasa de baños que minimice el riesgo general de mortalidad por piscirickettsiosis. En este enfoque, la tasa de baños óptima da cuenta del efecto de la tasa de baños sobre la carga de caligus. Un enfoque de Monte Carlo asegura que la tasa de baños óptima dé cuenta también de la incertidumbre en la respuesta de las cargas de caligus a la tasa de baños y en la respuesta de la mortalidad por piscirickettsiosis a la distribución conjunta de la carga de caligus y las tasas de baños. Este enfoque sería posible usando los datos existentes en la PIISAC.

Entonces, un ejercicio razonablemente simple es extender el modelo encadenado a un modelo bioeconómico simplemente agregando los costos. Estos costos pueden incluir la producción perdida debido a la mortalidad por piscirickettsiosis, el costo de los baños como mano de obra y costo capital y cualquier pérdida de valor de mercado o pérdida de acceso al mercado que se puedan asociar a mayores cargas de caligus. Sin embargo, notamos que los datos relevantes sobre costos no están disponibles actualmente en la PIISAC.

7 Conclusión

Los impactos combinados de la piscirickettsiosis y un nivel muy alto de uso de antimicrobianos representan una amenaza seria a la rentabilidad y sustentabilidad de la industria acuícola salmonera chilena. Es importante identificar factores, particularmente factores modificables, que puedan aumentar la susceptibilidad de los peces a la infección con *P. salmonis* y/o aumentar la severidad de la infección. La identificación de tales factores permite que se consideren sus efectos durante el desarrollo de programas de manejo sanitario integrados. Este estudio aprovecha un conjunto de datos exhaustivo de datos generados por la industria para evaluar el efecto de la carga de caligus, la tasa de los tratamientos de baños piojicidas y su efecto combinado sobre la piscirickettsiosis en Chile. Demuestra la potencia, eficiencia y múltiple utilidad de la plataforma de investigación PIISAC para dar soporte a estudios epidemiológicos en la industria acuícola salmonera chilena.

Nuestro estudio confirma que la presencia de caligus afecta la supervivencia de los salmones infectados con *P. salmonis* y demuestra que los tratamientos de baños usados para controlar el caligus pueden, en sí mismos, contribuir a una mayor severidad de la piscirickettsiosis.

Los resultados de este análisis demuestran la compleja naturaleza de la interacción entre la carga de caligus, los tratamientos de baños y su efecto combinado sobre la severidad de la piscirickettsiosis. De manera importante, muchos resultados clave se relacionan con decisiones o prácticas de manejo e indican formas prácticas y accionables en las que se podrían minimizar las pérdidas y el uso de antimicrobianos asociados con la piscirickettsiosis.

La fortaleza de estos resultados está soportada por el gran conjunto de datos y la exhaustividad del análisis; sin embargo, existen algunas salvedades importantes. Primero, aunque los resultados son altamente válidos para las empresas participantes (sobre cuyos datos se realizaron los análisis), estas empresas pueden no ser representativas de la industria. Entonces, estos resultados no se pueden extrapolar fácilmente a la industria en su totalidad. Segundo, se espera que la precisión de la medición y el registro de la exposición y las variables de resultado (incluyendo la clasificación de mortalidad atribuida a piscirickettsiosis en la ausencia de un diagnóstico de laboratorio) sean imperfectos. Tales errores pueden introducir un sesgo en los resultados (y debilitar la validez interna del estudio), pero el grado y la dirección de cualquier sesgo no se puede determinar fácilmente. Sin embargo, este análisis se basa en los datos de empresas que representan los mejores datos disponibles actualmente.

Finalmente, recomendaciones sólidas acerca programas óptimos de control de caligus deberían considerar los hallazgos de este estudio en conjunto con otras investigaciones, además de análisis económicos que consideren los costos y externalidades del tratamiento. El trabajo futuro puede enfocarse en la evaluación de resultados económicos y en el desarrollo de herramientas de soporte a la toma de decisiones basadas en las formas económicamente óptimas de controlar la infestación por caligus.

Agradecimientos

Esta investigación se desarrolla bajo el marco del "Programa Para la Gestión Sanitaria en la Acuicultura", proyecto ejecutado por el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, y que cuenta con financiamiento público y privado, por parte del Ministerio de Economía, Fomento y Turismo y la Asociación de la Industria del Salmón de Chile AG (SalmonChile).

Los autores agradecen el entusiasmo y la visión mostrados por las empresas que participan actualmente de la plataforma de investigación PIISAC y cuyos datos se utilizaron en este estudio: Australis Seafoods, Blumar Seafoods, Camanchaca, Multiexport Foods, Salmones Antartica, Salmones Aysén y Ventisqueros. Otras empresas han contribuido en gran manera a las discusiones acerca de los factores de riesgo e hipótesis, y son bienvenidos a participar en la plataforma de investigación en el futuro. Queremos agradecer a los representantes de INTESAL-SalmonChile por su conocimiento técnico y sus aportes a las reuniones y talleres. Berta Contreras (Conecta SpA) ha entregado un apoyo invaluable al crear una relación entre Ausvet y la industria acuícola salmonera en Chile. Finalmente, agradecemos el incansable esfuerzo de muchas personas de Semapesca, quienes han apoyado este y otros proyectos de PGSA.

Referencias

- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19(6), 716. doi:doi: 10.1109/TAC.1974.1100705
- Arriagada, G., Stryhn, H., Sanchez, J., Vanderstichel, R., Campisto, J. L., Rees, E. E., . . . St-Hilaire, S. (2017). Evaluating the effect of synchronized sea lice treatments in Chile. *Prev Vet Med*, 136, 1-10. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.11.011
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1). doi:10.18637/jss.v067.i01
- Bravo, S. (2003). Sea lice in Chilean salmon farms. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 23, 4.
- Burnham, K. P., & Anderson, D. R. (2002). *Model selection and multimodel inference: A practical information-theoretic approach* (2nd ed.). New York: Springer.
- Cameron, A. C., & Trivedi, P. K. (2013). *Regression analysis of count data*. Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.
- Elanco. (2018). Chile first country to approve Elanco's novel sea lice treatment for salmon. Recuperado desde <https://www.elanco.com/news/press-releases/imvixa>
- Figuerola, C., Bustos, P., Torrealba, D., Dixon, B., Soto, C., Conejeros, P., & Gallardo, J. A. (2017). Coinfection takes its toll: Sea lice override the protective effects of vaccination against a bacterial pathogen in Atlantic salmon. *Scientific Reports*, 7(1), 17817. doi:10.1038/s41598-017-18180-6
- González, L., Robles, C., & Cortez San Martín, M. (2016). Management issues regarding caligidosis treatment on salmon farms in Chile affected by infection salmon anaemia virus (ISAV), *Piscirickettsia salmonis* and *Neoparamoeba perurans*. *Ocean & Coastal Management*, 123, 74-83. doi:10.1016/j.ocecoaman.2016.02.002
- González, M. P., Marín, S. L., & Vargas-Chacoff, L. (2015). Effects of *Caligus rogercresseyi* (Boxshall and Bravo, 2000) infestation on physiological response of host *Salmo salar* (Linnaeus 1758): Establishing physiological thresholds. *Aquaculture*, 438, 47-54. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.12.039
- Jakob, E., Stryhn, H., Yu, J., Medina, M. H., Rees, E. E., Sanchez, J., & St-Hilaire, S. (2014). Epidemiology of *Piscirickettsiosis* on selected Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) salt water aquaculture farms in Chile. *Aquaculture*, 433, 288-294. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.06.018
- Lenth, R. (2018). emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. Recuperado desde <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
- Lhorente, J. P., Gallardo, J. A., Villanueva, B., Carabano, M. J., & Neira, R. (2014). Disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*): coinfection of the intracellular bacterial pathogen *Piscirickettsia salmonis* and the sea louse *Caligus rogercresseyi*. *PLoS One*, 9(4), e95397. doi:10.1371/journal.pone.0095397
- Nilsen, A., Nielsen, K. V., Biering, E., & Bergheim, A. (2017). Effective protection against sea lice during the production of Atlantic salmon in floating enclosures. *Aquaculture*, 466, 41-50. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.09.009
- Orrego, R. (2015). New lice legislation launched in Chile. Recuperado desde <https://www.fishfarmingexpert.com/article/new-lice-legislation-launched-in-chile/>
- R Development Core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria., R Foundation for Statistical Computing.
- Rees, E. E., Ibarra, R., Medina, M., Sanchez, J., Jakob, E., Vanderstichel, R., & St-Hilaire, S. (2014). Transmission of *Piscirickettsia salmonis* among salt water salmonid farms in Chile. *Aquaculture*, 428-429, 189-194. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.031>
- Rozas, M., & Enriquez, R. (2014). *Piscirickettsiosis* and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. *Journal of Fish Diseases*, 13(3), 26.
- Smith, P. A., Rojas, M. E., Guajardo, A., Contreras, J., Morales, M. A., & Larenas, J. (2004). Experimental infection of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* by exposure of skin, gills and intestine with *Piscirickettsia salmonis*. *Dis Aquat Organ*, 61(1-2), 53-57. doi:10.3354/dao061053

- Tadiso, T. M., Krasnov, A., Skugor, S., Afanasyev, S., Hordvik, I., & Nilsen, F. (2011). Gene expression analyses of immune responses in Atlantic salmon during early stages of infection by salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) revealed bi-phasic responses coinciding with the copepod-chalimus transition. *BMC Genomics*, 12, 141. doi:10.1186/1471-2164-12-141
- Yatabe, T., Arriagada, G., Hamilton-West, C., & Urcelay, S. (2011). Risk factor analysis for sea lice, *Caligus rogercresseyi*, levels in farmed salmonids in southern Chile. *Journal of Fish Diseases*, 34(5), 345-354. doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01238.x
- Zuur, A. F., Ieno, E. N., & Elphick, C. S. (2010). A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution*, 1(1), 3-14. doi:10.1111/j.2041-210X.2009.00001.x