

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS VETERINARIAS



**“RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE  
BACTERIAS DEL GÉNERO *Vibrio* EN  
LANGOSTINO BLANCO (*Litopenaeus vannamei*)  
EN CENTROS DE CULTIVO DE LA REGIÓN  
TUMBES”**

Tesis para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

Armando Andrés Rosado Salazar

Director: Dr. Mg. MV. Hernán Málaga Cruz

**Lima, Perú**

**2018**

## *DEDICATORIA*

A mis padres, por todo el amor, los consejos y el apoyo incondicional que me brindan.

A mi hermana, por ser el ejemplo de profesionalismo a seguir.

A mi sobrina, por ser mi motivo de felicidad y todo el amor que me inspira.

A mi Mamá Leta, por el cariño, siempre apoyarme y animarme en lo profesional.

A mis abuelos Lucrecia, Clever y Hernán, por ser figuras de lucha y superación.

A mi familia, por ser todo para mí.

## *AGRADECIMIENTOS*

A mi director de tesis, Dr. Mg. MV. Hernán Málaga Cruz, por guiarme durante la realización del proyecto de Tesis, además del apoyo profesional y personal, y la profunda amistad y admiración hacia su persona.

A mi asesora de tesis, Mg. MVZ. Muriel Gómez-Sánchez Orezza, por permitirme realizar el proyecto por medio de SANIPES, por el apoyo para la realización de la tesis, y la amistad que nos une.

A mi coasesor de tesis, Dr. M.V. Luis Llanco Albornoz, por su orientación y asesoramiento integral, durante la conceptualización y realización del proyecto de Tesis, además de su gran amistad, apoyo y guía.

A la docente de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria de la Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Ricardo Palma, Mg. MVZ. Daphne León Córdova por las correcciones, orientaciones y toda la ayuda para la elaboración final del borrador de tesis.

A los docentes de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria de la Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Ricardo Palma, Mg. MV. Guillermo Leguía Puente, y MV. Franco Ceino Gordillo, por las orientaciones en torno al proyecto, para su optimización.

Al Organismo Nacional de Sanidad Pesquera – SANIPES, por permitirme llevar a cabo este proyecto a través de su entidad, así como otorgarme las facilidades para poder crecer profesionalmente y participar con ellos en eventos académicos.

A los Ingenieros Diego Alemán, responsable de la OD SANIPES - Tumbes y Luis Carrillo, Inspector de la OD Tumbes, así como a todos los trabajadores de la Oficina Desconcentrada de Tumbes, del Organismo Nacional de Sanidad Pesquera, por la gran ayuda durante el muestreo y mi estancia en la ciudad de Tumbes.

A las Sras. Mg. Blga. Krizia Pretell Monzón y Mg. Ing. Pesq. Katherine Saavedra Olivos, encargadas del Laboratorio de la OD – Tumbes del SANIPES, por su apoyo y orientación durante el muestreo y el primer análisis microbiológico del proyecto de Tesis.

Al DMV MSc. MVZ. Carlos Shiva Ramayoni, docente de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por permitirme realizar la microbiología en el Laboratorio de Inocuidad de Alimentos, que está a su cargo.

A mi cuñado, Blgo. Alexander Sánchez, por el apoyo personal y brindarme su amistad incondicional y cariño.

A mi compañera de Maestría, Rosa Fernández Fernández, por su apoyo durante la fase de laboratorio, además de la gran amistad.

A mis compañeros de Maestría; Andrea Vicente, Carmen Hurtado, Tania Rodríguez, Milene Villalobos, Carlos Távara y Fernando Mesías, y a mis compañeros de Pregrado; Javier Ortiz, André Sánchez, Manuel Acevedo, César Taipe, Carlo Guzmán y Giancarlo Vilcahuamán, por su magnífica amistad, orientación profesional y personal, y apoyo incondicional en cada etapa y momento.

A mi compañero de Maestría, Francisco Grande Ávalos, por el apoyo durante la toma de muestra.

## FUENTE DE FINANCIAMIENTO

Este proyecto fue financiado y llevado a cabo en conjunto con el Organismo Nacional de Sanidad Pesquera - SANIPES, comprendido en el Macro Proyecto: “Reforzamiento sanitario del sector langostinero, mediante la aplicación de programas sanitarios para el control de residuos de sustancias de acción farmacológica y contaminantes del medio natural en el desarrollo de la acuicultura”, mediante Convenio N° 325-INNOVATE PERU-PIAP-2015.

## RESUMEN

En la presente investigación, se identificó fenotípicamente la resistencia antimicrobiana hacia 5 antibióticos usados en acuicultura langostinera, por parte de especies del género *Vibrio*. El estudio fue del tipo transversal, descriptivo y observacional. Se colectaron 130 langostinos, procedentes de 17 centros de producción de la región Tumbes, identificándose 57 cepas mediante bioquímica presuntiva como *Vibrio* spp. Se realizaron dos pruebas bioquímicas para la diferenciación a nivel de especies: Fermentación de la Sacarosa y Halotolerancia, obteniéndose: 8 cepas de *Vibrio cholerae*, 3 cepas de *V. mimicus*, 11 cepas de *V. harveyi*, 8 cepas de *V. vulnificus*, 11 cepas de *V. parahaemolyticus* y 16 cepas de *V. alginolyticus*. En los antibiogramas realizados mediante la técnica placa-disco, Ampicilina fue el antibiótico que más resistencia presentaba (47%), seguido del Cloranfenicol (19%) y Tetraciclina (16%), mientras que Sulfametoxazol + Trimetoprim presentaba alta sensibilidad (95%) pero también resistencia (3%), además de Ciprofloxacino (93% de cepas sensibles) pero sin resistencia. Según el perfil de resistencia, Ampicilina fue el antibiótico que más monoresistencia presentó (16 cepas), y en cuanto a la resistencia múltiple, Ampicilina y Cloranfenicol presentaron 4 cepas con este perfil fenotípico. El estudio concluye que hay un bajo riesgo de desarrollo de resistencia antimicrobiana en la acuicultura langostinera, por parte de especies patógenas del género *Vibrio*, pero que debe de ser monitoreado epidemiológicamente, dado que se trata de antibióticos de amplio espectro.

Palabras clave: Langostino blanco, *Vibrio*, Tumbes, Resistencia Antimicrobiana

## ABSTRACT

In the present investigation, antimicrobial resistance was identified phenotypically to 5 antibiotics used in shrimp aquaculture, by species of the genus *Vibrio*. The study was of the transversal, descriptive and observational type. 130 white shrimps were collected from 17 production centers in the Tumbes region, identifying 57 strains by presumptive biochemistry such as *Vibrio* spp. Two biochemical tests were carried out for differentiation at the species level: Fermentation of Sucrose and Halotolerance, obtaining: 8 strains of *Vibrio cholerae*, 3 strains of *V. mimicus*, 11 strains of *V. harveyi*, 8 strains of *V. vulnificus*, 11 strains of *V. parahaemolyticus* and 16 strains of *V. alginolyticus*. In the antibiograms performed using the plate-disc technique, Ampicillin was the antibiotic with the highest resistance (47%), followed by Chloramphenicol (19%) and Tetracycline (16%), while Sulfamethoxazole + Trimethoprim showed high sensitivity (95%). but also resistance (3%), in addition to Ciprofloxacin (93% of sensitive strains) but without resistance. According to the resistance profile, Ampicillin was the antibiotic that showed more monoresistance (16 strains), and in terms of multiple resistance, Ampicillin and Chloramphenicol presented 4 strains with this phenotypic profile. The study concludes that there is a low risk of development of antimicrobial resistance in shrimp aquaculture by pathogenic species of the genus *Vibrio*, but that it should be monitored periodically, given that it is broad-spectrum antibiotics.

Key words: White shrimps, *Vibrio*, Tumbes, Antimicrobial Resistance



# ÍNDICE

FUENTE DE FINANCIAMIENTO .....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT .....	8
ÍNDICE .....	9
ÍNDICE DE CUADROS .....	12
ÍNDICE DE FIGURAS.....	13
ÍNDICE DE TABLAS .....	14
I. INTRODUCCIÓN .....	15
1.1 Planteamiento del Problema.....	16
1.1.1 Formulación del problema .....	17
1.2 Justificación de la Investigación .....	17
1.3 OBJETIVOS .....	17
1.3.1 Objetivo General .....	17
1.3.2 Objetivos Específicos.....	17
II. MARCO TEÓRICO.....	19
2.1 Biología del Langostino Blanco.....	19
2.2 Acuicultura Langostinera .....	20
2.2.1 Crianza Extensiva.....	21
2.2.2 Crianza Semi-intensiva .....	21
2.2.3 Crianza Intensiva.....	22
2.3 Especies del Género <i>Vibrio</i> .....	23
2.4 Vibriosis en Langostinos.....	24
2.4.1 Transmisión.....	25
2.4.2 Signos clínicos .....	26
2.4.3 Diagnóstico Diferencial .....	26
2.4.4 Importancia en Salud Pública.....	27
2.4.5 Medidas de Control .....	27
2.5 Métodos de Diagnóstico de Vibriosis .....	28
2.6 Uso de Antibióticos en Acuicultura Langostinera .....	29

2.6.1 Antibióticos permitidos en Acuicultura langostinera.....	30
2.6.1.1 Amoxicilina.....	30
2.6.1.2 Ciprofloxacino.....	30
2.6.1.3 Florfenicol.....	30
2.6.1.4 Oxitetraciclina.....	31
2.6.1.5 Sulfametoxazol / Trimetoprim.....	31
2.7 Sensibilidad vs Resistencia a Antibióticos en bacterias.....	32
2.8 Problemas Derivados de la Resistencia a Antibióticos y su riesgo en Salud Pública.....	32
2.8.1 Residuos de antibióticos en productos de Langostinos.....	32
2.8.2 Presencia de bacterias del género <i>Vibrio</i> en alimentos.....	32
III. ANTECEDENTES.....	33
IV. HIPÓTESIS.....	35
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
5.1 Lugar de Ejecución.....	36
5.2 Tipo y Diseño de Investigación.....	36
5.3 Variables.....	36
5.4 Operacionalización de las variables.....	37
5.4.1 Operacionalización de las variables.....	38
5.5 Muestreo.....	39
5.6 Procedimientos y Análisis de Datos.....	40
5.6.1 Procedimiento.....	40
5.6.1.1 Extracción y cultivo de Hepatopáncreas en agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) y resiembra en agar Tripticasa Soja (TSA).....	40
5.6.1.2 Reactivación de Aislados, Resiembra y Purificación.....	42
5.6.1.3 Pruebas bioquímicas convencionales e identificación fenotípica de <i>Vibrio</i> spp.....	43
5.6.1.4 Prueba de Antibiograma, mediante la Técnica de Kirby-Bauer, normalizado por Bernal y Guzmán (1984).....	46
5.6.1.4.1 Preparación del Inóculo en Solución Salina al 0,85%.....	46
5.6.1.4.2 Siembra de la Muestra y colocación de Discos de Antibióticos.....	47

5.6.1.4.3 Lectura e Interpretación del Antibiograma .....	48
5.6.2 Plan de análisis de datos.....	50
5.7 Aspectos Éticos .....	50
VII. DISCUSIÓN .....	59
VIII. CONCLUSIONES .....	63
IX. RECOMENDACIONES .....	66
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
XI. ANEXOS .....	75

# ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del Langostino Blanco (Feijoo, 2009). .....	20
Cuadro 2. Clasificación taxonómica del género <i>Vibrio</i> (Garrity <i>et al.</i> , 2005) Tomado de de Dulanto (2013) .....	23

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2. Pools de Hepatopáncreas homogenizados, listos para ser sembrados en agar TCBS.....	41
Figura 3. Colonias presuntivas de <i>Vibrio</i> , en agar TCBS .....	42
<b>Figura 5.</b> Pruebas de Oxidasa y Catalasa. Se observa reacción positiva en ambas, lo cual es indicativo de <i>Vibrio</i> spp.....	43
Figura 6a. Aislado de <i>Vibrio</i> sp. con fermentación de la Sacarosa (Sacarosa <sup>+</sup> ), compatible con las especies <i>V. cholerae</i> , <i>V. harveyi</i> y <i>V. alginolyticus</i> . .....	44
Figura 6b. Aislado de <i>Vibrio</i> sp. sin fermentación de la Sacarosa (Sacarosa <sup>-</sup> ), compatible con las especies <i>V. mimicus</i> , <i>V. vulnificus</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> . .....	45
Figura 7. Prueba de Halotolerancia, a salinidades 2%, 6%, 8% y 10%.....	46
Figura 8. Antibiogramas realizados en el presente estudio.....	48
Figura 10. División de la región Tumbes por unidades epidemiológicas según...	75
Figura 11. Espectrofotómetro usado en este estudio, a 622 nm, mostrando una Absorbancia de 0.094.....	78
Figura 12. Tubos de Ensayo con Solución Salina al 0,85% lo que permite el crecimiento de <i>Vibrio</i> sp en Agar Mueller Hinton sin adición de Cloruro de Sodio. ....	78

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuadro de Referencia para la evaluación de Antimicrobianos y sus Halos de Inhibición (medido en milímetros).....	49
Tabla 2. Resultados de la Fermentación de la Sacarosa de los 57 aislados determinados como <i>Vibrio</i> spp. ....	51
Tabla 3. Resultados de la Prueba de Halotolerancia. ....	51
Tabla 4. Especies patogénicas del género <i>Vibrio</i> , identificadas mediante bioquímica en este estudio. ....	52
Tabla 5. Resultados de los antibiogramas para <i>Vibrio</i> spp, de los 5 antibióticos (n=57). ....	53
Tabla 6. Resultados de antibiograma para las cepas aisladas de <i>Vibrio</i> spp (n=57) .....	57
Tabla 7. Patrones de resistencia antimicrobiana, según especies.....	58
Tabla 8. Aislados del género <i>Vibrio</i> , usados en el presente estudio. ....	76
Tabla 9. Resultados de Antibiograma, por especie, para <i>V. mimicus</i> .....	82
Tabla 10. Resultados de Antibiograma, por especie, para <i>V. cholerae</i> .....	83
Tabla 11. Resultados de Antibiograma, por especie, para <i>V. vulnificus</i> .....	84
Tabla 12. Resultados de Antibiograma, por especie, para <i>V. harveyi</i> .....	85
Tabla 13. Resultados de Antibiograma, por especie, para <i>V. parahaemolyticus</i> ..	87
Tabla 14. Resultados de Antibiograma, por especie, para <i>V. alginolyticus</i> .....	89

# I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de langostino blanco "*Litopenaeus vannamei*", es una de las principales actividades acuícolas. En el hemisferio occidental, esta actividad contribuye con el 20% del total mundial y los principales países productores son Ecuador, Brasil, Honduras y México (**Lightner 2011**). En el Perú, el cultivo de langostino blanco se realiza mayormente en el departamento de Tumbes, el cual ha adquirido notoriedad los últimos años, alcanzando una producción a gran escala (producción mayor de 50 toneladas al año), aunque en algunos casos se desarrolla un cultivo de menor escala (2 a 50 toneladas al año), obteniendo en promedio, en el año 2015, 18,001.540 toneladas (**PRODUCE 2016**).

Sin embargo, el impulso de esta actividad acuícola ha sufrido reverses debido a enfermedades infecciosas, de origen viral o bacteriano. Una de las principales enfermedades bacterianas que se puede presentar es la Vibriosis, causada por bacterias del género *Vibrio*, que pueden producir patologías, tanto en fase larvaria como en engorde.

Para evitar este grupo de infecciones bacterianas, se ha generalizado una de las malas praxis que más afectan a la acuicultura langostinera: el uso indiscriminado de antibióticos, lo cual conduce a una marcada resistencia por parte de patógenos oportunistas, frente a estos fármacos.

Este aumento de la resistencia por parte de bacterias, se traduce en la disminución de la eficiencia de los agentes antibacterianos. He aquí el hecho que se usan antibióticos de forma usual, pero sin prescripción por parte de un Médico Veterinario, y sin haber hechos estudios previos como un Antibiograma para saber que fármaco es el de mejor resultados al usarlo.

Otro gran problema que acarrea el uso excesivo de antibióticos en acuicultura langostinera, es que los residuos de estos fármacos, llegan a consumo humano directo, al igual que infecciones con bacterias patógenas, causando serios cuadros clínicos correspondientes a patologías gastrointestinales, produciendo un grave peligro en la salud pública.

## **1.1 Planteamiento del Problema**

En el Perú, se usan antibióticos, erróneamente como medida profiláctica, y de tratamiento, sin antes haber realizado un antibiograma, lo que conduce a una posterior disminución de la eficacia de estos fármacos, debido a la resistencia que desarrollan las bacterias. Además, no se han hechos estudios sobre la resistencia frente a antibióticos en la acuicultura langostinera, por lo que urge realizar una investigación, a fin de preservar la sanidad y producción langostinera, y cuidar la salud pública.



### **1.1.1 Formulación del problema**

¿A qué antibióticos presentarán resistencia, las especies bacterianas del género *Vibrio*, en la acuicultura langostinera de la región Tumbes?

## **1.2 Justificación de la Investigación**

Con la presente investigación, se busca identificar cuáles son los fármacos que están presentando disminución en su eficiencia, además de, reconocer las bacterias que están presentando esta resistencia, para así adoptar buenas medidas preventivas, mediante la concientización en las producciones langostineras, sobre el buen uso de fármacos antimicrobianos.

## **1.3 OBJETIVOS**

### **1.3.1 Objetivo General**

Identificar fenotípicamente el perfil de resistencia antimicrobiana por parte de especies patogénicas del género *Vibrio* en langostino blanco *Litopenaeus vannamei*, hacia los antibióticos de uso frecuente en centros de cultivo langostinero en la región Tumbes.

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

Aislar e identificar las especies patogénicas del género *Vibrio* en langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*) procedentes de la región Tumbes por métodos bioquímicos convencionales.

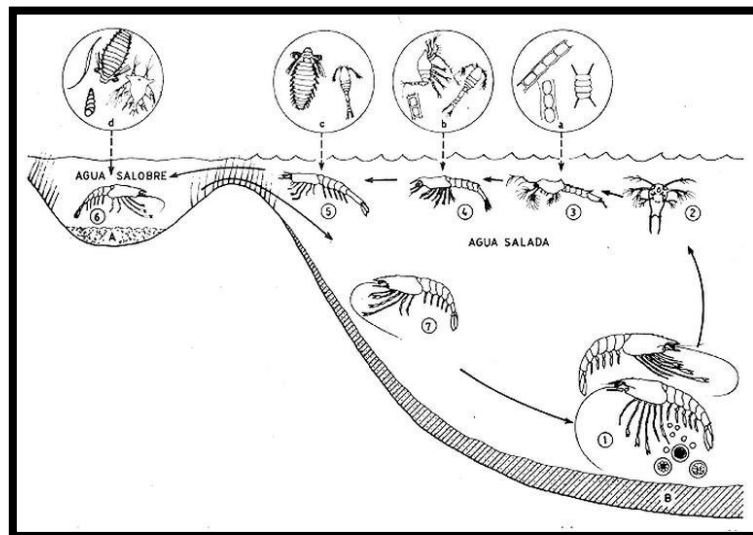
Determinar el perfil de resistencia hacia los siguientes antimicrobianos: Ampicilina, Tetraciclina, Cloranfenicol, Sulfametoazol-Trimetoprim y Ciprofloxacino de cepas de *Vibrio spp* procedentes de la crianza de Langostino blanco (*L. vannamei*), mediante la prueba de Antibiograma Placa – Disco.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Biología del Langostino Blanco

*Litopenaeus vannamei* (langostino blanco) es originario de la costa americana del Océano Pacífico distribuyéndose desde la provincia de Sonora (Norte de México) hasta el Departamento de Tumbes (Perú). Habita en aguas que mantienen un nivel de temperatura superior a los 20°C. Este recurso prefiere los hábitats de fondos fangosos y se puede encontrar hasta los 72 m de profundidad tanto en aguas marinas como en estuarios. En la primera etapa de su desarrollo, el langostino blanco habita en aguas oceánicas, pasando luego a aguas costeras y/o estuarios hasta la etapa de juveniles, retornando al mar para reproducirse (Feijoo 2009) como se detalla en la **imagen 1** ). La taxonomía del *Litopenaeus vannamei* se detalla en el **cuadro 1**.

Figura 1. Ciclo de Vida de *Litopenaeus vannamei* (FAO, 1974)



Cuadro 1. Clasificación taxonómica del Langostino Blanco (Feijoo, 2009).

Reino: **Animalia**

Filo: **Arthropoda**

Subfilo: **Crustacea** (Pennant, 1777)

Clase: **Malacostraca** (Latreille, 1806)

Subclase: **Eumalacostraca** (Grobber, 1892)

Superorden: **Eucarida** (Calman, 1904)

Orden: **Decapoda** (Latreille, 1803)

Suborden: **Dendrobranchiata** (Bate, 1888)

Superfamilia: **Penaeoidea** (Rafinesque, 1815)

Familia: **Penaeidae** (Rafinesque, 1815)

Subfamilia: **Penaeinae** (Dana, 1852)

Género: *Litopenaeus* (Pérez-Farfante & Kensley, 1997)

Especie: *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

## 2.2 Acuicultura Langostinera

FAO (2006), señaló que en el Perú, específicamente en Tumbes, se utiliza el sistema de cultivo semi-intensivo. El cultivo se inicia con postlarvas en estadíos PL 10 – 12. El tamaño comercial es de 18-23 cm, con un peso de 10-25 gramos. El recurso langostino es un producto de exportación a países como Estados Unidos, Japón y a Europa. En el año 2015, en el departamento de Piura, se obtuvo una producción total de 4,037.640 toneladas métricas, y en el departamento de Tumbes,

la producción del recurso langostino alcanzó 18,001.540 toneladas métricas **(PRODUCE 2015)**.

### **2.2.1 Crianza Extensiva**

Esta técnica es común en Latinoamérica. Los cultivos se desarrollan en las zonas intermareales, donde no hay bombeo de agua ni aireación. Los estanques suelen ser de forma irregular, con una superficie de entre 5 y 10 ha (o hasta 30 ha) y una profundidad de entre 0,7 y 1,2 m. Anteriormente, se empleaba semilla silvestre que entraba a los estanques con la marea alta, o se adquiría a los recolectores de semilla; a partir de 1980 se utiliza postlarva (PL) obtenida de las incubadoras, con una densidad de 4–10/m<sup>2</sup>. El langostino se alimenta a base de alimentos producidos naturalmente mediante fertilización, y se le administra, una vez al día, alimentos balanceados de bajas proteínas. A los 4 ó 5 meses se cosechan langostinos con un peso entre 11 y 12 g. El rendimiento en estos sistemas extensivos es de 150–500 kg/ha/cosecha, con una o dos cosechas anuales, cómo lo describió **Briggs (2009)**.

### **2.2.2 Crianza Semi-intensiva**

Los estanques de cultivo semi intensivo (1–5 ha) emplean semillas producidas en incubadoras, con densidades de siembra entre 10 y 30 postlarvas/m<sup>2</sup>. El agua se bombea para su recambio, los estanques tienen una profundidad de entre 1 y 1,2 m, empleando un mínimo de aireación artificial. El langostino se alimenta de productos naturales propiciando su producción mediante fertilización del estanque, complementado con alimentación 2 ó 3 veces al día. Los langostinos presentan características como buena tolerancia a los cambios ambientales y crecimiento

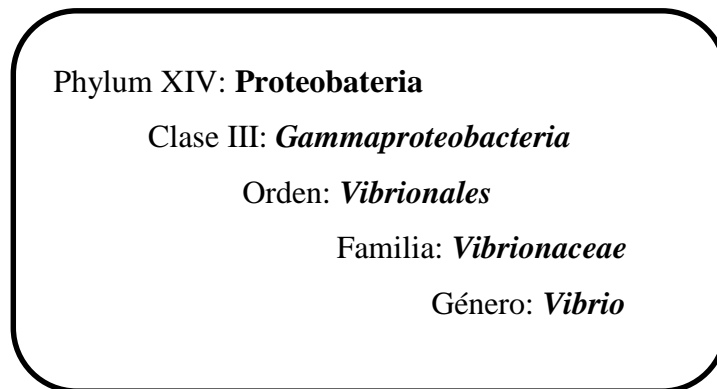
rápido. Los rendimientos de la producción en estanques semi intensivos varían entre 500 y 2 000 kg/ha/cosecha, con dos cosechas por año (**Briggs 2009**).

### **2.2.3 Crianza Intensiva**

Este tipo de crianza se realiza mayoritariamente en Asia y en altos centros de producción en Latinoamérica. Los centros de cultivo intensivos se ubican fuera de las áreas intermareales, donde los estanques puedan drenarse totalmente, secarse y prepararse antes de cada ciclo. Comúnmente los estanques son de tierra, pero también se utilizan membranas de recubrimiento para reducir la erosión y mejorar la calidad del agua. Los estanques son pequeños (0,1–1,0 ha), con una profundidad media de 1,5 m. La densidad de siembra va de 60 a 300 PL/m<sup>2</sup>. Se requiere una aireación continua de 1 HP/400–600 kg de langostino cosechado, para la oxigenación y circulación del agua. La alimentación se basa en dietas artificiales suministradas 4 a 5 veces diarias. Debido a la propagación de síndromes virales, se ha hecho común el uso de cepas domesticadas libres (SPF) o resistentes de patógenos específicos (SPR). Los rendimientos de la producción varían entre 7 y 20 000 kg/ha/cosecha, pudiéndose lograr de 2 a 3 cosechas por año, con un máximo de 30 a 35 000 kg/ha/cosecha. (**Briggs 2009**).

## 2.3 Especies del Género *Vibrio*

Thompson *et al.* (2004) describieron que las especies del Género *Vibrio* son bacterias Gram negativas, habitantes naturales de la microbiota marina y se encuentran con frecuencia en langostinos silvestres y de cultivo. Las especies que tienen potencial patógeno, y por lo tanto, causantes de Vibriosis, son las siguientes: *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. campbellii*, *V. fischeri*, *V. harveyi*, *V. orientalis*, *V. parahaemolyticus*, *V. pelagicus*, *V. penaeicida*, *V. splendidus* y *V. vulnificus* (Garrity *et al.* 2005). La clasificación taxonómica del género *Vibrio* se detalla en el cuadro 2.



Cuadro 2. Clasificación taxonómica del género *Vibrio* (Garrity *et al.*, 2005)

Tomado de de Dulanto (2013)

Se conoce que las especies del género *Vibrio* se encuentran con frecuencia en langostinos; pero, no siempre causan enfermedad, como lo demostraron **Rodríguez-Camacho *et al.* (2014)**, en un estudio realizado en México, donde encontraron, mediante PCR, la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en langostinos blancos, pero negativos a los trazadores de toxigenia, concluyendo que

los langostinos en el período y sitios muestreados, no representaron un riesgo para contraer enfermedades gastrointestinales zoonóticas relacionadas con esta bacteria.

Respecto a lo anterior, **Cuellar-Anjel (2013)**, además refiere que algunas cepas de especies de *Vibrio* son bioluminiscentes, característica que era frecuentemente asociada con patogenicidad; sin embargo, no todos los *Vibrios* luminiscentes son patógenos y tampoco todos los patógenos del langostino presentan luminiscencia.

## **2.4 Vibriosis en Langostinos**

La Vibriosis es una enfermedad bacteriana, causada por cepas patógenas extracelulares de varias especies pertenecientes al género *Vibrio*. La Vibriosis como patología de etiología bacteriana, ha sido la causa de mortalidades elevadas en cultivos de langostinos en países productores a escala global, y afecta tanto durante la larvicultura como en la fase de engorde. La etapa larvaria y postlarvaria son las fases más susceptibles a las infecciones por especies patógenas del género *Vibrio*. Las Vibriosis en langostinos pueden denominarse, según el área anatómica donde se presentan los signos clínicos, como Vibriosis Oral, Vibriosis Entérica, Vibriosis Cuticular y de los Apéndices, Vibriosis Localizadas en las Heridas, Enfermedad Roja, Necrosis Séptica del Hepatopáncreas, Necrosis de la Cola, Enfermedad del Intestino Blanco (WGD) y Vibriosis Sistémica (**Gomez-Gil et al. 1998**). El desarrollo de la patogenicidad del género *Vibrio* está influenciado por los cambios en la temperatura, salinidad y disponibilidad de nutrientes, estando el rango de temperatura para producir la enfermedad entre los 21-37°C (**Franco 2010**).



El ingreso de los Vibrios al organismo se puede dar por dos vías: una, cuando se supera la primera barrera de defensa que es el exoesqueleto, por acción de bacterias quitinolíticas, produciendo heridas. Otra vía de ingreso es el intestino medio, considerado como el de mayor ingreso, para patógenos presentes en el sedimento, agua y alimentos consumidos por los langostinos (**Cuéllar-Anjel 2013**).

Esta enfermedad durante la etapa larvaria tiene diferentes nominaciones, como son la Vibriosis (producida por cepas no luminiscentes) y la Vibriosis luminiscente. Se le suele denominar también la Enfermedad de las bolitas blancas, teniendo como lesión característica la descamación del epitelio hepato-intestinal, lo que puede ser de etiología bacteriana por *Vibrio* o de otra índole. En postlarvas, las especies de *Vibrio* ingresan vía oral, colonizando el intestino medio y el hepatopáncreas, causando septicemia y produciendo alta mortalidad en la población, documentado por **Lightner y Mcvey (1993)**.

#### **2.4.1 Transmisión**

**Cuéllar-Anjel (2013)** detalla que es posible la transmisión vertical en instalaciones de maduración y larvicultura, y horizontal, en pozas de engorde. Otra vía de infección puede ser por contaminación de los huevos y nauplios con heces de sus progenitores durante el desove y la eclosión.

### **2.4.2 Signos clínicos**

Vibriosis en larvicultura: se presenta colonización por *Vibrios* en la región oral y en los apéndices. Se observa coloración rojiza acompañada de cromatóforos expandidos, arrastre de muda (muda pegada), músculo abdominal opaco y melanización (**Hameed et al. 1996**). En algunos animales se puede observar bioluminiscencia debido a que están infectados por cepas luminiscentes como son *V. campbellii* y *V. harveyi* (**Baticados et al., 1990; Soto-Rodriguez et al. 2006**). Las larvas o postlarvas moribundas, suelen irse al fondo y se observa una “capa” luminiscente (**Lavilla-Pitogo et al. 1990**). Los brotes por cepas luminiscentes son más frecuentes durante las lluvias (**Sunaryanto y Mariam 1986**), y en presencia de bajas salinidades (**Prayitno y Latchford 1995**).

Vibriosis en estanques de cultivo (engorde): se observan diferentes signos clínicos según el grado de severidad de la infección; éstos pueden incluir letargia, anorexia, nado errático, pérdida del reflejo de huida, coloración rojiza, nado hacia las orillas del estanque, intestino vacío, urópodos rojos, edema en los urópodos, opacidad del músculo intestinal, perforaciones del exoesqueleto, melanización de la cutícula o apéndices rojos, como lo detallaron **Lightner y Mcvey (1993)**.

### **2.4.3 Diagnóstico Diferencial**

En el diagnóstico diferencial de Vibriosis se tiene al Síndrome de Taura y Síndrome de la Mancha Blanca, enfermedades con las que tiene similitud en los signos clínicos (**Cuellar-Anjel 2013**). El Síndrome de Taura es causado por un virus RNA, teniendo mortalidades acumulativas del 40 al 90 % en todos los estadios de *L.*

*vannamei*. El agente etiológico del virus de la Mancha Blanca es un virus dsDNA, produciéndose la enfermedad en épocas frías donde, generalmente, el virus no puede desenvolverse a temperaturas menores a 25° (**Lightner, 2011**).

#### **2.4.4 Importancia en Salud Pública**

Los humanos son propensos a padecer trastornos gastrointestinales y septicemias, a causa de especies de vibrios potencialmente patógenos como el *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, y *V. mimicus* (**Cuéllar-Anjel 2013**). Se ha determinado recientemente, que la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas, causado por las Toxinas A y B del *Vibrio parahaemolyticus*, debe ser notificada ante la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), por lo que el SANIPES lo incluye en el Plan de Vigilancia Sanitaria de los Recursos Hidrobiológicos – Capítulo Crustáceos. (**SANIPES 2018**).

#### **2.4.5 Medidas de Control**

La principal medida de control es la bioseguridad, aplicándose en las pozas, donde, luego de la saca de animales y excreción del agua, se debe proceder al rastrillado, eliminación de sedimentos del fondo, encalado abundante y secado al sol por varias semanas. Otra medida a tomar es la desinfección de los elementos de cosecha y otros equipos utilizados durante el ciclo de producción (**Cuéllar-Anjel 2013**).

Se pueden disminuir las pérdidas mediante el uso de reproductores libres de patógenos específicos (SPF), de yodo (u otros desinfectantes probados) en el agua de lavado de huevos y nauplios, lo cual ayuda a atenuar y destruir los vibrios

evitando la siembra de postlarvas infectadas, según lo documentado por **Cuellar-Anjel (2013)**.

Se deben minimizar las causas de estrés, mediante el mantenimiento estable de los parámetros fisicoquímicos y biológicos del agua de cultivo, así como el mantenimiento óptimo de la calidad del agua y la salud de los langostinos, sean posiblemente las medidas más eficientes de control. Está siendo cada vez más común, el uso de probióticos cuya efectividad haya sido comprobada contra Vibriosis. (ej. a base de *Lactobacillus* spp.) (**Cuellar-Anjel 2013**).

## **2.5 Métodos de Diagnóstico de Vibriosis**

Para el diagnóstico de Vibriosis, se tienen varias pruebas, tales como: Histopatológicas, bacteriológicas y moleculares, siendo estas dos últimas, las que tienen mayor fidelidad.

La técnica bacteriológica se basa en referenciar los valores de conteo diario de unidades formadoras de colonias (UFC), utilizando el agar TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa), el cuál es el medio ideal para cultivo de Vibrios. En larvas sanas, menos del 10% de bacterias totales son Vibrios. En las larvas enfermas, la proporción de vibrios puede subir a más del 50%, presentando similares conteos de bacterias totales: encontrándose hasta  $10^5$  UFC/g. En el caso de juveniles, preadultos o adultos, se consideran niveles de seguridad los conteos de colonias de  $10^4$  UFC/g de bacterias luminiscentes en Hepatopáncreas, mientras que los

individuos enfermos muestran conteos de  $10^3$  UFC/mL en hemolinfa y  $10^5$  UFC/g en hepatopáncreas, utilizando el mismo agar (**Gomez-Gil et al. 1998**).

Para el diagnóstico microbiológico de Vibriosis se tiene los siguientes parámetros: si hay crecimiento en agar TCBS, se debe anotar fermentación de la sacarosa:

- Colonias amarillas = sacarosa positiva
- Colonias verdes = sacarosa negativa

La presencia de sacarosa en el agar TCBS, ayuda a diferenciar bioquímicamente las especies de *Vibrio*, ya que colonias amarillas denotan fermentación de esta, reacción de las especies *Vibrio cholerae*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*, mientras que *V. mimicus*, la mayoría de *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*, presentan colonias verdes indicando que no la han fermentado (**Silva et al. 2008**).

## **2.6 Uso de Antibióticos en Acuicultura Langostinera**

Usualmente, los antibióticos se usan en producción del recurso langostino, tanto en fase larvaria como en engorde. El empleo de antibióticos en la acuicultura se ha asociado con problemas ambientales y de salud humana, entre los cuales, se presentan: resistencia bacteriana, persistencia en el ambiente acuático, además de acumulación de residuos de antibióticos en los tejidos de langostinos que pueden alterar la microbiota intestinal y causar problemas de intoxicación o alergias en el consumidor (**Santiago et al. 2009**).

## **2.6.1 Antibióticos permitidos en Acuicultura langostinera**

El **Organismo Nacional de Sanidad Pesquera – SANIPES (2016)** determinó que fármacos de actividad antibiótica son permitidos y suministrados, en recursos acuícolas destinados a consumo humano, siendo estos:

### **2.6.1.1 Amoxicilina**

Aminopenicilina bactericida, actúa inhibiendo la síntesis de mucopéptidos en la pared celular. Tiene mayor actividad contra muchas cepas de bacterias aeróbicas Gram negativas, además de actividad contra muchas bacterias anaeróbicas. Después de la administración oral, el 74-92% es absorbido. La resistencia se da por medio de betalactamasas, destruyendo el anillo  $\beta$ -lactámico (**Plumb 2010**).

### **2.6.1.2 Ciprofloxacino**

Antibiótico del tipo Fluoroquinolona. Bactericida, con efecto post-administración importante, tanto para bacterias Gram negativas como Gram positivas, y es activa tanto en fase estacionaria como de desarrollo de la replicación bacteriana, impidiendo el enrollamiento y la síntesis del ADN. Tiene buena actividad contra muchos bacilos y cocos Gram negativos. La resistencia se da por mutación en plásmidos y genes que codifican la DNA girasa (**Plumb 2010**).

### **2.6.1.3 Florfenicol**

Antibiótico de amplio espectro, sintetizado a partir del tianfenicol, sustituyéndose el radical hidroxilo por el fluor, buscando disminuir la resistencia hacia los

antibióticos del grupo de los Fenoles. Inhibe la síntesis proteica bacteriana. La resistencia a este antibiótico se da por metilación ribosómica del RNA (**Plumb 2010**).

#### **2.6.1.4 Oxitetraciclina**

Antibiótico de la clase de las Tetraciclinas. Bacteriostático, inhibe la síntesis proteica por fijación reversible, además, alteran la permeabilidad de la membrana citoplasmática en los microorganismos susceptibles. Tienen una amplia distribución en el cuerpo. La resistencia a las tetraciclinas se da por sistema de eflujo y protección ribosómica (**Plumb 2010**).

#### **2.6.1.5 Sulfametoxazol / Trimetoprim**

Antimicrobiano Sulfonamida potenciado. Las sulfas son bacteriostáticas y la trimetoprima es bactericida, pero cuando se usan en combinación, las sulfas potenciadas son bactericidas. Inhiben secuencialmente las enzimas en la vía del ácido fólico, impidiendo la síntesis de timidina de las bacterias. La relación óptima in vitro para las bacterias más susceptibles es, aproximadamente, 1:20 (trimetoprima:sulfa), pero la actividad sinérgica puede ocurrir con relaciones desde 1:1 hasta 1:40. Las sulfas potenciadas tienen un espectro de actividad bastante amplio, pero tienen poca actividad contra la mayoría de los anaerobios. En los microorganismos gramnegativos, la resistencia suele ser mediada por plásmidos. Se distribuye bien en el cuerpo. La resistencia está mediada por plásmidos, además de hiperproducción de PABA (Ácido Paraaminobenzoico), el cual tiene un gran antagonismo con las Sulfas (**Plumb 2010**).

## **2.7 Sensibilidad vs Resistencia a Antibióticos en bacterias**

**Mota (1996)** definió la resistencia bacteriana como la capacidad natural o adquirida de una bacteria, para permanecer insensible a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un fármaco antibiótico. Para evaluar la sensibilidad de una bacteria, frente a un antibiótico, se inocula una bacteria en un medio de cultivo que contenga uno o más antibióticos, determinando la sensibilidad como la inhibición de su crecimiento. Se usan placas de fármacos para la evaluación de la sensibilidad (**Greca 2003**).

## **2.8 Problemas Derivados de la Resistencia a Antibióticos y su riesgo en Salud Pública**

### **2.8.1 Residuos de antibióticos en productos de Langostinos**

La presencia de residuos de antibióticos, en derivados del recurso Langostino, puede afectar la microbiota intestinal del consumidor final. Esto se da mediante: el desarrollo de resistencia, alteración de la actividad metabólica enzimática, problemas de alergias e intoxicaciones (**Santiago et al. 2009**).

### **2.8.2 Presencia de bacterias del género *Vibrio* en alimentos**

El género *Vibrio* incluye más de 30 especies, de las cuales 12 son patógenas para el ser humano. Las especies que más se identifican con el consumo de alimento y el agente etiológico son: *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. fluviales* y *V. mimicus*. Las bacterias del género *Vibrio* pueden encontrarse más frecuentemente en épocas de verano (**Santiago et al. 2009**).



### III. ANTECEDENTES

Las bacterias del género *Vibrio* se consideran reservorios y vehículos de la resistencia a antibióticos, debido a su presencia abundante en aguas costeras y a su habilidad para desarrollarse rápidamente, como lo definieron **Santiago et al. (2009)**.

**Álvarez et al. (2001)**, determinaron la resistencia a 12 antibióticos en langostinos blancos (*Litopenaeus vannamei*), procedentes de sistemas de cultivos y silvestres, así como del recurso *Mugil curema* “Lisa criolla”. En el estudio realizado, se aislaron 629 cepas del género *Vibrio*, teniendo como grupo más numeroso, bacterias de la especie *Vibrio harveyi*. Los resultados demostraron que más del 93% de bacterias del género *Vibrio* presentaron resistencia múltiple ( $R \geq 50\%$ ) en un primer grupo, mientras que en un segundo grupo, la resistencia fue total: 100% en un rango comprendido entre 7 a 10 antimicrobianos probados. Por lo tanto, se concluye que el uso amplio de antimicrobianos, puede causar estragos en la producción, como en las especies silvestres, mediante el paso de plásmidos al medio ambiente acuático.

En acuicultura, la resistencia que se presenta, y que más reportes ha tenido, ha sido hacia los antibióticos bacteriostáticos, aquellos que afectan la síntesis de proteína en la bacteria, como lo son: tetraciclina, cloranfenicol, sulfonamidas y quinolonas, como lo describió **Dixon (2000)**.

En México, **Roque et al. (2001)**, estudiaron la sensibilidad de 144 cepas bacterianas del género *Vibrio*, aisladas de un sistema de cultivo de camarones peneidos en el

Pacífico Mexicano, frente a 15 antibióticos. El estudio arrojó, como resultado, que la Oxitetraciclina fue el antibiótico frente al cual se obtuvo el mayor número de cepas de *Vibrio* resistentes, mientras que el Florfenicol y la Enrofloxacin, presentaron el mayor número de cepas sensibles.

**Mendoza et al. (2016)** realizaron un estudio en Ecuador, encontrando que ciertas bacterias del género *Vibrio* mostraron resistencia ante ciertos antibióticos, siendo alarmante, ya que éstos eran de amplio espectro. En base a los resultados que obtuvieron: 64% de cepas bacterianas eran susceptibles, 13% presentaron sensibilidad intermedia, y 23% de las cepas fueron resistentes. De esto últimas, los mayores porcentajes de resistencia se presentaron frente a: Amoxicilina: 65% y Oxitetraciclina, con un 20%.

## IV. HIPÓTESIS

¿Existirá algún grado de resistencia a antibióticos, por parte de bacterias del género *Vibrio*, presentes en la acuicultura langostinera?

$H_0$  : No existe resistencia a antibióticos, por parte de *Vibrio spp* presentes en la acuicultura langostinera

$H_i$  : Existe resistencia a antibióticos, por parte de *Vibrio spp* presentes en la acuicultura langostinera

# V. MATERIALES Y MÉTODOS

## **5.1 Lugar de Ejecución**

La toma de muestra se realizó en los Centros de crianza semi-intensiva e intensiva ubicados en la región Tumbes. Los individuos colectados fueron llevados al Laboratorio de Microbiología y Análisis del Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES) - Tumbes, dónde se procedió a realizar la extracción del Hepatopáncreas y siembra de aislados para, después, llevar los aislados al Laboratorio de Inocuidad Alimentaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, donde se realizó la prueba de Antibiograma.

## **5.2 Tipo y Diseño de Investigación**

El estudio fue del tipo transversal, descriptivo y observacional.

## **5.3 Variables**

Tipo de Crianza

Uso variado de Antibióticos

Presencia de Vibrio

Resistencia antimicrobiana

## **5.4 Operacionalización de las variables**

Tipo de Crianza: Se determinó de cada sistema productivo: semi intensivo e intensivo. Se evaluó al momento de la toma de muestra.

Uso variado de antibióticos: se dispuso de la lista de fármacos permitidos por SANIPES. Se evaluó según lo comunicado por el productor langostinero al momento de la toma de muestra, y según lo determinado por la Autoridad Competente en la etapa de procedimiento en laboratorio.

*Vibrio* spp.: Se determinó la presencia de las especies del género bacteriano *Vibrio*, ya que es la de mayor presencia en la acuicultura langostinera. Se evaluó en la etapa de procedimiento de laboratorio.

Resistencia a antibióticos: se determinó el grado de resistencia a un antibiótico, mediante la metodología internacional Placa - Disco. Se evaluó al final de la etapa de laboratorio, corroborando los datos con los de la Tabla 1.

### 5.4.1 Operacionalización de las variables

Variable	Tipo de Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensiones	Indicadores
Tipo de Crianza	Variable cualitativa nominal Independiente	Cantidad y forma de crianza de Langostinos criados	Sistema	Semi-intensivo  Intensivo	Densidad poblacional media  Densidad Poblacional alta
Uso Variado de Antibióticos	Variable cualitativa nominal Dependiente	Antibióticos presentes en la crianza de langostinos	Uso de antimicrobianos	Amoxicilina Florfenicol Ciprofloxacino Oxitetraciclina Trimetropim- Sulfametoxazol	Se usan antibióticos  No hay uso de antibióticos
Cultivo de <i>Vibrio</i> spp.	Variable cualitativa nominal Dependiente	Indicadores de animales enfermos  Observación de signos clínicos	Presencia	Especies del género <i>Vibrio</i>	Presencia de <i>Vibrio</i>  Sin presencia de <i>Vibrio</i>
Resistencia al Antibiótico	Variable cualitativa ordinal Dependiente	Exposición al antibiograma	Inhibición de Crecimiento	Resistente  Intermedio  Sensible	Con Resistencia  Resistencia media  Sin Resistencia

## 5.5 Muestreo

La especie seleccionada fue *Litopenaeus vannamei* “Langostino blanco”. Se colectaron un total de 130 langostinos de 17 centros de producción de la Región Tumbes. Estos centros de producción son, en su mayoría, Acuiculturas de Mediana y Gran Empresa (AMYGE), siendo pocas Acuiculturas de Micro y Pequeña Empresa (AMYPE). En total, se muestrearon 26 pozas de producción.

Las muestras se recolectaron de pozas de producción de los sistemas productivos, tanto intensivos como semi-intensivos, de la etapa productiva de engorde, teniendo 3 meses de edad y 10 gramos de peso mínimos. La colección fue mediante pesca directa, usando una atarraya, de las pozas de producción.

El muestreo se hizo por conveniencia tomando 5 individuos de cada poza, este número de tamaño de muestra es determinado por la teoría estadística Detección de enfermedad, donde se determina un tamaño muestral, mínimo de 5 individuos y máximo de 10, para representar conglomerados, como lo detalla **Málaga (2010)**.

El muestreo se llevó a cabo junto con la toma de muestra mensual llevada a cabo por SANIPES, referente al Plan Nacional de Vigilancia Sanitaria de Recursos Hidrobiológicos – Componente Crustáceos, en el mes de abril del 2018.

Para su conservación, las muestras recolectadas fueron transportadas en hielo, contenido en un cooler, para su posterior análisis, no mayor a 6 horas.

Las muestras fueron colocadas dentro de una bolsa rotulada. Al llegar al laboratorio, se retiraron de la bolsa, para la extracción del Hepatopáncreas, el cuál fue realizado según el protocolo realizado por **Gómez-Gil *et al.* (2018)**.

## **5.6 Procedimientos y Análisis de Datos**

### **5.6.1 Procedimiento**

#### **5.6.1.1 Extracción y cultivo de Hepatopáncreas en agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) y resiembra en agar Tripticasa Soja (TSA)**

En el Laboratorio de la OD – Tumbes del SANIPES se realizó el primer análisis microbiológico. Después de extraer la cutícula del exoesqueleto, bajo condiciones de esterilidad, se realizó un corte en dirección latero-ventral, entre el cefalotórax y la base de los pereiópodos, en seguida, se expuso el hepatopáncreas y se diseccionó del intestino, del resto de órganos y tejidos del cefalotórax. Posteriormente, el hepatopáncreas se colocó en una placa Petri estéril.

En tubos de 15 mL, se agregaron 10 mL de Suero Fisiológico estéril al 2%, en los que se prepararon un pool con los 5 hepatopáncreas extraídos de los individuos de cada grupo de muestra. Posteriormente, se agitaron los tubos para homogenizar el contenido y fueron llevados a un Vortex para lograr la homogenización completa.



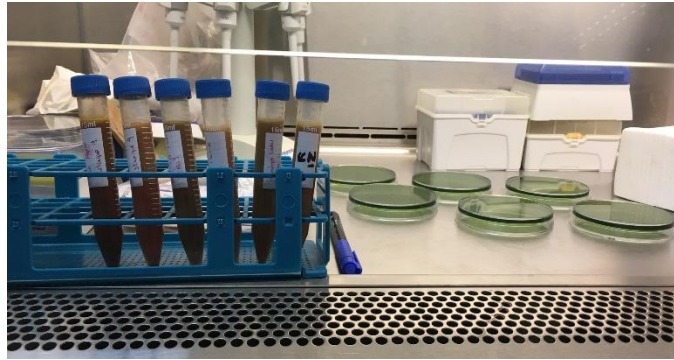


Figura 2. Pools de Hepatopáncreas homogenizados, listos para ser sembrados en agar TCBS

La siembra se realizó con un hisopo estéril, sumergiéndolo en cada tubo y agitándolo suavemente, para después, extenderlo en forma de estría, por toda la superficie del agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS), enriquecido al 2% de Cloruro de Sodio (NaCl).

Una vez completada la siembra de los túbulos de cada grupo muestral, se procedió a colocarlos en la incubadora, a razón de una temperatura de  $37^{\circ} \pm 0.9$ , durante 18 a 24 horas. Luego del tiempo determinado, se observaron las colonias que habían crecido, seleccionándose las representativas de cada forma de aislado (forma, color, tamaño), obteniéndose 170 aislados.

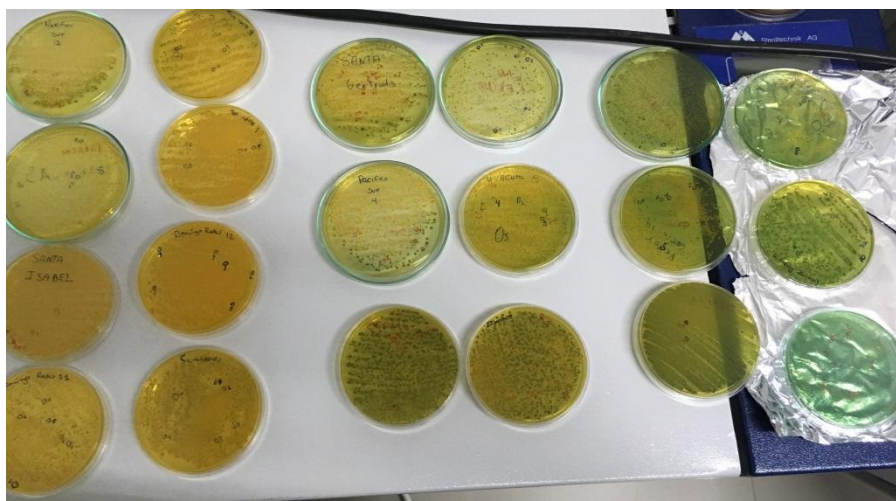


Figura 3. Colonias presuntivas de *Vibrio*, en agar TCBS

Los aislados seleccionados fueron resembrados en agar Tripticasa Soja (TSA), enriquecido al 2% de NaCl. Luego de la resiembra, se procedió a colocarlos en la incubadora, a  $37^{\circ} \pm 0.9$ , durante 12 a 18 horas.

Los aislados puros fueron colocados en tubos eppendorf conteniendo 850  $\mu\text{L}$  de caldo Tripticasa Soja (TSB), enriquecido al 2% de NaCl, incubándolos a  $37^{\circ} \pm 0.9$ , durante 18 horas. Luego, se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de glicerol para su congelamiento y posterior traslado al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

#### **5.6.1.2 Reactivación de Aislados, Resiembra y Purificación**

Una vez transportados a Lima, los aislados fueron reactivados mediante alícuota en Agua Peptonada Alcalina al 1% de NaCl, con una escala de pH 8.6, poniéndose a incubar durante 24 horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . Una vez cumplido el tiempo establecido, los aislados fueron resembrados en agar TCBS, al 2% de NaCl, durante 18 horas, a

35°C. Luego, fueron resembrados en agar no selectivo TSA enriquecido al 2% de NaCl, durante 16 horas, para poder realizar la tinción Gram, así como las pruebas bioquímicas, a fin de reconocer fenotípicamente las especies del género *Vibrio*. Por este medio, se lograron reactivar 67 aislados presuntivos.



**Figura 4. Reactivación de aislados, resiembra en agar TCBS y posterior purificación en agar Tripticasa Soja**

### **5.6.1.3 Pruebas bioquímicas convencionales e identificación fenotípica de *Vibrio* spp**

Se realizaron las tinciones Gram para determinar el género *Vibrio*, el cuál es Gram<sup>-</sup>



**Figura 5. Pruebas de Oxidasa y Catalasa. Se observa reacción positiva en ambas, lo cual es indicativo de *Vibrio* spp**

Las pruebas bioquímicas que se realizaron fueron las de Oxidasa y Catalasa. Una vez determinados los aislados Gram<sup>-</sup>, Oxidasa<sup>+</sup> y Catalasa<sup>+</sup>, se procedió a evaluar las pruebas bioquímicas específicas para especies del género bacteriano *Vibrio*:

- Fermentación de la Sacarosa, la cual se observaba y anotaba previamente en el crecimiento en agar TCBS, como se observa en las figuras 6a y 6b:
  - Sacarosa<sup>+</sup> (Colonias amarillas): *Vibrio cholerae*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*.
  - Sacarosa<sup>-</sup> (Colonias verdes): *Vibrio mimicus*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*.
  -

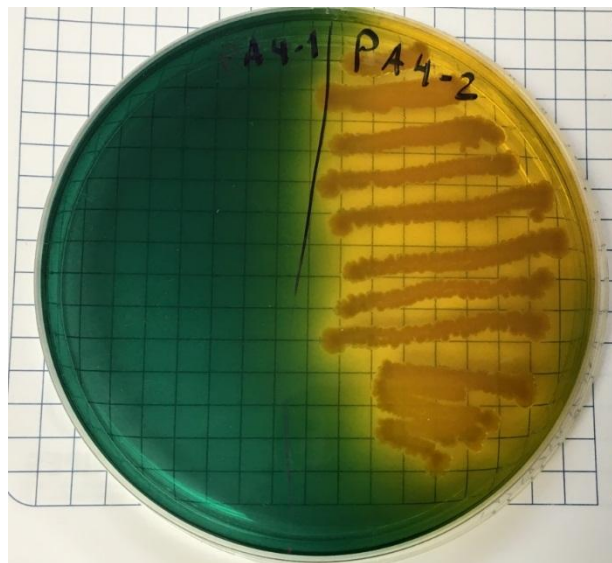


Figura 6a. Aislado de *Vibrio* sp. con fermentación de la Sacarosa (Sacarosa<sup>+</sup>), compatible con las especies *V. cholerae*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*.

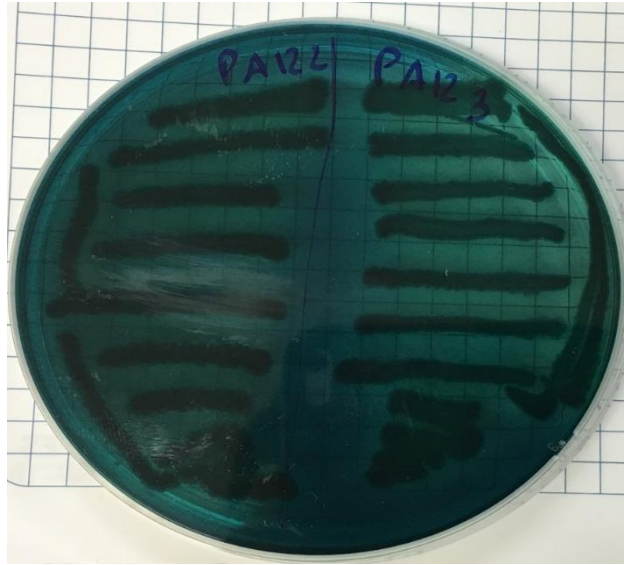


Figura 6b. Aislado de *Vibrio* sp. sin fermentación de la Sacarosa (Sacarosa<sup>-</sup>), compatible con las especies *V. mimicus*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*.

- Halotolerancia, crecimiento en Caldo de Peptona a diferentes salinidades. Se prepararon 800  $\mu$ L del caldo en crioviales, ajustando el pH a  $8.6 \pm 0.1$  y llevando al autoclave. Luego se sembró una colonia en agua peptonada, sin agregación de NaCl, para después alicuotar 200  $\mu$ L en cada uno de los crioviales con diferentes salinidades, finalmente incubándolo por 48 horas a 35°C, realizándose la lectura confirmatorio por desarrollo de turbidez:
  - NaCl 2%: para *Vibrio cholerae* y *V. mimicus*.
  - NaCl 6%: para *Vibrio harveyi* y *V. vulnificus*
  - NaCl 8%: para *Vibrio parahaemolyticus*
  - NaCl 10%: para *Vibrio alginolyticus*

La prueba de Halotolerancia se realizó según el protocolo descrito por **Kaysner y DePaola (2004)** y realizado por **Silva et al (2008)**.

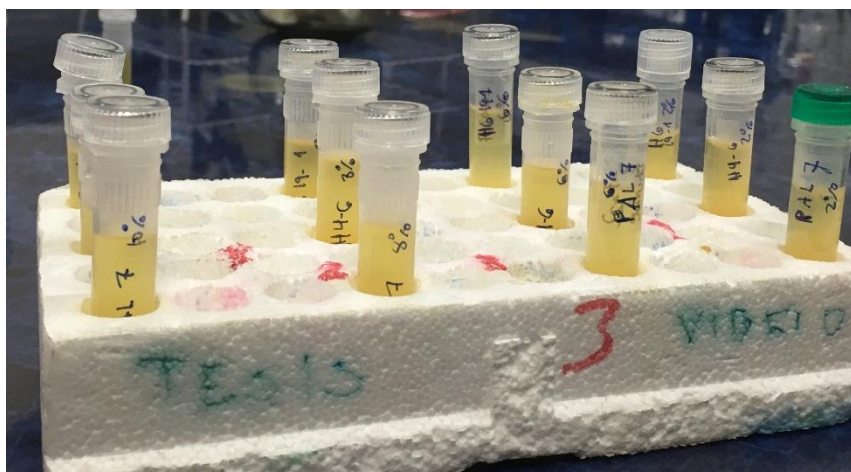


Figura 7. Prueba de Halotolerancia, a salinidades 2%, 6%, 8% y 10%.

Luego de las pruebas bioquímicas, se obtuvieron un total de 57 cepas (n=57), positivas al género *Vibrio*, con las cuáles se realizaron los antibiogramas.

#### **5.6.1.4 Prueba de Antibiograma, mediante la Técnica de Kirby-Bauer, normalizado por Bernal y Guzmán (1984).**

##### 5.6.1.4.1 Preparación del Inóculo en Solución Salina al 0,85%

Se seleccionaron 5 colonias de cada uno de los aislados, los cuales fueron transferidos a tubos de ensayo que contenían 3 mL de la solución Salina estéril al 0,85%, luego, a temperatura ambiente, se colocaron los tubos en el espectrofotómetro, hasta obtener una longitud de onda en la absorbancia a 622 nm, de un rango entre 0,08 y 0,12 de turbidez, equivalente a la escala 0.5 de McFarland. La preparación del inóculo en la Solución Salina al 0,85%, permitió a las especies del género *Vibrio* crecer en el agar Mueller Hinton, sin necesidad de agregar NaCl en la preparación del medio (INEI-ANLIS, 2010).

#### 5.6.1.4.2 Siembre de la Muestra y colocación de Discos de Antibióticos

1. Se sumergió un hisopo estéril dentro de la Solución Salina al 0,85%, conteniendo la bacteria.
2. Seguidamente, se sembró el inóculo uniformemente sobre la superficie del medio con el hisopo, haciéndolo en tres direcciones.
3. Se dejó secar, a temperatura ambiente, la superficie del medio, con la tapa cerrada, durante 3 a 5 minutos.
4. Los discos de antibióticos, previamente retirados de su conservación, se colocaron en la superficie del agar con una pinza estéril. Se presionaron ligeramente para asegurar un contacto uniforme.

Se utilizaron los siguientes discos:

- a. Disco de Ampicilina, representativo de las Aminopenicilinas, por lo tanto de Amoxicilina.
  - b. Disco de Tetraciclina, representante de las Tetraciclinas, y por lo tanto de la Oxitetraciclina.
  - c. El disco de Cloranfenicol, que es representante de los Fenoles, y por lo tanto del Florfenicol.
  - d. Discos de Ciprofloxacino, representante de las Quinolonas.
  - e. Disco de Trimetoprim – Sulfametoxazol, representante de los Inhibidores de la ruta del Folato.
5. Se colocaron los discos, a cierta distancia, para evitar que se sobrepongan los halos de inhibición.
  6. Se incubaron los medios de cultivo, después de agregar los discos, a 35°C.

7. La lectura del Antibiograma se hizo en tres tiempos, después de 16 horas a partir del momento de la incubación, luego a las 18 horas, y una última lectura a las 24 horas.

#### 5.6.1.4.3 Lectura e Interpretación del Antibiograma

Las zonas de inhibición fueron medidas con Vernier calibrado contra una superficie oscura bajo luz reflejada, sin remover la tapa de la placa petri. Los resultados de las tomas de medidas fueron constatados con los datos de la Tabla 1.

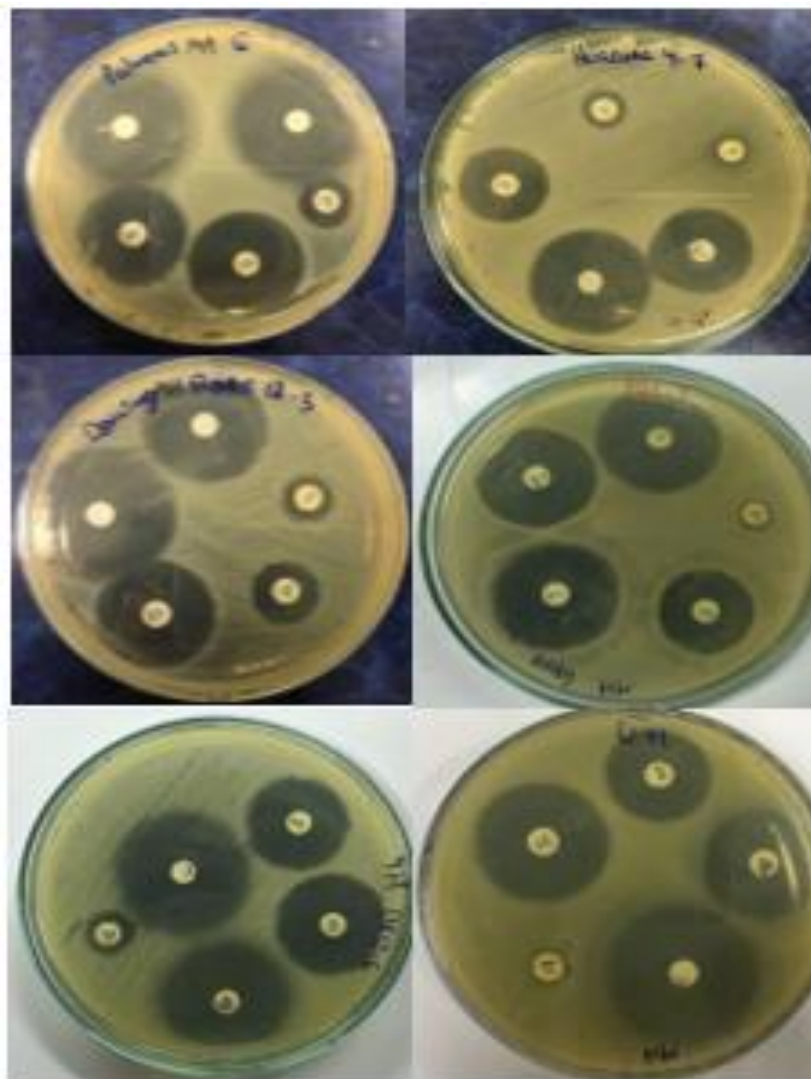


Figura 8. Antibiogramas realizados en el presente estudio



Tabla 1. Cuadro de Referencia para la evaluación de Antimicrobianos y sus Halos de Inhibición (medido en milímetros)

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIÁMETRO EN mm		
		R*	I**	S***
PENICILINAS				
Ampicilina	10 µg	13	14-16	17
TETRACICLINAS				
Tetraciclina	30 µg	11	12-14	15
QUINOLONAS				
Ciprofloxacino	5 µg	15	16-20	21
FENOLES				
Cloranfenicol	30 µg	12	13-17	18
INHIBIDORES DE LA RUTA DEL FOLATO				
Clotrimoxazol (Trimetoprim/Sulfametoxazol)	1.25/23.75 µg	10	11-15	16

**Fuente: CLSI (2010). Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline, 3rd Edn. Austin, Texas.**

**\*Resistente**

**\*\*Intermedio**

**\*\*\*Sensible**

Los resultados fueron evaluados de la siguiente manera:

- Sensible (S)
- Intermedio (I)
- Resistente (R)

### **5.6.2 Plan de análisis de datos**

Los resultados obtenidos de los antibiogramas se ordenaron y fueron almacenados en un libro de Excel y organizados en tablas. Los datos obtenidos fueron analizados mediante estadística descriptiva. Se realizaron las gráficas estadísticas, las cuales son los gráficos de barras, así como gráficos de porcentaje por especie y antibiótico.

### **5.7 Aspectos Éticos**

El proyecto fue realizado con la aprobación del Comité de Ética para la investigación en animales de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma.

El estudio fue ejecutado en el Laboratorio de la OD – Tumbes del Sanipes, y en el Laboratorio de Microbiología de la UPCH, con el permiso respectivo de ambas instituciones.

## **VI. RESULTADOS**

En el primer análisis microbiológico, se obtuvieron 170 aislados, procedentes de cada pool de poza muestreada. Se obtuvieron como resultado que 57 aislados eran del género *Vibrio*.

Mediante la prueba de Fermentación de la Sacarosa, se obtuvieron los siguientes resultados, que se muestran en la tabla 2:

Tabla 2. Resultados de la Fermentación de la Sacarosa de los 57 aislados determinados como *Vibrio* spp.

<b>Fermentación de la Sacarosa</b>	<b>N° de Cepas</b>	<b>%</b>
Sacarosa <sup>+</sup>	34	59.6
Sacarosa <sup>-</sup>	23	40.4
<b>TOTAL CEPAS</b>	<b>57</b>	<b>100</b>

Mediante la prueba de Halotolerancia, se obtuvieron los siguientes resultados, como se observa en la tabla 3:

Tabla 3. Resultados de la Prueba de Halotolerancia.

<b>Salinidad</b>	<b>N° de cepas positivas</b>	<b>%</b>
2%	11	19.3
6%	19	33.3
8%	11	19.3
10%	16	28.1
<b>TOTAL CEPAS</b>	<b>57</b>	<b>100</b>

Por lo tanto, se definen las siguientes especies del género *Vibrio*, detalladas a continuación, en la tabla 4.

Tabla 4. Especies patogénicas del género *Vibrio*, identificadas mediante bioquímica en este estudio.

Halotolerancia	Fermentación Sacarosa	N° de Cepas	%	Especie Identificada
2%	Positivo	8	14	<i>V. cholerae</i>
	Negativo	3	5.3	<i>V. mimicus</i>
6%	Positivo	11	19.3	<i>V. harveyi</i>
	Negativo	8	14	<i>V. vulnificus</i>
8%	Positivo	0		
	Negativo	11	19.3	<i>V. parahaemolyticus</i>
10%	Positivo	16	28.1	<i>V. alginolyticus</i>
	Negativo	0		
<b>TOTAL</b>		<b>57</b>	<b>100</b>	

Los resultados de los antibiogramas fueron los siguientes, mostrados en la tabla 5, para las 57 cepas usadas en el estudio:

Tabla 5. Resultados de los antibiogramas para *Vibrio* spp, de los 5 antibióticos (n=57).

Antibiótico	Sensible		Intermedio		Resistente	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Ampicilina	20	35.1	10	17.5	27	47.4
Tetraciclina	46	80.7	2	3.5	9	15.8
Sulfametoxazol + Trimetoprim	54	94.7	1	1.8	2	3.5
Cloranfenicol	41	71.9	5	8.8	11	19.3
Ciprofloxacino	53	93	4	7	0	0

Evaluando los antibiogramas por especie:

De las tres (3) cepas de *V. mimicus*:

- Una (1) cepa presentó resistencia a Ampicilina y Cloranfenicol.
- Una (1) cepa presentó resistencia a Tetraciclina.
- Una (1) cepa presentó sensibilidad a los 5 antibióticos.

De las ocho (8) cepas de *V. cholerae*:

- Una (1) cepa presentó resistencia múltiple a Tetraciclina y Ampicilina.
- Una (1) cepa presentó resistencia múltiple a Ampicilina y Cloranfenicol.
- Tres (3) cepas presentaron resistencia a Ampicilina.
- Una (1) cepa presentó sensibilidad intermedia a Ampicilina.
- Dos (2) cepas fueron sensibles a los 5 antibióticos.

De las ocho (8) cepas de *V. vulnificus*:

- Una (1) cepa presentó resistencia múltiple a Sulfametoxazol + Trimetoprim, Ampicilina y Cloranfenicol, además de sensibilidad intermedia a Ciprofloxacino.
- Una (1) cepa presentó resistencia múltiple a Sulfametoxazol + Trimetoprim y Ampicilina, además de sensibilidad intermedia a Cloranfenicol.
- Una (1) cepa presentó sensibilidad intermedia a Cloranfenicol.
- Una (1) cepa presentó sensibilidad intermedia a Ampicilina.
- Cuatro (4) cepas fueron sensibles a los 5 antibióticos.

De las once (11) cepas de *V. harveyi*:

- Una (1) cepa presentó resistencia múltiple a Tetraciclina, Ampicilina y Cloranfenicol, además de sensibilidad intermedia a Ciprofloxacino.
- Dos (2) cepas presentaron resistencia a Ampicilina.
- Una (1) cepa fue resistente a Tetraciclina.
- Dos (2) cepas presentaron sensibilidad intermedia a Ampicilina.
- Una (1) cepa presentó sensibilidad intermedia a Tetraciclina.
- Cuatro (4) cepas fueron sensibles a los 5 antibióticos.

De las once (11) cepas de *V. parahaemolyticus*:

- Una (1) cepa presentó resistencia múltiple a Ampicilina, Cloranfenicol y Tetraciclina, además de sensibilidad intermedia a Ciprofloxacino.
- Una (1) cepa presentó resistencia múltiple a Ampicilina y Cloranfenicol.
- Una (1) cepa presentó resistencia a Ampicilina, además de sensibilidad intermedia a Trimetoprim + Sulfametoxazol y Cloranfenicol.
- Una (1) cepa presentó resistencia a Tetraciclina, además de sensibilidad intermedia a Ampicilina.
- Una (1) cepa fue resistente a Cloranfenicol, además de presentar sensibilidad intermedia a Ampicilina.
- Cuatro (4) cepas fueron resistentes a Ampicilina.
- Dos (2) cepas, presentaron sensibilidad a los 5 antibióticos.

De las dieciséis (16) cepas de *V. alginolyticus*:

- Una (1) cepa presentó resistencia múltiple a Ampicilina, Tetraciclina y Cloranfenicol, además de sensibilidad intermedia a Ciprofloxacino.
- Una (1) cepa presentó resistencia múltiple a Ampicilina y Cloranfenicol.

- Una (1) cepa presentó resistencia múltiple a Ampicilina y Tetraciclina.
- Dos (2) cepas presentaron resistencia a Cloranfenicol, además de sensibilidad intermedia a Ampicilina.
- Una (1) cepa presentó resistencia a Tetraciclina, además de sensibilidad intermedia a Ampicilina y Cloranfenicol.
- Una (1) cepa presentó resistencia a Ampicilina, además de sensibilidad intermedia a Cloranfenicol.
- Cinco (5) cepas fueron resistentes a Ampicilina.
- Una (1) cepa presentó sensibilidad intermedia a Tetraciclina.
- Tres (3) cepas fueron sensibles a los 5 antibióticos.

Los resultados de los antibiogramas, así como los patrones de resistencia antimicrobiana, por especie, se muestran detallados en las tabla 6 y 7, respectivamente.



**Tabla 6. Resultados de antibiograma para las cepas aisladas de *Vibrio* spp  
(n=57)**

<b>Antibiótico</b>	Sensible	Intermedio	Resistente
	Nº	Nº	Nº
<b>Ampicilina</b>			
<i>V. mimicus</i>	2	0	1
<i>V. cholerae</i>	2	1	5
<i>V. vulnificus</i>	5	1	2
<i>V. harveyi</i>	8	1	2
<i>V. parahaemolyticus</i>	2	2	7
<i>V. alginolyticus</i>	4	3	9
<b>Tetraciclina</b>			
<i>V. mimicus</i>	2	0	1
<i>V. cholerae</i>	7	0	1
<i>V. vulnificus</i>	8	0	0
<i>V. harveyi</i>	8	1	2
<i>V. parahaemolyticus</i>	9	0	2
<i>V. alginolyticus</i>	12	1	3
<b>Cloranfenicol</b>			
<i>V. mimicus</i>	2	0	1
<i>V. cholerae</i>	8	0	0
<i>V. vulnificus</i>	5	2	1
<i>V. harveyi</i>	10	0	1
<i>V. parahaemolyticus</i>	7	1	3
<i>V. alginolyticus</i>	10	2	4
<b>Sulfametoxazol + Trimetoprim</b>			
<i>V. mimicus</i>	3	0	0
<i>V. cholerae</i>	8	0	0
<i>V. vulnificus</i>	6	0	2
<i>V. harveyi</i>	11	0	0
<i>V. parahaemolyticus</i>	10	1	0
<i>V. alginolyticus</i>	16	0	0
<b>Ciprofloxacino</b>			
<i>V. mimicus</i>	3	0	0
<i>V. cholerae</i>	8	0	0
<i>V. vulnificus</i>	7	1	0
<i>V. harveyi</i>	10	1	0
<i>V. parahaemolyticus</i>	10	1	0
<i>V. alginolyticus</i>	15	1	0

Tabla 7. Patrones de resistencia antimicrobiana, según especies

Clasificación	Antibiótico	n	Especies (n)
Monoresistencia	Ampicilina	16	<i>V. cholerae</i> (3) <i>V. harveyi</i> (2) <i>V. parahaemolyticus</i> (5) <i>V. alginolyticus</i> (6)
	Tetraciclina	4	<i>V. mimicus</i> (1) <i>V. harveyi</i> (1) <i>V. parahaemolyticus</i> (1) <i>V. alginolyticus</i> (1)
	Cloranfenicol	3	<i>V. parahaemolyticus</i> (1) <i>V. alginolyticus</i> (2)
Resistencia múltiple	Ampicilina + Cloranfenicol	4	<i>V. mimicus</i> (1) <i>V. cholerae</i> (1) <i>V. parahaemolyticus</i> (1) <i>V. alginolyticus</i> (1)
	Ampicilina + Tetraciclina	2	<i>V. cholerae</i> (1) <i>V. alginolyticus</i> (1)
	Ampicilina + Cloranfenicol + Tetraciclina	3	<i>V. harveyi</i> (1) <i>V. parahaemolyticus</i> (1) <i>V. alginolyticus</i> (1)
	Sulfametaxazol + Trimetoprim + Ampicilina	1	<i>V. vulnificus</i> (1)
	Sulfametaxazol + Trimetoprim + Ampicilina + Cloranfenicol	1	<i>V. vulnificus</i> (1)

## VII. DISCUSIÓN

Para el transporte y conservación de los aislados obtenidos del primer análisis microbiológico, se procedió a sembrar cada uno en 850  $\mu\text{L}$  de TSB, adicionando 150  $\mu\text{L}$  de glicerol estéril. Lamentablemente, la cantidad de  $\mu\text{L}$  usados de cada solución parecen no favorecer a la conservación en congelamiento de bacterias del género *Vibrio*, ya que, no se pudieron reactivar la totalidad de aislados, logrando solo resembrar en Lima el 39% del total obtenido en Tumbes.

La primera reactivación de cepas se realizó conforme a lo revisado en la bibliografía (**Silva et al., 2010**), donde se recomendaba realizar la incubación de 6 a 8 horas. Sin embargo, cuando se realizó dicho procedimiento en ese lapso de tiempo, se encontró que las cepas no se reactivaban, y por lo tanto, no había crecimiento en el agar selectivo. Por lo tanto, se optó incubar hasta por 24 horas los aislados, obteniéndose la reactivación total de las cepas usadas en este estudio.

Asimismo, siguiendo el enunciado anterior, se podría evaluar la reactivación de cepas mediante el protocolo realizado por **Franco-Monsreal et al (2010)**, donde se documenta la reactivación de cepas del género *Vibrio*, mediante el uso de agua peptonada alcalina, al 3% de Cloruro de Sodio (NaCl), y no al 1%, como se realizó en este estudio. Sin embargo, se debe de tomar en cuenta, que no todas las especies del género *Vibrio* tienen un nivel de halotolerancia alto, como es en el caso de *V.*

*mimicus* y *V. cholerae*, por citar las de mayor importancia en acuicultura langostinera y salud pública.

Los resultados que identifican mayor presencia de cepas luminiscentes o con fermentación de la sacarosa, concuerdan con lo manifestado por **Sunaryanto y Mariam (1986)**, haciendo énfasis en que la mayor presencia de cepas luminiscentes se da en épocas o estaciones de lluvias. El muestreo del presente estudio se realizó en el mes de abril del 2018, usual época de lluvias en la región Tumbes. Respecto a lo anterior, por la segunda prueba bioquímica, la Halotolerancia, se identifica fenotípicamente una mayor presencia de especies bioluminiscentes: *V. cholerae*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*.

Los resultados de la resistencia antimicrobiana, de bacterias del género *Vibrio* difieren de los resultados obtenidos por **Mendoza et al. (2016)**, estudio realizado en Ecuador, en el que se refiere que el 64% de cepas presentaron susceptibilidad, 13% presentaron sensibilidad intermedia, y 23% de las cepas fueron resistentes, mientras que, en la presente investigación, se encontró que el 75% de cepas fueron susceptibles a los antibióticos en estudio, 8% de cepas presentaron sensibilidad intermedia, y 17% de cepas fueron resistentes, por lo que se debe de tener cierto resguardo en los programas de Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos en nuestro país, debido a la masiva importancia de material y larvas procedentes del Ecuador.

Respecto al estudio de **Mendoza et al. (2016)**, se presenta a la Amoxicilina como el antibiótico con más perfiles de resistencia (65%), seguido de Oxitetraciclina

(20%), mientras que los hallazgos en el presente estudio, denotan que la Ampicilina (representante de la Amoxicilina) tiene un porcentaje de resistencia del 47%, y la Tetraciclina (representante de la Oxitetraciclina) obtiene un porcentaje de resistencia del 16%. En el Perú la acuicultura langostinera se da, principalmente en Tumbes, región colindante con el Ecuador. Por lo tanto, se deben de vigilar los buenas prácticas acuícolas, respecto al uso de antibióticos, debido a la semejanza en el manejo del recurso langostino entre ambos países.

En dos diferentes estudios, en acuicultura **Dixon (2000)**, y en bacterias del género *Vibrio* (**Roque et al., 2001**), concluyen que la mayor resistencia se da en antibióticos bacteriostáticos, mencionándose en ambas, a las Tetraciclinas como uno de los mayores grupos con perfiles de resistencia, seguidas de los Fenoles (Cloranfenicol) y Quinolonas. Sin embargo, en este trabajo, se ha encontrado un porcentaje bajo de resistencia a la Tetraciclina, además de bajos porcentajes referentes al Cloranfenicol, mientras que, en el caso del Ciprofloxacino (representante de las Quinolonas) no se ha encontrado resistencia por parte de alguna cepa. Esto, puede deberse, a que en otros países, la acuicultura langostinera se produce a gran escala, mayor que en nuestro país, además del uso constante de antibióticos que esto acarrea, práctica hasta el momento, no tan común en la acuicultura langostinera peruana.

La ampicilina es el antibiótico que presenta mayor monoresistencia (16 cepas), teniendo principalmente a *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* como especies predominantes, evaluando al prescribir alguna penicilina, si se aíslan estas dos

especies en alguna infección. Asimismo, hay mayor resistencia múltiple frente a Ampicilina + Cloranfenicol, por lo que se debe de tener cuidado al usar estos antibióticos, o al grupo que pertenecen, en acuicultura langostinera.

El riesgo de resistencia antimicrobiana es bajo, sin embargo, el porcentaje de resistencia, 17%, llama a la reflexión, debido a que hay resistencia múltiple en varias cepas, algunas de estas de *V. cholerae*, de vital importancia en Salud Pública, además que se tratan de antibióticos de amplio espectro, y cada especie identificada en este estudio, presenta resistencia. Pueden existir residuos de antibióticos en el recurso langostino, así como en el medio ambiente, afectando esto al consumidor, produciendo desarrollo de resistencia, problemas de alergias e intoxicaciones, así como a otras langostineras y producciones acuícolas, como también en recursos de vida libre, por lo que esta investigación busca dar a conocer el impacto económico, productivo, medioambiental, así como la relevancia en Salud Pública.

## VIII.CONCLUSIONES

1. Las técnicas bioquímicas utilizadas en el estudio, Fermentación de la Sacarosa y Halotolerancia, son muy útiles para identificar grandes poblaciones de aislados, frente a otras pruebas bioquímicas que pueden resultar de elevado costo para el acuicultor o investigador.
2. Se identificaron las especies predominantes en la acuicultura langostinera, siendo la más prevalente *Vibrio alginolyticus*, teniendo 16 cepas, seguido de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*, con 11 cepas cada uno. Luego, están las especies *V. vulnificus* y *V. cholerae*, con 8 cepas cada una. Por último, se obtuvieron 3 cepas de *V. mimicus*.
3. Cinco (5) de las cepas encontradas en el estudio, son de importancia en salud pública, como agentes etiológicos en enfermedad de transmisión alimentaria (ETA): *Vibrio mimicus*, *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*. *V. alginolyticus* es agente etiológico de otitis e infección de heridas, y *V. vulnificus* lo es en cuadros de septicemia.
4. Se determinaron los perfiles de sensibilidad antimicrobiana para las especies del género *Vibrio*, género bacteriano de importancia económica y de salud pública en la industria langostinera, siendo éste, uno de los primeros

estudios en realizarse a fin de vigilar la resistencia a los antimicrobianos, en acuicultura langostinera.

5. El antibiótico que presentó más resistencia fue la Ampicilina, en 27 cepas (47%), seguido del Cloranfenicol con 11 cepas (19%), y la Tetraciclina, con 9 cepas (15.8%).
6. El antibiótico que no presentó cepa resistente fue el Ciprofloxacino, teniendo solo 4 cepas con sensibilidad intermedia. Sin embargo, la combinación Sulfametoxazol + Trimetoprim, con 2 cepas resistentes, presenta más cepas sensibles, 54, frente a 53 cepas sensibles al Ciprofloxacino.
7. Respecto a las especies, *V. alginolyticus* fue la especie que presentó más cepas resistentes (11), de los cuales, la mayoría fueron a Ampicilina (8). En contraparte, por el número de cepas (3), *V. mimicus* fue la especie que menos resistencia presentó (2), sin embargo, estas fueron a Ampicilina.
8. Respecto a los perfiles de resistencia, Ampicilina fue la que presentó mayor monoresistencia a las especies (16 cepas), mayormente *V. alginolyticus* (6) y *V. parahaemolyticus* (5). En cuanto a la resistencia múltiple, Ampicilina junto con Cloranfenicol fueron las de mayor predominancia, presentando *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* y *V. mimicus*, una cepa de cada una.



9. Por todo lo anterior expuesto, el antibiótico más seguro para el uso en acuicultura langostinera, es Ciprofloxacino, así como la combinación Sulfametoxazol – Trimetoprim.
  
10. El presente estudio demuestra que, el riesgo en cuanto a resistencia antimicrobiana en bacterias del género *Vibrio*, es bajo.

## IX. RECOMENDACIONES

1. El plan conjunto llevado por el SANIPES y OPS – OMS PANAFTOSA, sobre la Vigilancia Integrada de Resistencia a los Antimicrobianos en Bacterias de Transmisión Alimentaria (VIRABTA) debe de contemplar el estudio sobre Resistencia antimicrobiana en bacterias del género *Vibrio*, como un plan de acción epidemiológica, realizando al menos, 2 muestreos al año, en los centros de Acuicultura Langostinera de Tumbes y Piura. El plan VIRABTA debe de contemplar uso de antimicrobianos y la resistencia a los mismos, en una misma línea de tiempo.
2. El presente estudio, debe de volver a realizarse, al menos cada 6 meses, a fin de evaluar no sólo bacterias del género *Vibrio*, sino otras bacterias que pueden presentarse en el recurso langostino, no tan frecuentes, como son *Aeromonas hydrophila*, *Proteus* sp., *Enterobacter* sp., entre otras.
3. Asimismo, conjuntamente con el análisis fenotípico, debería de realizarse una investigación molecular, al menos una vez al año, de las bacterias en estudios, para observar los plásmidos que se dan en los genes de resistencia a antibióticos de uso acuícola.
4. A fin de evitar el uso indiscriminado de antibióticos, se deberían de realizar charlas continuas, tanto en las regiones de Tumbes y Piura, así como en las

mismas langostineras, haciendo partícipes a todos los involucrados en la cadena productiva: Técnicos, personal administrativo, Biólogos, Ingenieros Pesqueros, y principalmente, Médicos Veterinarios.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Álvarez J, Austin B, Álvarez A, Agurto C. 2011. Resistencia a los Antimicrobianos de Vibrios aislados de peces y camarones marinos en Venezuela. FCV – LUZ 11 (2): 139-148.
2. Baticados, M., Lavilla-Pitogo, C., Cruz-Lacierda, E., De la Pena, L. 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *Vibrio splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. Dis Aquat Org 9:133-139.
3. Bernal M, Guzmán M. 1984. El Antibiograma de Discos, Normalización de la Técnica de Kirby-Bauer. Biomédica 70 (3-4): 112-121.
4. Briggs M. 2009. *Penaeus vannamei*. In Cultured aquatic species fact sheets [CD-ROM (multilingual)]. Edited and compiled by Valerio Crespi and Michael New. FAO.
5. CLSI. 2010. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline, 3rd Edn. Austin, Texas.
6. Cuéllar-Anjel J. 2008. Métodos de Diagnóstico de Enfermedades en Camarones Marinos de Cultivo. En: Morales V, Cuéllar-Anjel J. Guía

Técnica de Patología e Inmunología de Camarones *Penaeidos*. Panamá:  
Programa CYTED Red II-D *Vannamei*; p. 1-19.

7. Cuéllar-Anjel J. 2013. *Vibriosis en Langostinos*. The Center for Food Security and Public Health, Iowa State University, United States.
8. Dixon B. 2000. *La Biología de la Resistencia a los Antibióticos en Acuicultura*. Panorama Acuícola. México.
9. Dulanto, J. R. 2013. *Identificación rápida de especies del género *Vibrio* asociados con el cultivo de "langostino blanco" *Litopenaeus vannamei* por amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)*. Tesis para Título Profesional de Biólogo con mención en Hidrobiología y Pesquería. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 109 p.
10. FAO. 2006. Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*. Programa de información de especies acuáticas. Texto de Briggs, M. En: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 7 April 2006.
11. Feijó, R. G. 2009. *Prospecção de genes relacionados à ocorrência de enfermidades no camarão *Litopenaeu vannamei* (Boone, 1931) sob condições de cultivo*. Título de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais,

Universidade de Federal Do Ceará. Área de concentração Ciências Biológicas, Fortaleza, Brasil.

12. Franco-Monsreal, J., Zarza-García, A., Villa-Ruano, N., Ramón-Canul, L., Galván-Valencia, O., Meza, M., Mota, L. 2010. Especies patógenas del género *Vibrio* en alimentos marinos de establecimientos de Isla del Carmen, Campeche, Mexico. *Ciencia y Mar*, XIV 40:31-44.
13. Garrity, G., Brenner, D., Krieg, N., Stanley, J. 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology* vol. 2. 2<sup>nd</sup> ed. The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. New York: Springer. p 491-555.
14. Gomez-Gil B, Tron-Mayen L, Roque A, Turnbull JF, Inglis V, Guerra-Flores A. 1998. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*; 163:1-9.
15. Gomez-Gil, B., Roque, A., Soto-Rodríguez, S. 2018. *Vibriosis en Camarones y su Diagnóstico (Vibriosis in Shrimp and its Diagnosis)*. 14.
16. Greca A. 2003. La resistencia bacteriana y los nuevos antibióticos. En libro de Ponencias: VI Jornadas Internacionales de Medicina Interna - X Jornadas de Medicina Interna del Litoral Argentino.

17. Hameed A, Rao P, Farmer J, Brenner F, Fanning G. 1996. Characteristics and pathogenicity of a *Vibrio campbelii* like bacterium affecting hatchery reared *Penaeus indicus* larvae. *Aquacult Res*; 27:853-863.
18. Karunasagar I, Pai R, Malathi G. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture* 128: 203-209.
19. Kaysner, C., DePaola, A. 2004. *Bacteriological Analytical Manual*, Chapter 9: *Vibrio*. Laboratory Methods, FDA.
20. Lavilla-Pitogo C, Baticados M, Cruz-Lacierda E, Pena L. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Phillipines. *Aquaculture* 91:1-13.
21. Lightner D, McVey J. 1993. Diseases of cultured penaeid shrimp. *CRC Handbook of Mariculture, Crustacean Aquaculture*. 2nd Ed. Florida: CRC Press; pp 393-486.
22. Lightner D. 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology*; 106: 110-130.

23. Málaga, H. 2010. Epidemiología Veterinaria. 2da ed. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. p. 113-157.
24. Mendoza S, Tinoco O, Nieto K. 2016. Evaluación de la carga bacteriana y resistencia a antibióticos de bacterias aisladas en zonas marinas de alta influencia de producción larvaria en Ecuador. Rev del Inst de Invest FIGMMG-UNMSM 19 (38): 137-146.
25. Ministerio de la Producción. 2016. Principales Especies Acuícolas cultivadas en el Perú. Dirección General de Acuicultura, Despacho Viceministerial de Pesquería, Ministerio de la Producción. Lima: PRODUCE.
26. [MINSA] Ministerio de Salud. 2002. Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión. Instituto Nacional de Salud. Lima: MINSA. Serie de Normas Técnicas N° 30. 67 p.
27. Mota L. 1996. Farmacología Veterinaria. 1ra ed. México: Universidad Veracruzana. p 50-51.
28. Plumb D. 2010. Manual de Farmacología Veterinaria. 6ª ed. Buenos Aires, Argentina: Inter-Médica. 1256 p.



29. Prayitno S, Latchford J. 1995. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio* - effect of salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture*; 132: 105-112.
30. [PRODUCE] Ministerio de la Producción. 2015. Catastro Acuícola Nacional. Dirección General de Acuicultura, Despacho Viceministerial de Pesquería. Lima: PRODUCE.
31. Rodríguez-Camacho JC, Méndez E, Rivas AM, Cortés J.A. 2014. Evaluación de la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) silvestre estuarino en el sur de Sinaloa y norte de Nayarit, mediante análisis microbiológico y PCR. *Revista BioCiencias*; 2: 282-292.
32. Roque A, Molina A, Bolán M, Gómez G. 2001. *In vitro* susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. *International Journal of Antimicrobial Agents* 17: 383-387.
33. [SANIPES] Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. 2016. Indicadores Sanitarios y de Inocuidad para los Productos Pesqueros y Acuícolas para Mercado Nacional y de Exportación. Resolución de Dirección Ejecutiva No 057-2016-SANIPES-DE.

34. [SANIPES] Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. 2018. Programa de Vigilancia Sanitaria – Capítulo Crustáceos. Lima: SANIPES. Informe Técnico N° 010-2018 – SANIPES/DSNPA.
35. Santiago ML, Espinosa A, Bermúdez M. 2009. Uso de Antibióticos en la Camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 40 (3): 22-32.
36. Silva W, Olea A, Cachicas V, Fernández J, Ibañez D, Hormazábal J, García J, Maldonado A. 2008. Manual de Procedimientos de Aislamiento, Identificación y Caracterización de *Vibrio parahaemolyticus*. Santiago de Chile: Ministerio de Salud – Instituto de Salud Pública.
37. Soto-Rodriguez S, Simoes N, Roque A, Gomez-Gil B. 2006. Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. *Aquaculture* 258: 109-115.
38. Sunaryanto A, Mariam A. 1986. Occurrence of pathogenic bacteria causing luminescence in penaeid larvae in Indonesian hatcheries. *Bull Brackishwater Aquacul Develop Centre* 8: 64-70.
39. Thompson F, Iida T, Swings J. 2004. Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; 68 (3): 403-431.

## XI. ANEXOS



Figura 9. Región Tumbes, donde se ubican las langostineras.

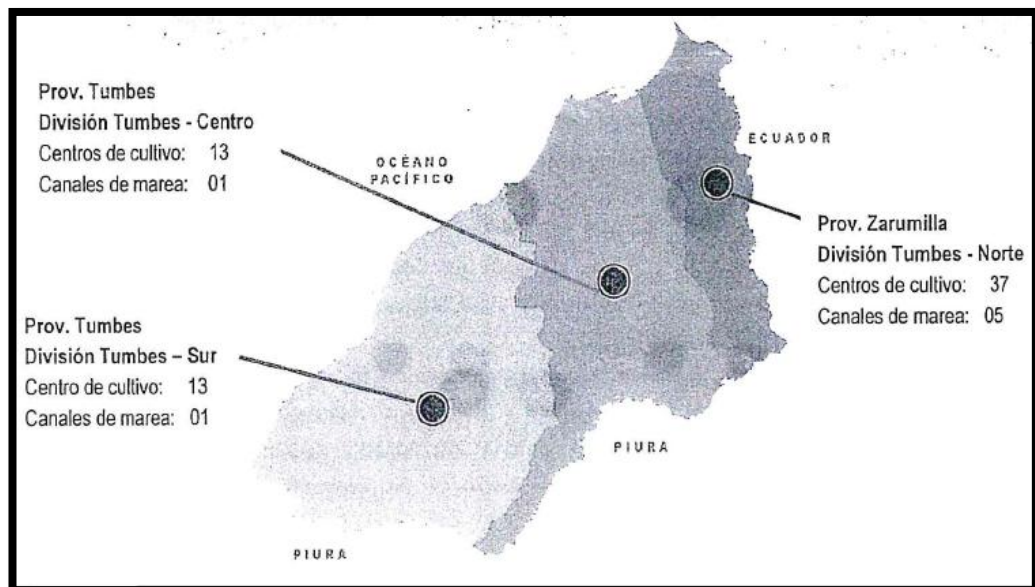
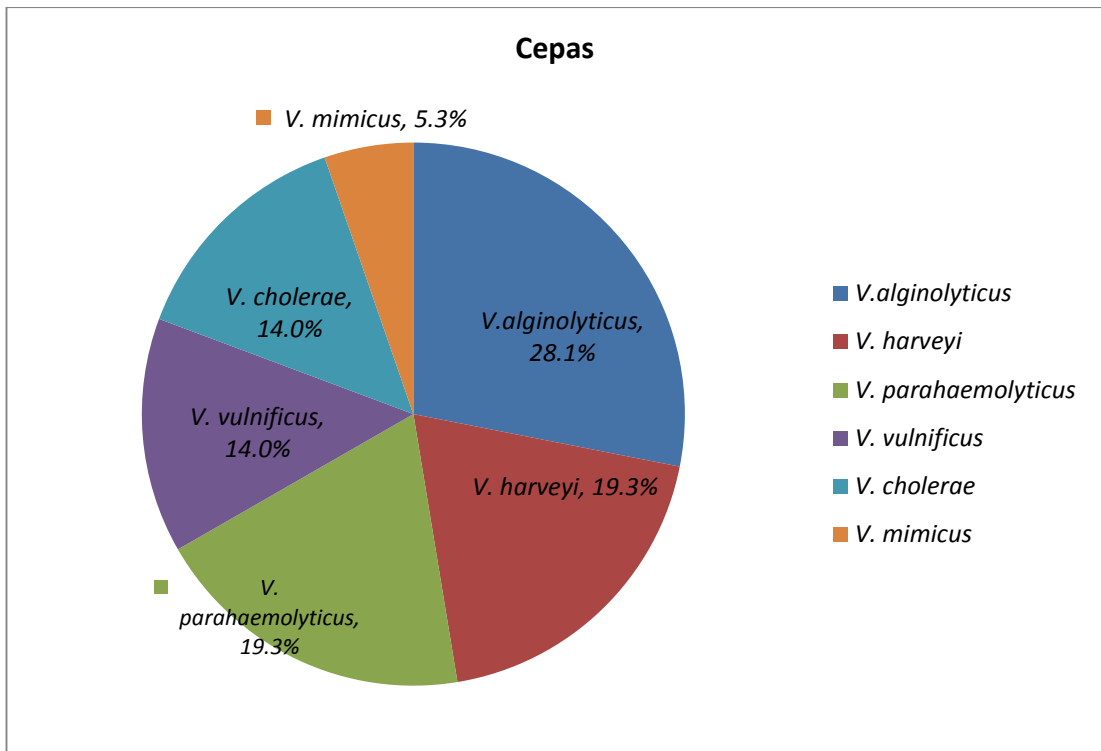
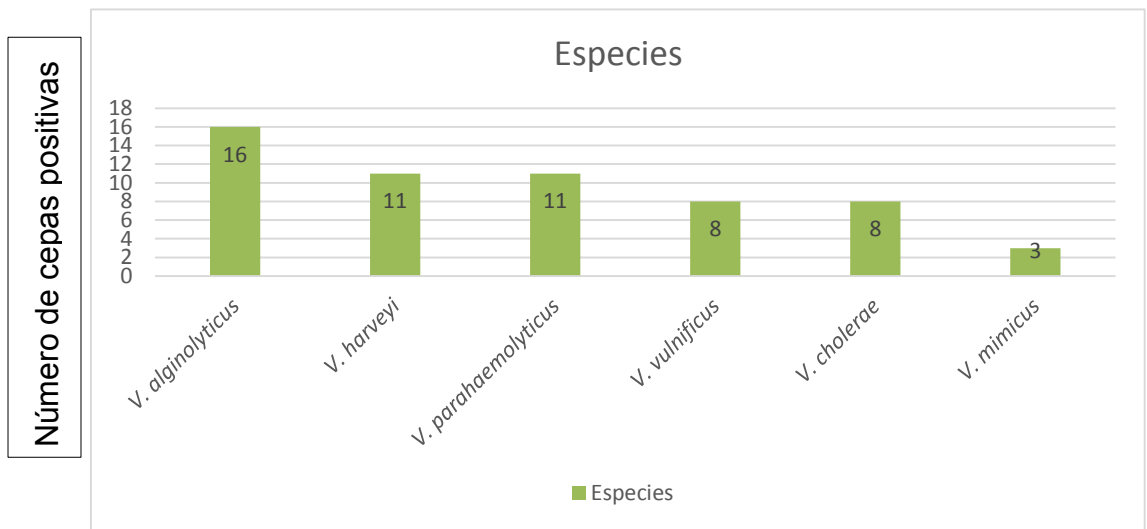


Figura 10. División de la región Tumbes por unidades epidemiológicas según **SANIPES**. Fuente: Informe Técnico n° 010 – 2018 – SANIPES/DSNPA

Tabla 8. Aislados del género *Vibrio*, usados en el presente estudio.

ATP 1	H4 - 1
ATP 2	H4 - 4
CC 3	H4 - 6
CC 5	H4 - 7
DR5 - 4	H5 - 1
DR5 - 5	H5 - 2
DR 11 - 1	H5 - 5
DR 11 - 2	LK 5
DR 11 - 4	MN4 - 4
DR 12 - 3	MN9 - 1
DR 12 - 6	PA4 - 1
ELZ 3	PA4 - 6
ELZ 4	PA12 - 1
EG 2	PA12 - 2
EG 3	PAL 1
EG 5	PAL 2
G2 - 2	PAL 5
G2 - 3	PAL 6
G3 - 1	PAL 7
G3 - 2	PAL 8
G3 - 13	PAL 12
G3 - 14	PAR 1
G1A - 3	SG 1
G4A - 3	SG 3
HG1 - 1	SI 2
HG1 - 2	U 2
HG 19 - 1	U 3
HG19 - 2	U 11
HG19 - 3	



**Gráfico 2. Distribución por porcentaje de cepas del género *Vibrio*, usados en este estudio**



Figura 11. Espectofotómetro usado en este estudio, a 622 nm, mostrando una Absorbancia de 0.094.

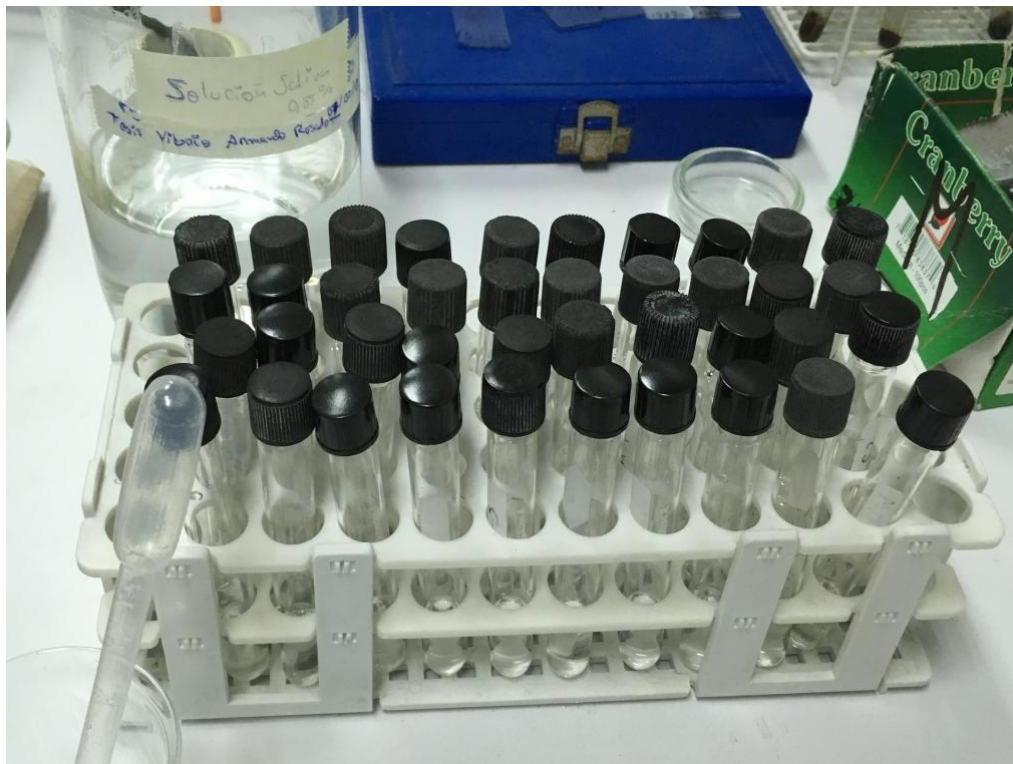
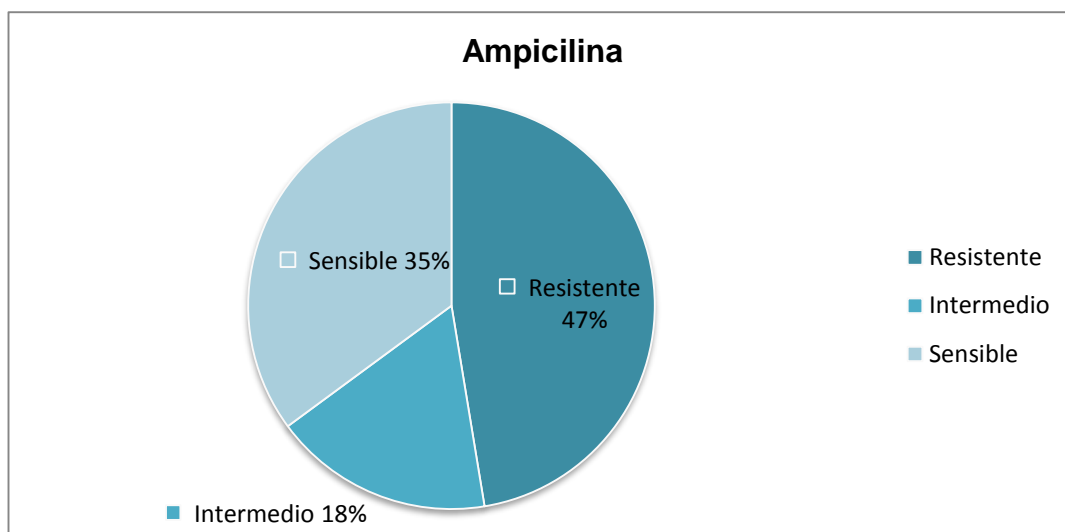
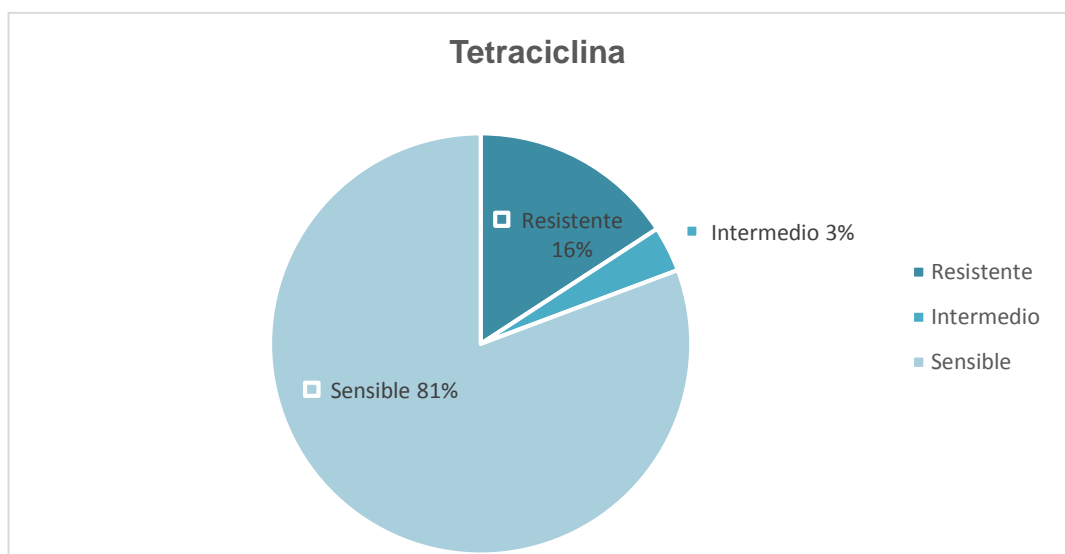


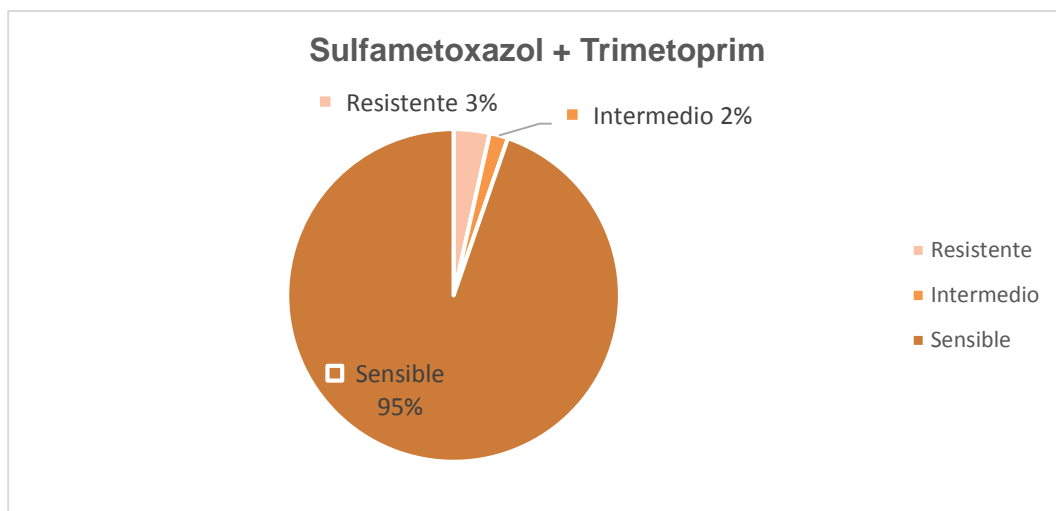
Figura 12. Tubos de Ensayo con Solución Salina al 0,85% lo que permite el crecimiento de *Vibrio* sp en Agar Mueller Hinton sin adición de Cloruro de Sodio.



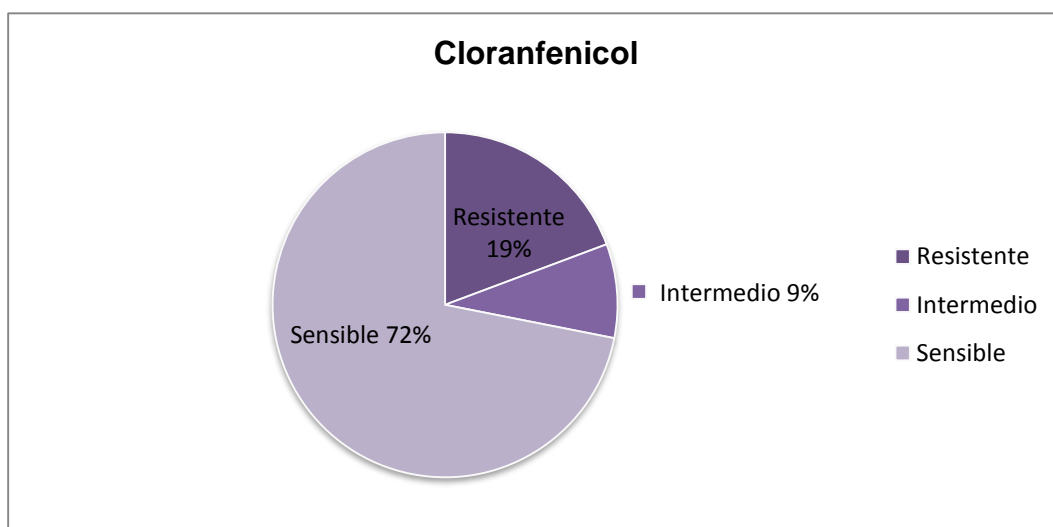
**Gráfico 3. Distribución por porcentaje de cepas, del análisis fenotípico de Ampicilina.**



**Gráfico 4. Distribución por porcentaje de cepas, del análisis fenotípico de Tetraciclina.**

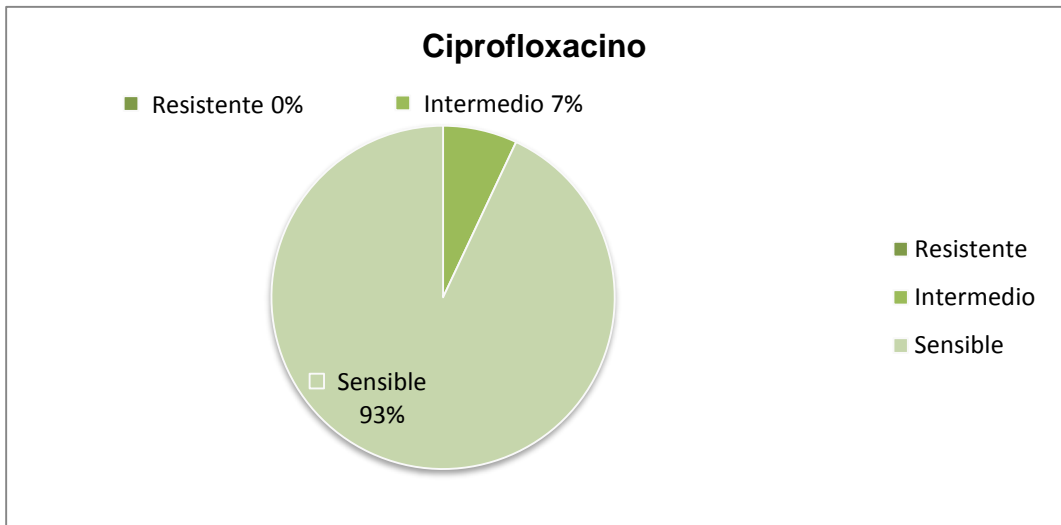


**Gráfico 5. Distribución por porcentaje de cepas, del análisis fenotípico de la combinación Sulfametoxazol + Tripetoprim.**



**Gráfico 6. Distribución por porcentaje de cepas, del análisis fenotípico de Cloranfenicol.**





**Gráfico 7. Distribución por porcentaje de cepas, del análisis fenotípico de Ciprofloxacino.**

Tabla 9. Resultados de Antibiograma, por especie, para *V. mimicus*

<b>Análisis Fenotípico</b>	<b>Resistente</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Sensible</b>
<b>Ampicilina</b>	Cepa 1		Cepa 2 Cepa 3
<b>Tetraciclina</b>	Cepa 2		Cepa 1 Cepa 3
<b>Sulfametoxazol + Trimetoprim</b>			Cepa 1 Cepa 2 Cepa 3
<b>Cloranfenicol</b>	Cepa 1		Cepa 2 Cepa 3
<b>Ciprofloxacino</b>			Cepa 1 Cepa 2 Cepa 3

<b>Análisis Fenotípico</b>	<b>Resistente</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Sensible</b>
<b>Ampicilina</b>	Cepa 1	Cepa 6	Cepa 7
	Cepa 2		Cepa 8
	Cepa 3		
	Cepa 4		
	Cepa 5		
<b>Tetraciclina</b>	Cepa 1		Cepa 2
			Cepa 3
			Cepa 4
			Cepa 5
			Cepa 6
			Cepa 7
			Cepa 8
<b>Sulfametoxazol + Trimetoprim</b>			Cepa 1
			Cepa 2
			Cepa 3
			Cepa 4
			Cepa 5
			Cepa 6
			Cepa 7
			Cepa 8
<b>Cloranfenicol</b>	Cepa 2		Cepa 1
			Cepa 3
			Cepa 4
			Cepa 5
			Cepa 6
			Cepa 7
			Cepa 8
<b>Ciprofloxacino</b>			Cepa 1
			Cepa 2
			Cepa 3
			Cepa 4
			Cepa 5
			Cepa 6
			Cepa 7
			Cepa 8

Tabla 10. Resultados de Antibiograma, por especie, para *V. cholerae*

<b>Antibiótico</b>	<b>Análisis Fenotípico</b>		
	<b>Resistente</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Sensible</b>
<b>Ampicilina</b>	Cepa 1 Cepa 2	Cepa 4	Cepa 3
			Cepa 5
			Cepa 6
			Cepa 7
			Cepa 8
<b>Tetraciclina</b>			Cepa 1
			Cepa 2
			Cepa 3
			Cepa 4
			Cepa 5
			Cepa 6
			Cepa 7
			Cepa 8
<b>Sulfametoxazol + Trimetoprim</b>	Cepa 1 Cepa 2		Cepa 3
			Cepa 4
			Cepa 5
			Cepa 6
			Cepa 7
<b>Cloranfenicol</b>	Cepa 1	Cepa 2 Cepa 3	Cepa 4
			Cepa 5
			Cepa 6
			Cepa 7
			Cepa 8
<b>Ciprofloxacino</b>		Cepa 1	Cepa 2
			Cepa 3
			Cepa 4
			Cepa 5
			Cepa 6
			Cepa 7
			Cepa 8

Tabla 11. Resultados de Antibiograma, por especie, para *V. vulnificus*

Tabla 12. Resultados de Antibiograma, por especie, para *V. harveyi*

<b>Antibiótico</b>	<b>Análisis Fenotípico</b>		
	<b>Resistente</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Sensible</b>
<b>Ampicilina</b>			Cepa 4
			Cepa 7
		Cepa 1	Cepa 8
		Cepa 2	Cepa 9
		Cepa 3	Cepa 10
			Cepa 11
			Cepa 5
			Cepa 6
			Cepa 8
			Cepa 9
			Cepa 10
<b>Tetraciclina</b>			Cepa 2
			Cepa 3
			Cepa 5
		Cepa 1	Cepa 6
		Cepa 4	Cepa 8
			Cepa 9
			Cepa 10
			Cepa 11
			Cepa 7
			Cepa 1
			Cepa 3
<b>Sulfametoxazol + Trimetoprim</b>			Cepa 4
			Cepa 5
		Cepa 2	Cepa 6
			Cepa 7
			Cepa 8
			Cepa 9
			Cepa 10
			Cepa 11
			Cepa 1
			Cepa 3
			Cepa 4

<b>Análisis Fenotípico</b>	<b>Antibiótico</b>		
	<b>Resistente</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Sensible</b>
<b>Cloranfenicol</b>			Cepa 2
			Cepa 3
			Cepa 4
			Cepa 5
			Cepa 6
	Cepa 1		Cepa 7
			Cepa 8
			Cepa 9
			Cepa 10
			Cepa 11
	<b>Ciprofloxacino</b>		Cepa 1
			Cepa 3
			Cepa 4
			Cepa 5
			Cepa 6
			Cepa 7
			Cepa 8
			Cepa 9
			Cepa 10
			Cepa 11

Tabla 13. Resultados de Antibiógrama, por especie, para *V. parahaemolyticus*

Análisis Fenotípico	Resistente	Intermedio	Sensible	
<b>Ampicilina</b>	Cepa 1	Cepa 4		
	Cepa 2	Cepa 5	Cepa 10	
	Cepa 3		Cepa 11	
	Cepa 6			
	Cepa 7			
	Cepa 8			
	Cepa 9			
	<b>Tetraciclina</b>	Cepa 1		Cepa 2
		Cepa 4		Cepa 3
			Cepa 5	
			Cepa 6	
			Cepa 7	
			Cepa 8	
			Cepa 9	
			Cepa 10	
			Cepa 11	
<b>Sulfametoxazol + Trimetoprim</b>			Cepa 3	Cepa 1
				Cepa 2
			Cepa 4	
			Cepa 5	
			Cepa 6	
			Cepa 7	
			Cepa 8	
			Cepa 9	
			Cepa 10	
			Cepa 11	

<b>Análisis Fenotípico</b>	<b>Resistente</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Sensible</b>
<b>Antibiótico</b>			
	<b>Cloranfenicol</b>	Cepa 1 Cepa 2 Cepa 5	Cepa 3
	<b>Ciprofloxacino</b>		Cepa 1 Cepa 2 Cepa 3 Cepa 4 Cepa 5 Cepa 6 Cepa 7 Cepa 8 Cepa 9 Cepa 10 Cepa 11



Tabla 14. Resultados de Antibiograma, por especie, para *V. alginolyticus*

Análisis Fenotípico	Resistente	Intermedio	Sensible
<b>Antibiótico</b>			
<b>Ampicilina</b>	Cepa 1	Cepa 4	Cepa 7
	Cepa 2	Cepa 5	Cepa 13
	Cepa 3	Cepa 6	Cepa 14
	Cepa 8		Cepa 15
	Cepa 9		Cepa 16
	Cepa 10		
	Cepa 11		
	Cepa 12		
<b>Tetraciclina</b>	Cepa 1	Cepa 13	Cepa 2
	Cepa 3		Cepa 4
	Cepa 6		Cepa 5
			Cepa 7
			Cepa 8
			Cepa 9
			Cepa 10
			Cepa 11
			Cepa 12
			Cepa 14
			Cepa 15
			Cepa 16

<b>Análisis Fenotípico</b> <b>Antibiótico</b>	<b>Resistente</b>	<b>Intermedio</b>	<b>Sensible</b>
<b>Sulfametoxazol</b> <b>+ Trimetoprim</b>		Cepa 3	Cepa 1
			Cepa 2
			Cepa 4
			Cepa 5
			Cepa 6
			Cepa 7
			Cepa 8
			Cepa 9
			Cepa 10
			Cepa 11
			Cepa 12
			Cepa 13
			Cepa 14
			Cepa 15
			Cepa 16
	<b>Cloranfenicol</b>	Cepa 1	Cepa 6
Cepa 2		Cepa 7	Cepa 8
Cepa 4			Cepa 9
Cepa 5			Cepa 10
			Cepa 11
			Cepa 12
			Cepa 13
			Cepa 14
			Cepa 15
			Cepa 16

---

**Ciprofloxacino**

Cepa 1

Cepa 2

Cepa 3

Cepa 4

Cepa 5

Cepa 6

Cepa 7

Cepa 8

Cepa 9

Cepa 10

Cepa 11

Cepa 12

Cepa 13

Cepa 14

Cepa 15

Cepa 16

---