

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL

**DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50 (DL₅₀) DE UNA CEPA
CHILENA DE *Vibrio ordalii* EN SALMÓN DEL ATLÁNTICO (*Salmo salar*).**

Memoria de Título presentada como
parte de los requisitos para optar al
TÍTULO DE MÉDICO
VETERINARIO.

CAROLINA SOLEDAD TREUQUEMIL SOTO

VALDIVIA – CHILE

2005

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Ricardo Enríquez S.

COLABORADOR

T.M. Mónica Monrás S.

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Enrique Paredes H.

Dr. Rafael Tamayo C.

FECHA DE APROBACIÓN:

30 DE JUNIO DE 2005.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS	8
5. RESULTADOS	13
6. DISCUSIÓN	18
7. BIBLIOGRAFÍA	22
8. ANEXOS	25

1. RESUMEN

Con el objetivo de determinar la dosis letal 50 (DL₅₀) de una cepa chilena de *Vibrio ordalii* en salmón del Atlántico (*Salmo salar*), se utilizaron 320 alevines de 15-20 gramos provenientes de una piscicultura sin antecedentes de Vibriosis. Durante la semana de aclimatación, fueron chequeados sanitariamente de acuerdo al protocolo de la Organización Internacional de Epizootias (OIE 2003). La cepa de *Vibrio ordalii* (R157) se obtuvo del cepario del Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

Previo al inicio del estudio, se inoculó *Vibrio ordalii* en 10 peces de 15-20 g para confirmar su patogenicidad. Este proceso se repitió 2 veces, en donde los peces presentaron signos clínicos y mortalidad. La bacteria se reaisló desde riñón de peces moribundos y muertos y se cultivó en Agar Tripticasa de Soya (TSA) al 1% NaCl. Para la determinación de la DL₅₀, 5 grupos de 25 peces en duplicado, fueron inyectados intraperitonealmente con 0,1 ml de cultivo puro de *Vibrio ordalii* suspendida en una solución salina estéril (1,5% NaCl) en concentraciones decrecientes desde 10⁷ ufc/pez a 10³ ufc/pez medido a una densidad óptica de 0,646 (D.O._{600 nm}). Se observaron diariamente por 30 días y los peces moribundos y muertos fueron retirados para realizar un examen bacteriológico que confirmara la muerte por la bacteria en estudio.

Se logró reproducir la Vibriosis en los peces inoculados intraperitonealmente con las dosis 10⁷ ufc/pez y 10⁶ ufc/pez, en donde se alcanzaron mortalidades acumuladas de un 90% y 16%, respectivamente. La signología clínica externa más frecuente fue oscurecimiento de la piel, hemorragias en la base de la aletas y poro urogenital y las lesiones internas fueron hígado pálido, esplenomegalia y hemorragia en la cavidad abdominal.

La DL₅₀ se determinó según el método de Reed y Muench (Jurado 1989) considerando los acuarios donde se registró más de un 50% de mortalidad y menos del 50% de mortalidad. La DL₅₀ calculada fue de 10^{7,54} ufc/ml para salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de 15-20g.

Se concluye que bajo las condiciones de este experimento, salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de 15-20 g es susceptible a una cepa chilena de *Vibrio ordalii*.

Palabras claves: *Vibrio ordalii*, dosis letal 50 (DL₅₀), *Salmo salar*.

2. SUMMARY

Determination of the lethal dose 50 (LD₅₀) of a Chilean strain of *Vibrio ordalii* in Atlantic salmon (*Salmo salar*).

In order to determine the lethal dose 50 (LD₅₀) of a Chilean strain of *Vibrio ordalii* in Atlantic salmon (*Salmo salar*), 320 fingerlings of 15 to 20 g were used, proceeding from a free fish farm of Vibriosis. During the week acclimatation, a sanitary control of the fish was carried out according to the protocol of the World Organization for Animal Health (OIE 2003). The *Vibrio ordalii* strain was obtained from Laboratorio Ictiopatología of the Universidad Austral de Chile.

In order to confirm the pathogenicity of the strain 10 fishes of 15-20 g were inoculated intraperitoneally with *Vibrio ordalii* previous to start this study. This process was repeated twice and the fishes showed clinical signs and mortality. The bacteria was reisolated from the kidney of dying and dead fishes, and it was cultivated in Trypticase Soy Agar (TSA) at 1% NaCl. For the LD₅₀ determination, 5 groups of 25 fishes each in duplicate were intraperitoneally inoculated with 0.1 mL of pure culture of *Vibrio ordalii* suspended in a sterile saline solution (1.5% NaCl) at decreasing concentrations from 10⁷ cfu/fish to 10³ cfu/ fish, measured at 0.646 optic density (O.D._{600 nm}). Were observed daily for 30 days, and the dying and dead fishes were collected to perform a bacteriological examination that would confirm the bacteria in study as the dead cause.

Inoculation program succeeded in intraperitoneal route with the doses of 10⁷ cfu/fish and 10⁶ cfu/fish, where accumulated mortalities of 90% and 16% were reached respectively. The most frequent clinical signs were skin darkening, haemorrhage in the base of fins and urogenital pore, and the internal lesions were pale liver, congestive spleen and haemorrhage in the abdominal cavity.

The LD₅₀ was determined with the Reed and Muench methods (Jurado 1989) considering the tanks which registered more than 50% mortality and less than 50% mortality. The LD₅₀ calculated was 10^{7,54} cfu/mL for Atlantic salmon (*Salmo salar*) of 15-20 g.

In conclusion, under this experimental conditions, Atlantic salmon (*Salmo salar*) of 15-20 g is susceptible to a Chilean strain of *Vibrio ordalii*.

Key words: *Vibrio ordalii*, lethal dose 50 (LD₅₀), *Salmo salar*.

3. INTRODUCCIÓN

La salmonicultura en Chile se ha consolidado como una actividad de gran importancia económica, siendo actualmente el 2º productor mundial de salmón y 1º de trucha arcoiris de cultivo. La industria del salmón en el año 2004 se ubicó en el 2º lugar del ranking de exportaciones nacionales, alcanzando los US\$ 1.439 millones FOB, equivalentes a 354,7 mil toneladas netas (Revista Aqua 2005).

El salmón del Atlántico (*Salmo salar*) sigue siendo la especie más representativa de la producción mundial de salmónidos, respecto de volumen, número y distribución de los países que lo producen (Aquanoticias 2003). Durante el 2004 la producción de salmón del Atlántico en Chile fue de 196.903,3 toneladas netas (Revista Aqua 2005).

El crecimiento de la industria salmonera no sería posible, si el país no ostentara condiciones naturales propicias, caracterizadas por la disponibilidad de extensas zonas marinas costeras, lacustres y fluviales que ofrecen óptimas condiciones ambientales para el cultivo de estas especies, en gran parte libres de contaminación y con suficientes horas luz en épocas invernales (Méndez 1998). Sin embargo, junto con el aumento en la producción, los peces han debido ser criados en condiciones de alta densidad poblacional y manejo intensivo, debido a lo cual las enfermedades infectocontagiosas se han convertido en una amenaza constante para la piscicultura nacional (Schäfer y col 1990).

Las enfermedades bacterianas son responsables de grandes mortalidades en peces tanto, de estado silvestre como en cautiverio. Se ha determinado que estas enfermedades son principalmente producidas por microorganismos Gram negativos, los cuales pueden actuar como patógenos primarios o ser invasores oportunistas y/o secundarios, causando procesos patológicos en peces susceptibles (Frerichs y Roberts 1989).

Una enfermedad de reciente aparición en el país es la denominada Vibriosis, que corresponde a una infección bacteriana sistémica que afecta a diferentes especies de peces marinos, en estuario y en ocasiones en agua dulce, causada por bacterias del género *Vibrio sp.* Conocida por siglos, es considerada una de las principales enfermedades que afectan a los peces en agua de mar e identificada con términos tales como “Peste Roja”, “Plaga Roja”, “Enfermedad Ulcerativa” y “Furunculosis de agua de mar” (Godoy 2004).

La enfermedad en Chile se diagnosticó por primera vez en julio de 2003, a partir de tres brotes que afectaron a salmónes del Atlántico (*S. salar*) cultivados en balsas jaulas en el sur de Chile, dos de los brotes ocurrieron en Quellón, en la isla de Chiloé y otro brote en Lagreze, en el área del Archipiélago de las Guaitecas (los brotes ocurren luego de 25-125 días siguientes del traslado al agua de mar). Los peces afectados pesaban entre 125 y 400g,

con una temperatura del agua de 9,4-9,9°C. Los peces fueron tratados con flumequina, ácido oxolínico y oxitetraciclina (Colquhoun y col 2004). Posteriormente también ha afectado a trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) (Godoy 2004).

V. ordalii es una de las principales causas de Vibriosis en salmónidos marinos silvestres y de cultivo en el Pacífico Noroeste de Estados Unidos y Japón (Actis y col 1999). También ha sido diagnosticada en Australia y Nueva Zelanda (Colquhoun y col 2004). Anteriormente esta bacteria había sido identificada como *V. anguillarum* biotipo II, pero posteriormente fue demostrado que genética y fenotípicamente era distinta a *V. anguillarum* (Schiewe y col 1981, Holt y col 2000). No se encuentra ampliamente distribuida como *V. anguillarum*, siendo aislada sólo de peces y no del sedimento marino ni tampoco del agua (Plumb 1999).

V. ordalii pertenece a la familia Vibrionaceae, género *Vibrio* (Holt y col 2000). Se caracteriza microscópicamente por ser un bacilo curvo Gram negativo, de aproximadamente 2,5-3,0 µm y móvil a través de un flagelo polar. Puede ser cultivada en la mayoría de los medios bacteriológicos tales como TSA (Agar Tripticasa de Soya), agar marino, BHIA (Agar Infusión Cerebro Corazón), suplementado con 1-2% NaCl. En TSA, puede ser fácilmente distinguido de *V. anguillarum* por la morfología de las colonias. Mientras que las colonias de *V. anguillarum* se pueden observar luego de 24-48 horas de incubación a 22°C, siendo las colonias circulares, amarillas-café, opacas y de un tamaño de 3 a 5 mm, *V. ordalii* sólo es visible luego de 4 a 6 días, siendo las colonias blancas, circulares, convexas, translúcidas y de alrededor de 1-2 mm de diámetro (Schiewe y col 1981, Actis y col, 1999, Roberts 2001).

Bioquímicamente, se caracteriza por ser catalasa y oxidasa positivo, anaerobio facultativo, sensible al vibriostático O/129, de igual manera que *V. anguillarum*, pero se diferencia de esta bacteria por generar reacciones negativas a arginina, citrato Christensen, citrato Simmons, lipasa, ONPG (o- nitrophenyl β-D galactopyranoside), no hidroliza el almidón, negativo a la producción de acetylmethylcarbinol (Voges Proskauer), no produce ácido a partir de celobiosa, glicerol, sorbitol y trehalosa y porque no crece a 37°C (Schiewe y col 1981, Actis y col 1999, Austin y Austin 1999).

V. ordalii fue descrita por primera vez por Harrel y col (1976), cuando fue aislada de smolts de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) en Puget Sound, Estados Unidos (Egidius 1987).

Se postula que la infección por *V. ordalii* comienza en el recto y tracto gastrointestinal posterior. Alternativamente su presencia en la piel sugiere que la entrada puede proceder directamente de la invasión del integumento (Austin y Austin, 1999).

Vibriosis causada por *V. anguillarum* y *V. ordalii* están asociadas a altas densidades de cultivo, disminución de la concentración de oxígeno, incremento de los productos excretorios y al aumento de la temperatura del agua. Muchos de esos factores son resultado directo de condiciones de cultivo inadecuadas (Wards y col 1991).

Actualmente en Chile la Vibriosis afecta principalmente a todas las tallas de las especies salmón del Atlántico y trucha arcoiris cultivados en centros de mar y zonas estuarinas de las regiones X, XI y XII. Los cuadros observados se presentan durante todo el año con características de subaguda a crónica, registrándose mortalidades acumuladas promedio entre 5 y 22%, aunque se han presentado casos con mortalidades de hasta un 35%. Las recaídas infecciosas son frecuentes, especialmente cuando las terapias han sido inoportunas o se presentan cuadros infecciosos mixtos (Godoy 2004).

Bioquímicamente, las cepas de referencia de *V. ordalii* presentan alta homología con los aislados nacionales. Por otra parte, a partir de la secuenciación del gen 16s ribosomal amplificado, mediante la reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) realizada a cepas aisladas de salmón del Atlántico y trucha arcoiris – en la Universidad de Compostela, España – se determinó una homología superior al 99% con la secuencia de *V. ordalii* ATCC 33509T (Godoy 2004). En otro estudio fenotípico y genético realizado en Canadá se confirmó que cepas chilenas tenían 99% de similitud con *V. ordalii* (Colquhoun y col 2004).

La infección por *V. ordalii* es categorizada como una septicemia hemorrágica bacteriana. Esta enfermedad difiere de la causada por *V. anguillarum* en que no se presenta en forma uniforme en tejidos y órganos, teniendo tendencia a la formación de microcolonias en músculo esquelético, corazón, branquias, regiones anterior y posterior del tracto gastrointestinal (Ransom y col 1984, Actis y col 1999). También un bajo número de bacterias están presentes en la sangre durante la infección en comparación con infecciones de *V. anguillarum*, posiblemente porque la bacteremia se desarrolla más tardíamente (Austin y Austin 1999, Plumb 1999).

Durante el progreso de la infección, existe una correlación entre la presencia de *V. ordalii* en la sangre del huésped y la marcada disminución en la cantidad de leucocitos en sangre, sugiriendo la producción de un factor leucocítico, pudiendo este factor tener un importante rol en la patogénesis de la infección (Ramson y col 1984).

Otros factores que pueden tener un importante rol en la patogénesis, es la habilidad de *V. ordalii* de resistir la actividad bactericida del suero normal de la trucha arcoiris, lo que ha sido correlacionado con la virulencia de esta bacteria (Trust y col 1981). También ha sido reportado que cepas de *V. ordalii* pueden aglutinar eritrocitos de trucha y seres humanos, como también células de levadura (Actis y col 1999).

Los primeros signos de Vibriosis son anorexia, natación errática, oscurecimiento de la piel y muerte súbita. En un curso peragudo en salmónidos jóvenes, puede presentarse la muerte sin signos clínicos, excepto la presencia ocasional de edema periorbital y/o abdominal (Inglis y col 1993, Roberts 2001).

Cuando el curso de la enfermedad es agudo, aparecen en la piel protuberancias de color oscuro, que se ulceran liberando un exudado sanguinolento, causando de esta forma lesiones necróticas rojas en la musculatura. El tejido necrótico contiene un alto número de bacterias. (Inglis y col 1993). Además se presenta eritema en la base de las aletas, ano, alrededor de la boca y distensión intestinal con un claro fluido viscoso (Austin y Austin 1999). Internamente, dilatación y licuefacción del bazo y riñón, petequias en peritoneo parietal y visceral. También pueden observarse hemorragias focales en la superficie del corazón y branquias pálidas (Roberts 2001).

En peces infectados en forma crónica, las lesiones de la piel pueden evolucionar hacia una granulomatosis, las branquias permanecen pálidas, reflejando una severa anemia y las hemorragias en la cavidad abdominal se convierten en adherencias fibrinosas entre las vísceras. En el ojo, el primer signo es la opacidad corneal, que puede llegar a la ulceración y pérdida del contenido de la cavidad orbital (Inglis y col 1993, Roberts 2001).

Las medidas de control de la enfermedad se basan en mejorar las condiciones ambientales o rutinas de producción, como por ejemplo tratar de mejorar los parámetros de calidad del agua, densidad de cultivo, mantener altos estándares de sanitización como desinfección de equipos, utensilios y restricción en el número de visitantes (Plumb 1999). El tratamiento incluye el uso de antibióticos y vacunación. La selección del antibiótico a usar debe basarse en los resultados de un antibiograma (Actis y col 1999). La terapia con antibióticos es el método más usado para el control de brotes clínicos de la enfermedad. Los medicamentos más utilizados son la oxitetraciclina, sulfonamidas potenciadas y los nitrofuranos, pero debido a que generalmente se administran por vía oral con los alimentos, la anorexia impide a los peces afectados el correcto consumo de la droga (Roberts 1981, Inglis y col 1993, Roberts 2001).

Debido a la importancia de la Vibriosis en el cultivo de salmonídeos, se desarrollaron vacunas para su prevención. Las vacunas tradicionales consisten en bacterias muertas en formalina y/o de componentes de su membrana. Éstas proporcionan una mejor protección cuando son aplicadas vía intraperitoneal que por vía oral o por inmersión. Sin embargo, la vía intraperitoneal tiene algunas limitaciones: mayor costo, más difícil de aplicar y genera mayor estrés en los peces. Actualmente existen vacunas bivalentes que protegen contra *V. anguillarum* y *V. ordalii* (Inglis y col 1993). En Chile, entre las medidas de prevención se encuentran el uso de autovacunas, las cuales están autorizadas y disponibles en el mercado y son producidas de manera específica con los aislados de *Vibrio* obtenidos de cada centro donde será utilizada la autovacuna (Godoy 2004).

El término DL_{50} es el más representativo de la toxicidad aguda de una sustancia. Se define como aquella dosis del compuesto que produce la muerte del 50% de los animales (Jurado 1989). La DL_{50} es señalada como una determinación simple, pero imperfecta, de toxicidad de una sustancia. Imperfecta desde el punto de vista de la toxicidad, ya que existe un amplio margen de efectos patológicos, entre la ausencia de efecto y la letalidad. Sin embargo, la DL_{50} es un valor útil, puesto que es imprescindible para el estudio de la toxicidad a largo plazo (Jurado 1989). Adicionalmente la DL_{50} es un dato de suma importancia para la determinación experimental de la efectividad de terapias y vacunas.

Dado el carácter emergente de la enfermedad causada por *V. ordalii* en el cultivo de salmones en el país, es de gran ayuda aportar nuevos antecedentes, para así contar con la mayor información posible, y de este modo mejorar el control en el caso de presentación de esta enfermedad. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue reproducir experimentalmente la enfermedad en salmones del Atlántico de 15-20 g utilizando una cepa nacional de *V. ordalii* y determinar la DL_{50} de esta cepa.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Material biológico

Para la realización de este estudio se utilizaron 320 ejemplares de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de 15-20 gramos, los cuales fueron obtenidos de una piscicultura de la Décima Región, sin antecedentes de Vibriosis, siendo transportados en recipientes plásticos con oxigenación constante a través de la conexión a un cilindro de oxígeno hasta el Laboratorio de Ictiopatología del Instituto de Patología Animal de la Universidad Austral de Chile.

Para las inoculaciones experimentales se utilizó una cepa nacional de *Vibrio ordalii* (R157) proveniente del cepario del Laboratorio de Ictiopatología de la Universidad Austral de Chile.

4.1.2. Materiales sala de acuarios

- 12 acuarios de fibra de vidrio de 80 L de capacidad.
- 12 filtros con carbón activado.
- 24 difusores de aire.
- 12 bombas.
- 12 termómetros.
- 12 calefactores de 60 W.
- 1 termostato que regula el funcionamiento de los calefactores.
- 1 sistema de emergencia eléctrico.
- Alimento extruído comercial para peces.
- Densímetro.

4.1.3. Materiales de laboratorio

Material de disección, 1 mechero, asa de cultivo, portaobjetos, aceite de inmersión, placas Petri, Agar Soya Trypticosa (TSA)¹, Cloruro de sodio (NaCl)¹, bandejas para realizar la disección, colorantes para tinción de Gram, toalla de papel, hipoclorito de sodio (6 g/L), alcohol al 70% y 100%.

¹ Merck Química Chilena Ltda. Francisco de Paula Taforó N° 1981. Santiago, Chile.

4.2. MÉTODOS

La cepa de *V. ordalii* fue descongelada y cultivada en caldo TSA al 1% NaCl. Luego con el propósito de recuperar e incrementar su virulencia, se realizaron 3 pasajes seguidos en salmón del Atlántico (*S. salar*). Para ello, se inyectaron vía intraperitoneal 10 peces de entre 15-20 gramos, con una dosis bacteriana inoculada de 10^8 ufc/pez medido por espectrofotometría². Se repitieron dos pasajes más, con 10 peces cada uno, produciendo mortalidades en los tres pasajes. Se reaisló la bacteria a partir de riñón y se cultivó en agar TSA al 1% de NaCl, incubado a 23-24°C por 48 horas. Se preparó la suspensión bacteriana en una solución salina al 1,5% NaCl a una densidad óptica (D.O._{.600 nm}) equivalente a 0.646 medido por espectrofotometría y que correspondió a una concentración de $2,3 \times 10^8$ ufc/ml por recuento en placa. A partir de ésta suspensión se realizaron cinco diluciones en base 10.

4.2.1. Recepción de los peces

Al momento de llegar los peces al Laboratorio de Ictiopatología, fueron ubicados en la sala de estanques, donde los peces fueron mantenidos en un estanque circular de 300 litros con recirculación de agua y aireación constante, a una temperatura promedio de 8°C durante una semana para su aclimatación. Durante este período se realizó un chequeo sanitario según el Manual de Diagnóstico de Enfermedades de Animales Acuáticos (OIE 2003) a una muestra de 20 peces obtenidos al azar, con el propósito de detectar la presencia de enfermedades infectocontagiosas que pudieran ser causa de error en el estudio.

4.2.2. Diseño del grupo experimental

Los grupos experimentales fueron desafiados el día cero mediante la inoculación intraperitoneal de 0,1 ml de suspensión bacteriana en concentraciones decrecientes de *V. ordalii* en duplicado. Se mantuvieron dos grupos controles a los cuales se les inoculó 0,1 ml de solución al 1,5% NaCl estéril. Previo a la inoculación, los peces fueron anestesiados por inmersión con BZ-20^{®3} (Etil p_aminobenzoato).

Posterior a la inoculación, los peces fueron distribuidos en 12 acuarios de fibra de vidrio (cada acuario con 25 peces) con recirculación y aireación constante. Cada grupo de peces fue mantenido en el inicio con agua dulce, la que posteriormente fue siendo reemplazada gradualmente con agua de mar, hasta llegar a un 15‰ de salinidad. Además se aumentó la temperatura de 12° a 14°C a través del uso de calefactores en cada uno de los acuarios. La alimentación de los peces consistió en una dieta comercial al 2% del peso corporal / día.

²Spectronic tipo Génesis 8.

³Veterquímica: camino a Melipilla 5641 Los Cerrillos, Santiago de Chile.

Como medida preventiva se utilizó hipoclorito de sodio (6g/L) para la desinfección de materiales, en el pediluvio y en la desinfección periódica de la sala de acuarios. Todas las muestras de los peces infectados o no infectados, cultivos microbianos y materiales utilizados fueron esterilizados en autoclave, para así evitar la diseminación de la enfermedad.

4.3. INOCULACIÓN

El método de inoculación con los doce grupos experimentales fue el siguiente:

Cuadro 1: Grupos experimentales de 25 salmones del Atlántico (*S. salar*) de 15-20 g inoculados vía intraperitoneal (I.P.) con 0,1 ml de una concentración de *V. ordalii* a una T° promedio de 14°C y 15‰ de salinidad.

Grupo experimental	Concentración del inóculo
1	10 ⁷ ufc/pez
2	10 ⁷ ufc/pez
3	10 ⁶ ufc/pez
4	10 ⁶ ufc/pez
5	10 ⁵ ufc/pez
6	10 ⁵ ufc/pez
7	10 ⁴ ufc/pez
8	10 ⁴ ufc/pez
9	10 ³ ufc/pez
10	10 ³ ufc/pez
11	1,5% NaCl
12	1,5% NaCl

Los grupos 11 y 12 corresponden a los grupos controles. Los acuarios fueron revisados diariamente para el control de la temperatura del agua y mortalidad.

4.4. CONFIRMACIÓN DE LA MORTALIDAD POR *V. ordalii*.

De los peces moribundos y/o muertos se efectuó un completo examen de necropsia siguiendo el procedimiento descrito por la American Fisheries Society, Fish Health Blue Book (1992), realizando improntas de hígado, bazo y riñón para tinción de Gram y se procedió a aislar la bacteria a partir del riñón, según Ransom y col (1984).

Para la realización del examen externo, se consideraron principalmente estado de la piel (coloración), aletas, ojos, branquias y opérculo.

Posterior al examen externo, se realizó el examen interno, siguiendo la técnica de necropsia descrita por American Fisheries Society (1992), que consiste en el corte de aleta izquierda por la base mediante el uso de tijeras, introducción de la punta de la tijera en la base de la aleta, corte ventral hasta la línea media siguiendo el curso de ésta hasta poco antes del poro anal, luego corte dorsocraneal apegado a la línea lateral y posteriormente descenso por detrás de las branquias, desprendimiento de la pared ventrolateral y observación de los órganos internos, teniendo en consideración rasgos tales como: color y consistencia, hemorragias, inflamación, pústulas, nódulos y la presencia o ausencia de comidas o mucus en el estómago e intestino.

Para el aislamiento bacteriano se tomaron muestras de riñón de los peces moribundos y/o muertos con un asa estéril y se sembraron mediante estrías en placas de agar TSA al 1% de NaCl. La temperatura de incubación fue de 23-24°C. Las colonias que presentaron características morfológicas similares a *V. ordalii* fueron sometidas a pruebas bioquímicas, con el propósito de confirmar su clasificación taxonómica.

Al finalizar el desafío experimental, los peces vivos fueron sacrificados con sobredosis de BZ-20[®] (Etil p_aminobenzoato) y posteriormente fueron sometidos a exámenes de necropsia y aislamiento bacteriano.

4.5. MÉTODO DE CÁLCULO PARA LA DL₅₀

Para la determinación de DL₅₀ se utilizó la fórmula de Reed y Muench, teniendo sólo en cuenta los valores próximos al 50% de mortalidad y el logaritmo del incremento de las dosis adyacentes a dicho 50% (Jurado 1989).

El procedimiento de cálculo de la DL₅₀ se muestra a continuación:

4.5.1. Factor de distancia proporcional

$$D.P. = \frac{\text{mortalidad} > 50\% - 50\%}{\% \text{ mortalidad} > 50\% - \% \text{ mortalidad} < 50\%}$$

$$DL_{50} = (\log \text{ dilución con más de } 50\% \text{ mortalidad}) + (D.P. \times \log \text{ factor dilución})$$

Factor de dilución: 10

Logaritmo de la dilución: 1

4.6. ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Los resultados de las mortalidades diarias y acumuladas (en porcentaje) se presentan mediante cuadros y figuras.

5. RESULTADOS

5.1. MORTALIDAD

Las mortalidades de los peces fueron observadas por 30 días en forma diaria y acumulada.

A continuación en el cuadro 2 se muestra el porcentaje total de mortalidades por grupo según dosis de inóculo.

Cuadro 2: Mortalidades acumuladas asociadas a *Vibrio ordalii* según dosis inoculadas intraperitonealmente en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de 15-20 g a una temperatura promedio de 14°C y 15 ‰ de salinidad.

Grupos	Concentración ufc/pez	Nº de peces inoculados	Mortalidad acumulada	Mortalidad %
1+2	10 ⁷	50	45	90
3+4	10 ⁶	50	8	16
5+6	10 ⁵	50	0	0
7+8	10 ⁴	50	0	0
9+10	10 ³	50	0	0
11+12	1,5% NaCl	50	0	0

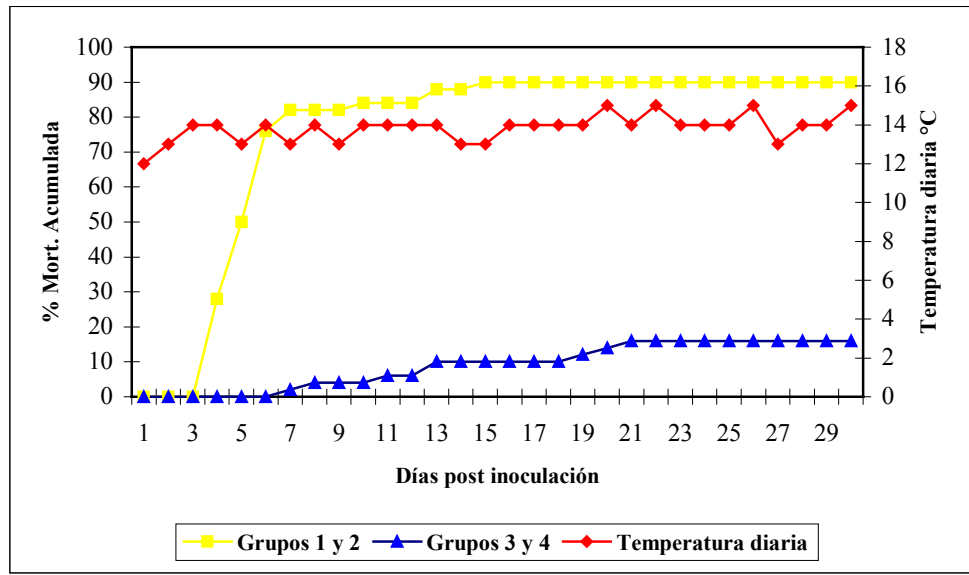


Figura 1: Promedio de la mortalidad acumulada en salmón del Atlántico (*S. salar*) posterior a la inoculación con una cepa de *V. ordalii* en los grupos 1 y 2 (10^7 ufc/pez) y grupos 3 y 4 (10^6 ufc/pez) a una T° de 14°C y 15‰ de salinidad.

En los grupos 1 y 2 (dosis 10^7 ufc/pez) las mortalidades se inician a partir del día 4 post inoculación, siendo este día el de mayor mortalidad (14 peces), para terminar completamente el día 16. El total de peces muertos en este grupo fue de 45 (cuadro 2), lo que corresponde a un 90% de mortalidad acumulada. La letalidad fue de un 100% y 5 peces sobrevivieron al desafío (Anexo 1 y 2).

En los grupos 3 y 4 (dosis 10^6 ufc/pez), las mortalidades se presentaron entre los días 7 y 21 post inoculación. La mortalidad acumulada fue de un 16%, lo que correspondió a 8 peces, la letalidad fue de un 100% y 42 peces sobrevivieron al experimento (Anexo 3 y 4).

En los grupos 5 y 6 (10^5 ufc/pez), 7 y 8 (10^4 ufc/pez) y 9 y 10 (10^3 ufc/pez) no se registraron signos clínicos de Vibriosis como tampoco mortalidades.

Los grupos controles no registraron mortalidades ni se evidenciaron signos clínicos durante el período de experimentación.

5.2. SIGNOS CLÍNICOS

Los signos clínicos que se evidenciaron en los peces enfermos fueron: descamación, letargia, anorexia, oscurecimiento de la piel, palidez branquial, hemorragias en la boca, en la base de las aletas y poro urogenital. Algunos peces presentaron exoftalmia y hemorragia ocular.

La signología interna consistió en palidez del hígado, esplenomegalia y hemorragia en cavidad abdominal. Con menor frecuencia fue posible observar enteritis.

5.3. DIAGNÓSTICO

Se clasificaron como mortalidades por *V. ordalii* todos los peces que al examen clínico presentaron los signos típicos de la enfermedad, junto con su posterior reislamiento desde riñón. La confirmación del agente causal se realizó mediante la detección de colonias típicas, tinción de Gram y pruebas bioquímicas que se presenta en el cuadro 3.

A partir de riñón de los peces enfermos se reisló la bacteria, sembrándose en agar TSA al 1% NaCl a 23-24 °C que posterior a una incubación de 48 horas, se obtuvieron colonias blancas, pequeñas, circulares, convexas y viscosas.

Se realizaron improntas de hígado, bazo y riñón para tinción de Gram, lo que dio como resultado la presencia de bacilos pleomórficos Gram negativos.

La cepa bacteriana en estudio no se logró reislar en muestras de riñón en ninguno de los peces sobrevivientes de los grupos experimentales.

Cuadro 3: Resultado de las pruebas bioquímicas realizadas a partir de colonias representativas de *V. ordalii* obtenidas de cultivos de riñón en agar TSA al 1% NaCl a 23-24 °C en salmón del Atlántico inoculados con 10⁷ufc/pez y 10⁶ ufc/pez.

Característica	10 ⁷ ufc/pez	10 ⁶ ufc/pez	<i>V. ordalii</i> *
Motilidad	+	+	+
Oxidasa	+	+	+
Fermentación Glucosa	+	+	+
Gas Glucosa	-	-	-
Indol	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-
Rojo Metilo	-	-	-
Arginina dihydrolasa	-	-	-
Lisina decarboxilasa	-	-	-
Ornitina decarboxilasa	-	-	-
Reducción Nitrato	+	+	+
Citrato Simmons	-	-	-
Hidrólisis Gelatina	+	+	+
ONPG	-	-	-
Sensibilidad O/129 ⁴	+	+	+
Producción de ácido de:			
Arabinosa	-	-	-
Celobiosa	-	-	-
Galactosa	-	-	-
Lactosa	-	-	-
Manitol	-	-	-
Ramnosa	-	-	-
Salicina	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Trehalosa	+	+	-
Xilosa	-	-	-

(+) = positivo

(-) = negativo

(*) Schiewe y col 1981.

⁴ Oxoid® P.V. Equip Ltda. Los Capitanes 1388. Providencia, Chile.

5.4. DETERMINACIÓN DE LA DL₅₀

Considerando las mortalidades de los grupos afectados, se procedió a realizar el cálculo con los valores de los grupos inoculados con las dosis 10⁷ufc/pez y 10⁶ufc/pez, lo que correspondió a un 90% y 16% respectivamente (cuadro 2).

El cálculo fue el siguiente:

$$\text{Distancia Proporcional (DP)} = \frac{90\% - 50\%}{90\% - 16\%} = 0,54$$

$$DL_{50} = \log \text{ dilución } >50\% + DP \times \log \text{ factor de dilución}$$

$$DL_{50} = 7 + 0,54 \times 1 = 7,54$$

$$DL_{50} = 10^{7,54}$$

Por lo tanto la DL₅₀ calculada para salmón del Atlántico (*S. salar*) de 15-20 gramos inoculados intraperitonealmente con *Vibrio ordalii* a una T° promedio de 14°C y un 15 ‰ de salinidad es de **10^{7,54} ufc/ml.**

6. DISCUSIÓN

En el presente estudio se utilizó una cepa chilena de *V. ordalii* (R157), la cual presentó patogenicidad para salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de 15-20 g. Es importante destacar que este estudio es el primero que se realiza en Chile, utilizando salmón del Atlántico para la determinación de la DL_{50} de una cepa chilena de *V. ordalii*.

La cepa utilizada en esta investigación ha sido identificada como un *V. ordalii* atípico por sus características fenotípicas y genéticas (Godoy 2004, Colquhoun y col 2004). Fue aislada a partir de peces durante un brote de Vibriosis en salmones del Atlántico (*S. salar*), ocurrido a fines del 2003, en el sur de Chile (Chiloé), lo que señala que la cepa presenta virulencia para la especie en estudio. De igual manera que en otras infecciones experimentales, se realizaron tres pasajes en peces de la misma especie y peso, con el objeto de mantener y recobrar la virulencia de la cepa, que pudo verse disminuida por el almacenaje en el laboratorio (Michel 1980, Trust y col 1981, Bricknell y col 1996).

La vía de administración utilizada fue la intraperitoneal, vía que también fue usada en otros estudios realizados con *V. ordalii* por Wang y col (1998) en Naive blue gourami (*Trichogaster trichopterus*) y *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* por Díaz (2003) en salmón del Atlántico. La ventaja de la inyección intraperitoneal es que permite conocer el número de bacterias que ingresó al organismo (Michel 1980). Por otra parte la principal desventaja de ésta vía es que traspasa las barreras naturales del pez, por lo que no es un método que se asemeje a una infección natural de Vibriosis, lo que sí ocurriría en una infección experimental vía baño. La cantidad de inóculo bacteriano fue de 0,1 ml intraperitoneal para las distintas suspensiones bacterianas, volumen que también utilizaron otros investigadores como Trust y col (1981), Wang y col (1998) y Díaz (2003).

La duración del estudio fue de 30 días, igual al período usado por García y col (2000) y Díaz (2003). En cambio difiere de lo realizado por Trust y col (1981), esto se debe a que el método utilizado en este estudio es distinto, ya que determinaron la DL_{50} de *V. ordalii* en salmón coho de 10-20 g en 7 días, utilizando la vía subcutánea a nivel de la inserción posterior de la aleta dorsal y la cantidad de peces en el desafío fue menor, ya que usaron 5 peces por cada dosis inoculada.

Se pudo confirmar que la cepa en estudio tiene la capacidad de producir la enfermedad, ya que produjo signos clínicos y mortalidades en los grupos de s. del Atlántico con las dosis 10^7 ufc/pez y 10^6 ufc/pez. La mortalidad acumulada para los grupos inoculados con 10^7 ufc/pez (grupos 1 y 2) fue de un 90%, valor similar a los obtenidos en un estudio que utilizó salmón del Atlántico de 18 g inoculados con una cepa de *Vibrio ordalii* en dosis de 5×10^4 ufc/pez y $1,5 \times 10^4$ ufc/pez, en donde se obtuvieron mortalidades acumuladas de 94,3% y 91,9% respectivamente (Colquhoun 2004). Para los grupos 3 y 4

inoculados con la dosis 10^6 ufc/pez, la mortalidad acumulada correspondió a un 16 %, cifra que se encuentra dentro de los rangos de presentación de Vibriosis en Chile donde se registran mortalidades acumuladas promedio entre un 5 y 22% (Godoy 2004).

Cabe mencionar que en este estudio la temperatura fue aumentada gradualmente de 12° C a 14° C al igual que la salinidad, de 0 a un 15 ‰ desde el día 3° post inoculación, por lo que bajo estas condiciones medioambientales propiciaron la ocurrencia de mortalidades desde el 4° día post inoculación en los grupos inoculados con la dosis 10^7 ufc/pez (grupos 1 y 2) y desde el 7° día post inoculación en los grupos inoculados con las dosis 10^6 ufc/pez (grupos 3 y 4). Se ha demostrado que factores ambientales como temperatura y salinidad, son muy importantes para la quimiotaxis y la adhesión de *V. anguillarum* y otras especies de *Vibrio* a las mucosas de los peces. En un estudio realizado con gilt-head seabream (*Sparus aurata*), se estableció que un aumento de los valores de temperatura y salinidad ambientales, determinaron un incremento en el número de células de *V. anguillarum* adheridas a branquias, mucus intestinal y piel (Bordas y col 2003).

El curso de la enfermedad en los grupos de peces en que se presentó la enfermedad (dosis 10^7 ufc/pez y 10^6 ufc/pez) fue de tipo agudo, debido a que las mortalidades ocurrieron entre 24-48 horas desde que los peces presentaron signos clínicos sugerentes de Vibriosis. Los peces se observaron letárgicos, con oscurecimiento de la piel, anorexia y hemorragias en la base de las aletas y ano, signología también observada en salmón del Atlántico con diagnóstico de Vibriosis en el sur de Chile (Godoy 2004).

La signología clínica interna de los peces moribundos y muertos consistió en: esplenomegalia, hígado pálido y hemorragia en la cavidad abdominal, con menor frecuencia se presentó enteritis. Estos signos coinciden con los descritos por Inglis y col (1993), Plumb (1999) y Godoy (2004) para Vibriosis en salmonídeos.

Es importante destacar que durante el transcurso del experimento no fue posible observar alteraciones epidérmicas, principalmente úlceras en la piel, signología clínica característica de Vibriosis por *V. ordalii* que presentan los salmonídeos naturalmente infectados (Inglis y col 1993, Roberts 2001). Esto puede deberse a que los peces inoculados eran juveniles (15-20 gramos) y porque las dosis inoculadas fueron en altas concentraciones del patógeno, por lo cual las mortalidades se presentaron en forma aguda. Estas lesiones epidérmicas corresponden a un curso crónico de la enfermedad, como lo señala Roberts (2001).

Se obtuvo un 100% de reaislamiento de la bacteria en los peces muertos y/o moribundos a partir de muestras de riñón, en cultivo en agar TSA al 1% NaCl a una temperatura de 23-24° C por 24-48 horas de incubación; a diferencia de los peces sobrevivientes en donde no fue posible reaislar la bacteria en muestras de riñón, por lo que se puede deducir que el sistema inmune de éstos peces fue capaz de resistir la infección intraperitoneal por *V. ordalii*.

La utilización de improntas de hígado, bazo y riñón fue un método útil y de rápida confirmación de la presencia de una bacteria Gram negativa, de forma bacilar, lo que correspondió morfológicamente con *V. ordalii*.

Con el uso de pruebas bioquímicas fue posible comprobar que la cepa en estudio tendría mayor similitud con *V. ordalii*, ya que solamente se diferencia de la bacteria típica por ser trehalosa positivo. Los resultados de las pruebas bioquímicas obtenidos en este estudio son similares a los encontrados por Colquhoun y col (2004), quienes realizaron la primera descripción de *V. ordalii* en Chile.

Durante el proceso de producción de vacunas, estas se controlan en el laboratorio mediante diferentes ensayos. Uno de ellos es el de potencia, el cual mide la protección que confiere el producto a animales inmunizados que reciben una dosis conocida de microorganismos, la cual se expresa cuantitativamente y su unidad de medida es la DL₅₀ (Fajardo y col 1998).

La DL₅₀ se calculó según el método de Reed y Muench (Jurado 1989), determinándose en 10^{7,54} ufc/ml para salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de 15-20 gramos inoculado vía intraperitoneal a una temperatura promedio de 14°C y un 15 ‰ de salinidad, resultado similar a los encontrado por otro estudio realizado por Díaz (2003), en donde obtuvo una DL₅₀ de *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* de 10^{7,48} ufc/ml, las características del desafío fueron similares, sólo que la temperatura promedio usada fue de 15°C.

Los resultados obtenidos en este estudio podrían ser usados para la determinación de la eficacia de vacunas para la prevención de Vibriosis, en estudios de patogenia y posteriores investigaciones con respecto a *V. ordalii* en salmonídeos.

CONCLUSIONES

1. La Vibriosis puede ser reproducida en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de 15-20 gramos mediante inoculación intraperitoneal con la cepa nacional de *Vibrio ordalii* (R157).
2. La DL_{50} determinada fue de $10^{7,54}$ ufc/ml para la cepa en estudio, en salmón del Atlántico de 15-20 gramos, a una temperatura promedio de 14° C y una salinidad de 15 ‰.
3. Los signos clínicos externos más frecuentes fueron oscurecimiento de la piel, hemorragias en la base de las aletas y poro urogenital. Las lesiones internas fueron hígado pálido, esplenomegalia y hemorragia en la cavidad abdominal.

7. BIBLIOGRAFÍA

Actis LA, Tolmasky ME, Crosa JH. 1999. Vibriosis. En: Woo P, Bruno D (eds). *Fish diseases and disorders: Viral, Bacterial and Fungal Infections*. Pp 523- 540. Department of Zoology University of Guelph, Canada.

American Fisheries Society. Fish Health Blue Book. 1992. Procedimientos para la detección e identificación de ciertos patógenos de peces. (Traducción). Traducido por Alejandro del Valle. Editorial Hemisferio Sur S. A. Buenos Aires. Argentina.

Aquanoticias. 2003. Producción y mercado: La salmonicultura mundial en el año 2003. 15, 35-37.

Austin B, Austin D. 1999. Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish. Third edition. Ed. Springer-Praxis. Chichester. United Kingdom.

Bordas M, Balebona M, Chabrillón M, Rodríguez-Maroto J, Moriñigo M. 2003. Influence of temperature and salinity on the adhesion to mucous surfaces of gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.) of pathogenic strains of *Vibrio alginolyticus* and *Listonella anguillarum*. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 23: 273-280.

Bricknell I, Bruno D, Stone J. 1996. *Aeromonas salmonicida* infectivity studies en goldsinny wrase, *Cetenolabrus rupestris* (L). *J Fish Dis* 19, 469-474.

Colquhoun D, Aase I, Wallace C, Baklien A, Gravningen K. 2004. First description of *Vibrio ordalii* from Chile. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 24, 185-188.

Díaz C. 2003. Determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀) de una cepa nacional de *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* en salmón del Atlántico (*Salmo salar*). *Memoria de titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

Egidius E. 1987. Vibriosis: Pathogenicity and Pathology. A Review. *Aquaculture* 67, 15-28.

Fajardo E, Ortiz B, Chávez A, Gaínza N, Izquierdo L, Hernández Y. 1998. Normalización de la dosis letal 50% de cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas en el control de la vacuna antileptospirocica cubana para uso humano. *Rev Cubana Med Trop* 50, 22-26.

Frerichs GN, Roberts RJ. 1989. The Bacteriology of Teleosts. En: Roberts RJ (ed). *Fish pathology*. Balliere Tindall. Second edition. Ed. W.B. Sanders London. Pp 289-302.

García C, Pozet F, Michel C. 2000. Standarization of experimental infection with *Flavoacterium psychrophilum*, the agent of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry syndrome. *Dis Aquat Org* 42, 191-197.

Godoy M. 2004. Salmónidos afectados por Vibriosis en Chile. *Revista Aqua* 91, 88-91.

Harrel I, Novotny A, Schiewe M, Hods H. 1976. Isolation and description of two vibrios pathogenic to pacific salmon in Puget Sound, Washington. *Fish Bull* 24, 447-449.

Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J, Williams S. 2000. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ed. Lippincott Williams E. Wilkins. Philadelphia. U.S.A.

Inglis V, Bromage N, Roberts R. 1993. Bacterial diseases of fish. First edition. Ed. John Wiley & Sons, New York. U.S.A

Jurado R. 1989. Concepto de Toxicidad Aguda, Crónica y Remota. Metodología de la Determinación de la DL₅₀. En Jurado R (ed). *Toxicología Veterinaria*. 2º edición. Salvat editores S.A. Pp 40-45.

Méndez R. 1998. La acuicultura en Chile, *Aquanoticias Internacional* 45, 12-21.

Michel C. 1980. A Standarized Model of Experimental Furunculosis in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Can J Fish Aqua Sci* 37, 746-750.

Organización Internacional de Epizootias (O.I.E.). 2003. Manual de Diagnóstico de Enfermedades de Animales Acuáticos. Paris. Francia.

Plumb J. 1999. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. First edition, Ed. Iowa Estate University. Iowa. U.S.A.

Ransom D, Lannan C, Rohovec J, Fryer J. 1984. Comparison of histopathology caused by *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* in three species of Pacific salmon. *J Fish Dis* 7, 107-115.

Revista Aqua. 2005. Estadísticas de Acuicultura y Pesca. 2004: Salmónidos ocupan segundo lugar en canasta exportadora. Año 17. N° 94 Pp 121-123.

Roberts R. 1981. Patología de los peces. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España.

Roberts R. 2001. Fish Pathology. Third edition . Ed. Baillière Tindall. Third edition, London. England.

Schäfer M, Alvarado V, Enríquez R, Monrás M. 1990. The Coho Salmon Sindrom (CSS): a new disease in Chilean salmon reared in sea water. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 10, 130.

Schiewe M, Trust T, Crosa J. 1981. *Vibrio ordalii* sp. nov.: a causative agent of Vibriosis in fish. *Curr Microbiol* 6, 343-348.

Trust TJ, Courtice ID, Khouri AG, Crosa JH, Schiewe MH. 1981. Serum resistance and hemagglutination ability of marine vibrios pathogenic for fish. *Infection and Immunity* 34, 702-707.

Wang X, Oon H, Ho G, Wong W, Lim T, Leung K. 1998. Internalization and cytotoxicity are important virulence mechanisms in vibrio-fish epithelial cell interactions. *Microbiology* 144, 2987-3002.

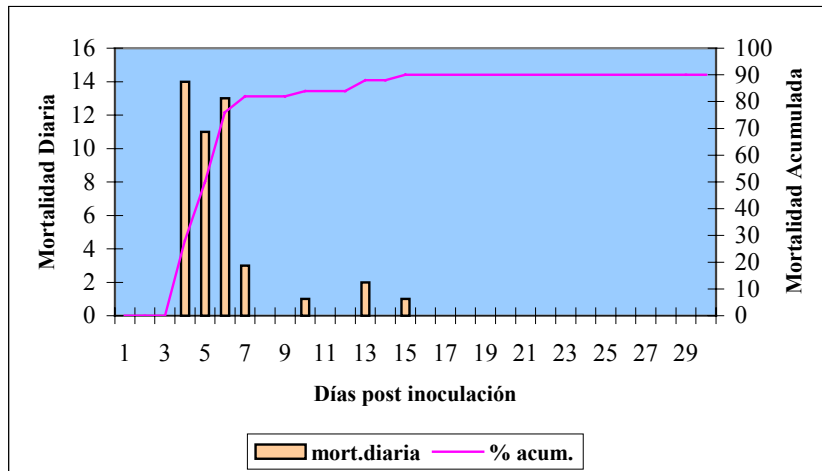
Wards BJ, Patel HH, Anderson CP, De Lisle GW. 1991. Characterisation by restriction endonuclease analysis and plasmid profiling of *Vibrio ordalii* strains from salmon (*Oncorhynchus tshawytscha* and *Oncorhynchus nerka*) with vibriosis in New Zealand. *New Zealand J Mar Freshwater Res* 25, 345-350.

8. ANEXOS

Anexo 1: Mortalidad diaria y acumulada en s. del Atlántico de 15-20 g post inoculación (p.i) I.P. con 10^7 ufc/pez de *V. ordalii* a una T° promedio de 14°C y 15‰ de salinidad.

Días p.i	mort.diaria	% mort.acum.	mort.acum
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	14	28	14
5	11	50	25
6	13	76	38
7	3	82	41
8	0	82	41
9	0	82	41
10	1	84	42
11	0	84	42
12	0	84	42
13	2	88	44
14	0	88	44
15	1	90	45
16	0	90	45
17	0	90	45
18	0	90	45
19	0	90	45
20	0	90	45
21	0	90	45
22	0	90	45
23	0	90	45
24	0	90	45
25	0	90	45
26	0	90	45
27	0	90	45
28	0	90	45
29	0	90	45
30	0	90	45

Anexo 2: Curva de mortalidad diaria y acumulada en s. del Atlántico de 15- 20 g (*S. salar*), post inoculación intraperitoneal con 10^7 ufc/pez de *V. ordalii* a una T° promedio de 14°C y 15‰ de salinidad.



Anexo 3: Mortalidad diaria y acumulada en s. del Atlántico de 15-20 g. (*S. salar*) post inoculación (p.i.) intraperitoneal con 10^6 ufc /pez de *V. ordalii* una T° promedio de 14°C y 15‰ de salinidad.

Días p.i	mort. diaria	% mort. acum.	mort. acum.
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	1	2	1
8	1	4	2
9	0	4	2
10	0	4	2
11	1	6	3
12	0	6	3
13	2	10	5
14	0	10	5
15	0	10	5
16	0	10	5
17	0	10	5
18	0	10	5
19	1	12	6
20	1	14	7
21	1	16	8
22	0	16	8
23	0	16	8
24	0	16	8
25	0	16	8
26	0	16	8
27	0	16	8
28	0	16	8
29	0	16	8
30	0	16	8

Anexo 4: Curva de mortalidad diaria y acumulada en salmón del Atlántico de 15- 20 g (*S. salar*) post inoculación intraperitoneal con 10^6 ufc/pez de *Vibrio ordalii* a una T° promedio de 14°C y 15 ‰ de salinidad.

