

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**“Identificación y cuantificación de *Vibrio* spp en camarón de río (*Cryphiops caementarius*) procedente de Mercado pesquero Villa María del Triunfo”**

André Sánchez Villanueva

Tesis para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

**Lima Perú**

**2018**

## *AGRADECIMIENTO*

Al Dr. Hernán Málaga (URP) y al Dr. Luis Llanco (UPCH) por su apoyo y asesoría constante durante todo el proceso de elaboración de este trabajo. Su confianza y paciencia hicieron posible concretar este trabajo.

A mi madre Lily y padre Roberto como también a mi pareja Andrea por el apoyo incondicional que me han brindado durante la ejecución de esta tesis.

# INDICE

INDICE.....	3
INDICE DE CUADROS .....	5
INDICE DE IMÁGENES.....	6
RESUMEN .....	7
ABSTRACT .....	8
I. INTRODUCCIÓN.....	9
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
III. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN .....	12
IV. OBJETIVOS.....	13
4.1 Objetivo general .....	13
4.2. Objetivo específico .....	13
V. ANTECEDENTES .....	14
5.1 FAMILIA VIBRIONACEAE.....	14
5.1.1 GENERO <i>VIBRIO</i> spp .....	14
5.2 PANDEMIA DE LOS VIBRIOS .....	17
5.3 SITUACIÓN EN EL MUNDO .....	19
5.3.1 SITUACIÓN SANITARIA EN EL PERÚ.....	21
5.4 ALIMENTOS IMPLICADOS.....	23
VI. HIPOTESIS .....	25
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
7.1 Lugar de ejecución.....	26
7.2 Tipo y diseño de investigación .....	26
7.3 Variables.....	26
7.4 Marco lógico.....	27
7.5 Muestreo .....	30
7.6 Procedimientos y análisis de datos .....	30
VIII. RESULTADOS .....	32
IX. DISCUSIÓN.....	34
X. CONCLUSIONES.....	37
XI. RECOMENDACIONES .....	38

XII. REFERENCIAS CITADAS .....	39
--------------------------------	----

# INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Especies de <i>Vibrio</i> de importancia clínica en el ser humano.....	15
Cuadro 2. Cuantificación de <i>Vibrio</i> spp fermentadores de sacarosa y no fermentadores de sacarosa mediante la unidad formadora de colonia (UFC).....	33
Cuadro 3. Cuantificación promedio del total número de muestras de <i>Vibrio</i> spp mediante la unidad formadora de colonia (UFC).....	33

# INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Número de casos de cólera reportados por continente.....	19
Fig. 2. Reporte de casos de mortalidad por cólera en el 2015.....	20
Fig. 3. Número de casos reportados de <i>V. parahaemolyticus</i> por mes en el Perú entre 1994 y 2005.....	22
Fig. 4. Número de casos de infección por <i>V. cholerae</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> en Perú entre los años de 1991 y 1997. Fuente: Martínez- Urtaza <i>et al.</i> , 2008.....	23
Figura 5. Recuento de colonias de <i>Vibrio</i> spp en 5 diluciones seriadas en agar TCBS.	32
Figura 6. Presencia de colonias fermentadoras de sacarosa (color amarillo) y no fermentadoras a sacarosa (color verde) B. Tinción Gram de las colonias vistas en el medio de cultivo siendo Gram negativas.....	32

## RESUMEN

Las principales fuentes de extracción del camarón de río (*Cryphiops caementarius*) proceden mayoritariamente de la costa sur de nuestro país principalmente Arequipa, la cual comprende un recurso importante para la economía de la pesca continental. Esta especie es comercializada en los principales mercados del departamento de Lima, fundamentalmente las de Ventanilla y Villa María del Triunfo. Estos productos son consumidos en la forma semicocida o cocida, como el cebiche o chupe respectivamente, los que pueden afectar al consumidor si están contaminados con bacterias del género *Vibrio* spp, bacteria halófila presente comúnmente en ambientes marinos y estuarios, capaz de generar infecciones gastroentéricas que pueden conllevar a la muerte. La vibriosis es una enfermedad de importancia para la salud pública mundial desde su primera aparición, como la pandemia de cólera que generó gran número de casos mortales, y la que se registró en 1991 en el Perú. Por lo tanto, el objetivo de este estudio se enfocó en la identificación y cuantificación de *Vibrio* spp en camarón de río comercializado en el mercado de Villa María del Triunfo. Se identificó *Vibrio* fermentador de sacarosa en el 100% de las muestras, con una media de  $10 \times 10^6$  UFC/g, y 20% de positividad para *Vibrio* no fermentadores de sacarosa, con una media de  $36 \times 10^2$  UFC/g. Se concluye que las muestras de camarón de río presentan riesgo moderado/alto para la salud pública.

**Palabras claves:** Camarón de río, *Vibrio* spp, Villa María del triunfo

## ABSTRACT

The main sources of river shrimp (*Cryphiops caementarius*) extraction come mainly from the southern coast of our country, mainly Arequipa, which comprises an important resource for the economy of continental fisheries. This species is commercialized in the main markets of the department of Lima, in the fishing markets of Ventanilla and Villa María del Triunfo. These products are consumed in the semi-cooked or cooked form, such as ceviche or chupe respectively, which can affect the consumer if they are contaminated with bacteria of the genus *Vibrio* spp., Halophilic bacteria commonly present in marine environments and estuaries, capable of generating gastroenteric infections that can lead to death. Vibriosis is a disease of importance for world public health since its first appearance, such as the cholera pandemic that generated a large number of fatal cases, and the one registered in 1991 in Peru. Therefore, the objective of this study it focused on the identification and quantification of *Vibrio* spp in river shrimp commercialized in the market of Villa María del Triunfo. *Vibrio* sucrose fermentor was identified in 100% of the samples, with an average of  $10 \times 10^6$  UFC/g., and 20% positivity for *Vibrio* non-sucrose fermentors, with a mean of  $36 \times 10^2$  UFC/g. It is concluded that samples of river shrimp present moderate/high risk to public health.

**Keywords: River shrimp, *Vibrio* spp, Villa María del triunfo.**



# I. INTRODUCCIÓN

El camarón de río (*Cryphiops caementarius*) es un artrópodo que habita en aguas dulces, como ríos y riachuelos, de la costa occidental del Perú y Chile, destacándose porque, durante su etapa de reproducción, migra a la desembocadura de estos para liberar sus larvas en los estuarios (Morales y Meruane, 2013; Meruane *et al.*, 2006). Asimismo, la producción de esta especie es de importancia económica para la pesquería continental de la costa sur de nuestro país (IMARPE, 2013). Por otra parte, *Vibrio spp* es un microorganismo halófilo que se halla comúnmente en ambientes marinos y estuarios (Kriem *et al.*, 2015), género que comprende diferentes especies considerándose cuatro como patógenas para el ser humano: *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. mimicus* (FDA, 2017).

La identificación de esta bacteria en productos hidrobiológicos es relevante ya que estos pueden actuar como vehículo de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) asociados al consumo de mariscos, tales como infecciones del tracto gastrointestinal que, en un intervalo de tiempo tan corto como 24 horas post ingestión, puede causar diarrea, náusea, vómito, fiebre y dolor estomacal (CDC, 2017).

Existen reportes de la presencia de vibrios patógenos para el ser humano en crustáceos de agua dulce similares al camarón de río, como el camarón de malasia (*Macrobrachium rosenbergii*), sin causar ningún tipo de lesión en ellos, lo que sugiere que hacen parte de su microbiota residente (Mishra *et al.*, 2010).

En el Perú, en un estudio en pescados y moluscos procedentes del mercado de Ventanilla, *V. parahaemolyticus* fue la especie que se aisló con más frecuencia (Aliaga, Miranda y Zeballos, 2010). El hallazgo de esta especie, partir de casos clínicos de personas mayores de 30 años, es suficiente para requerir atención hospitalaria inmediata (Gil *et al.*, 2007).

Debido a la detección de especies de *Vibrio*, en especial *V. parahaemolyticus*, a partir de especies marinas en diferentes países, incluyendo el Perú, este estudio

se enfocará en hallar y cuantificar *Vibrio spp*, aislado de camarones de río, en los principales mercados pesqueros del departamento de Lima para determinar si existe riesgo de infección directa a partir de esta especie de agua dulce.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*Vibrio spp* es una bacteria que habita normalmente en aguas costeras y que presenta mayor número cuando se eleva la temperatura del mar. Este patógeno posee importancia en la salud pública mundial porque puede afectar a los consumidores de productos marinos frescos o semicrudos (CDC, 2017). Existen reportes de la presencia de diferentes especies de *Vibrio* provenientes de agua dulce, resaltando la necesidad de tomar medidas de bioseguridad para el cuidado del consumidor (Noorlis *et al.*, 2011). Si bien en nuestro país existen reportes con respecto a la presencia de *Vibrio spp* en alimentos de origen marino, es desconocida esta información en especies de agua dulce no pudiendo descartarse que existe riesgo para la salud pública.

### III. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

En nuestro medio no existen reportes de infección por el consumo de camarón de río (*Cryphiops caementarius*); si bien *Vibrio spp* es una bacteria halofílica, no hay evidencias de la presencia de este agente en especies de agua dulce, motivo por el cual algunos autores presumen que pueda existir una contaminación cruzada por una mala manipulación del producto. El camarón de río que se vende en la región Lima procede principalmente de la provincia de Camaná, Arequipa. Esta especie es de hábitos detritívoros y su consumo se realiza a través de diferentes platos cocidos (ej. Chupe de camarones) o en la forma semicruda (ej. cebiche). Esta última presentación hace necesaria la identificación y cuantificación de las especies patogénicas de *Vibrio*, que pueden significar un riesgo para el consumidor cuando el producto no es manipulado adecuadamente, con el fin que los resultados obtenidos puedan ser aprovechados en la adopción de medidas preventivas que disminuyan el impacto sobre las poblaciones sensibles.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

- Caracterización de la identificación de *Vibrio spp* en camarón de río (*Cryphiops caementarius*).

### 4.2. Objetivo específico

- Aislar e identificar *Vibrio spp* a partir de muestras de camarón de río.
- Cuantificar y diferenciar las especies de *Vibrio spp* por su capacidad de fermentar sacarosa en las muestras evaluadas.

## V. ANTECEDENTES

### 5.1 FAMILIA VIBRIONACEAE

La familia Vibrionacea fue propuesta originariamente por Verón en 1965, incluye 7 géneros correspondientes como *Vibrio*, *Photobacterium*, *Allomonas*, *Listonella*, *Enhydrobacter*, *Salinivibrio* y *Enterovibrio*, de las cuales el género *Vibrio* posee el mayor número de especies, 47, de las cuales 11 son reportables patógenas para el ser humano (Nair, Faruque y Sack, 2006).

#### 5.1.1 GENERO *VIBRIO* spp

El género *Vibrio* spp son bacterias Gram negativas, no entéricas, fermentadores, con forma recta o curvada, anaerobios facultativos, catalasas positivos y móviles por un flagelo polar, fermentan glucosa con producción de ácido y oxidasa positivo en la mayoría de especies (Koneman, 2006). El óptimo requerimiento de NaCl para su crecimiento de *Vibrios* spp. es de 2 - 2.5 % (peso total / volumen), aunque algunos requieren de otros iones, especialmente magnesio y potasio. Los medios selectivos para vibrios incorporan sales biliares, teepol, telurito y polimixina B y E (colistina) (Gómez-Gil y Roque, 2006).

Son habituales en ambientes marinos, sin embargo, pueden estar presentes en agua dulce, así como el tracto digestivo de personas y animales. Generalmente los animales suelen adquirir este microorganismo a través de alimentos contaminados o heridas (Vadillo, Piriz y Mateos, 2003). Adicionalmente algunos se presentan adheridos al plancton, moluscos u otras superficies en el ambiente acuático (Nair, Faruque y Sack, 2006). Las diferentes especies involucradas en la infección al ser humano pueden generar enfermedades tanto intestinales como extraintestinales (Nair, Faruque y Sack, 2006) (Cuadro 1),

considerándose tres especies de mayor reporte en afectar al ser humano que son *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (CDC, 2017). *V. cholerae* es la especie de mayor interés histórico como contemporáneo, dado que genera una severa infección entérica que ha sido un azote para la humanidad durante siglos (Koneman, 2006), resurgiendo en América del sur en Haití en el 2010 (Maguiña *et al.*, 2010). *V. parahaemolyticus*, distribuido mundialmente tanto en aguas saladas como dulces, es asociado a diarreas por consumo de alimento marino contaminado (Koneman, 2006). Esta bacteria es el mayor causante de infección en consumidores del continente asiático, incluyendo Japón e India (Jahangir *et al.*, 2002; Raghunath *et al.*, 2008). Los cuadros clínicos más significativos se asocian a tres síndromes que son gastroenteritis, infección por herida y septicemia, siendo el más común la gastroenteritis con síntomas que incluyen diarrea con dolor abdominal, náusea, vómitos, dolor de cabeza y fiebre (Honda y Lida, 1993). Finalmente, *V. vulnificus* causa mortalidad a los consumidores de productos hidrobiológicos, principalmente ostras, en los Estados Unidos (CDC, 2017).

Cuadro 1. Especies de *Vibrio* de importancia clínica en el ser humano.

Especie	Hábitat natural	Infección	Síndromes clínicos
<i>V. alginolyticus</i>	Medio ambiente marino.	Exposición de la piel traumatizada con agua salada o animales infectados.	Infección de tejidos blandos, papel etiológico en infecciones de heridas y óticas.
<i>V. damsela</i>	Medio ambiente marino.	Exposición de la piel lesionada o de heridas traumáticas con animales marinos infectados o agua marina contaminada.	Asociado a infecciones de heridas en humanos.

<i>V. fluvialis</i>	Todo el mundo. Endémico en USA, costa del Golfo, Nueva York y estuarios de la costa noroccidental del Pacífico.	Ingestión o contacto con agua contaminada.	Gastroenteritis y síndrome diarreico similar al cólera: diarrea acuosa, vómitos, deshidratación.
<i>V. furnissi</i>	Endémico en las aguas marinas y estuarios de Asia.	Ingestión o contacto con agua contaminada.	Aislado en pacientes con diarrea y gastroenteritis. Afecta más a turistas que regresan de Asia.
<i>V. hollisae</i>	Medio ambiente marino en la costa del golfo y los estados de la bahía de Chesapeake	Consumo de mariscos crudos.	Aislado en pacientes con diarrea y gastroenteritis.
<i>V. metschnikovii</i>	En todo el mundo, en aguas dulces y marinas salobres, ríos, agua de desecho; también en camarones, cangrejos y langostas.	Exposición o ingestión de agua o animales contaminados.	Asociado a septicemia, infección urinaria, heridas y peritonitis.
<i>V. mimicus</i>	Aguas costeras ostras y camarones.	Ingestión de mariscos mal cocidos (sobre todo ostras).	Síndrome diarreico e infección óticas del nadador.

Fuente: Koneman, 2006



## 5.2 PANDEMIA DE LOS VIBRIOS

A partir del año 1817, hasta la actualidad, se registraron siete pandemias de cólera que causaron gran mortalidad, siendo el primer país afectado la India, lugar donde se extendió luego a otros países del continente asiático como Tailandia, Malasia, Singapur, Indonesia, Filipinas, China y Japón (Salinas, 1992). Su aparición coincidió con circunstancias meteorológicas anormales que acontecían en la India como lluvias copiosas, pérdidas de cosechas, clima extremadamente seco y caliente (Tovar y Bustamante, 2000). La segunda pandemia dio inicio en el año 1829, de la cual se considera dos posibilidades: resurgimiento del cólera en Astrakhan, como el recrudecimiento de la pandemia anterior, y la otra posibilidad es que dio origen en China en 1826 para internarse luego en Mongolia y desde allí su extensión a Moscú. En 1831, esta pandemia ya se había extendido a diversos países de Europa. En 1832, el cólera hace su primera aparición en el continente americano, en Canadá y en Estados Unidos desde donde se extendió a la costa oeste del pacífico, involucrando posteriormente a la república mexicana, Centroamérica (Cuba, Guatemala y Nicaragua) (Jiménez-Corona *et al.*, 1995). La tercera pandemia tuvo su origen nuevamente en la India en 1852, diseminándose a Persia y Mesopotamia llegando a países de Norte América (Tovar y Bustamante, 2000). La cuarta pandemia, en 1863, fue llevada a Arabia por peregrinos de la India y Malasia, extendiéndose a Europa siendo los más afectados los países escandinavos, Alemania, Prusia, Holanda, Bélgica, Inglaterra, Irlanda y Escocia. En 1868 hace su aparición en América afectando principalmente a tropas militares de Paraguay que estuvo en guerra contra la triple alianza (Brasil, Argentina y Uruguay). Siendo el país argentino en transmitirlo a Bolivia y Perú (Tovar y Bustamante, 2000). La quinta pandemia se inicia en 1881 y finaliza en 1896, causando menos estragos que sus predecesoras, afectando en Sudamérica a países como Uruguay, Brasil y Argentina (Tovar y Bustamante, 2000). La sexta epidemia ocurrió en 1899 y fue hallada en todos los continentes. Ambas pandemias provenían de un mismo país de origen que fue la India (Tovar y Bustamante, 2000). La séptima pandemia dio lugar en 1961 en Indonesia, extendiéndose al subcontinente Indico y al Oriente Medio, lo que llevó al uso obligatorio de cloranfenicol en viajeros

procedentes de países endémicos de la enfermedad (Delgado *et al.*, 2010). Sin embargo, el cólera avanzó al occidente y en 1991 la epidemia llegó a América Latina, siendo el primer caso registrado en Perú en enero como el inicio de la primera pandemia en el continente sudamericano, la cual afectó hasta 20 mil personas por semana a pesar de la intensa vigilancia sobre el padecimiento. El cólera llegó a afectar al Ecuador y Colombia en marzo de ese mismo año, el mes siguiente afectó a Brasil, Bolivia, Guatemala, Panamá, Honduras, Nicaragua y México. A finales de año se reportó casi un millón de casos de cólera en Latinoamérica, a excepción de Uruguay y el Caribe (Delgado *et al.*, 2010).

Otro microorganismo patogénico de la misma especie es *V. parahaemolyticus*, descubierto en 1950 después del brote por consumo de alimento contaminado en Japón, donde afectó a 272 personas. Hasta 1995 era asociado a infecciones esporádicas o brotes localizados en épocas de verano (Yeung y Boor, 2004), posterior a ese año ocurrió un aumento inexplicable en la incidencia de la bacteria en los pacientes hospitalizados en Calcuta, India, causando el 80% de los casos de gastroenteritis en pacientes hospitalizados, determinándose un nuevo serotipo conocido como O3:K6 (Okuda *et al.*, 1997) obteniendo una rápida sucesión en Taiwán, Laos, Japón, Tailandia y Corea. Luego fueron reportados brotes asociados a alimentos y casos esporádicos en el continente asiático, Rusia, Estados Unidos y Chile (Matsumoto *et al.*, 2000).

Posteriormente, fueron hallados otros serotipos que presentan las mismas características genéticas, siendo denominados en conjunto como “grupo pandémico” (Gonzales-Escalona *et al.*, 2005), de los cuales 71 aislados de *V. parahaemolyticus*, con serotipo O: K, correspondieron 28.2 % al grupo pandémico (Chowdhury *et al.*, 2004). Adicionalmente, en el verano del mismo año en Israel se observaron infecciones sistémicas causadas por *V. vulnificus* en trabajadores de un mercado de pescados y consumidores, determinándose mediante análisis molecular que es un patógeno resultado de la hibridación de los genomas de distintas poblaciones independientes que son patógenas como no infecciosas (Bisharat y Raz, 1996; Bisharat *et al.*, 2005).

## 5.3 SITUACIÓN EN EL MUNDO

En el año 2015, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, 42 países reportaron un total de 172 454 casos de cólera de los cuales 1304 fueron mortales, estando en el continente africano y asiático el mayor número de casos (Figura 1). También fue determinando que los países más susceptibles fueron Afganistán, República democrática de Congo, Haití, Kenia y Republica Unida de Tanzania que juntos suman el 80 % de casos (Figura 2).

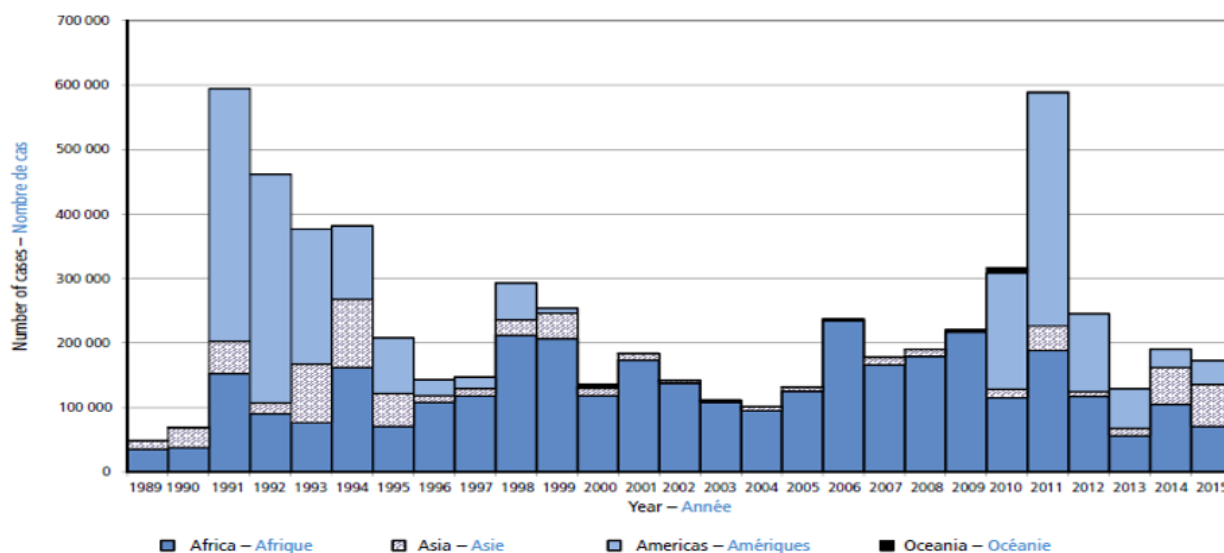


Fig. 1. Número de casos de cólera reportados por continente.

Fuente: Organización Mundial de la salud, 2015.

Los factores ambientales claves en la epidemiología del cólera son los cambios en la temperatura del agua y descargas de nutrientes terrestres, que generan la proliferación de fitoplancton y zooplancton, favoreciendo la multiplicación de *V. cholerae*. Adicionalmente, su incremento también es sustancial durante periodos de inundación ya que estas contribuyen a las epidemias del cólera (Jutla *et al.*, 2011; Pascual *et al.*, 2000; Colwell, 1996). Por ejemplo, el terremoto que diezmo a Haití en junio del 2010, una vez transcurrido el fenómeno natural llegó a generar susceptibilidad en su población ante infecciones gastroentéricas, manifestándose en sus inicios brotes esporádicos que posteriormente iban

aumentando por la cual se obtuvo un registro final de 7159 casos asociados a *V. cholerae*, de las cuales 161 personas habrían fallecido por dicha enfermedad (Walton *et al.*, 2011).

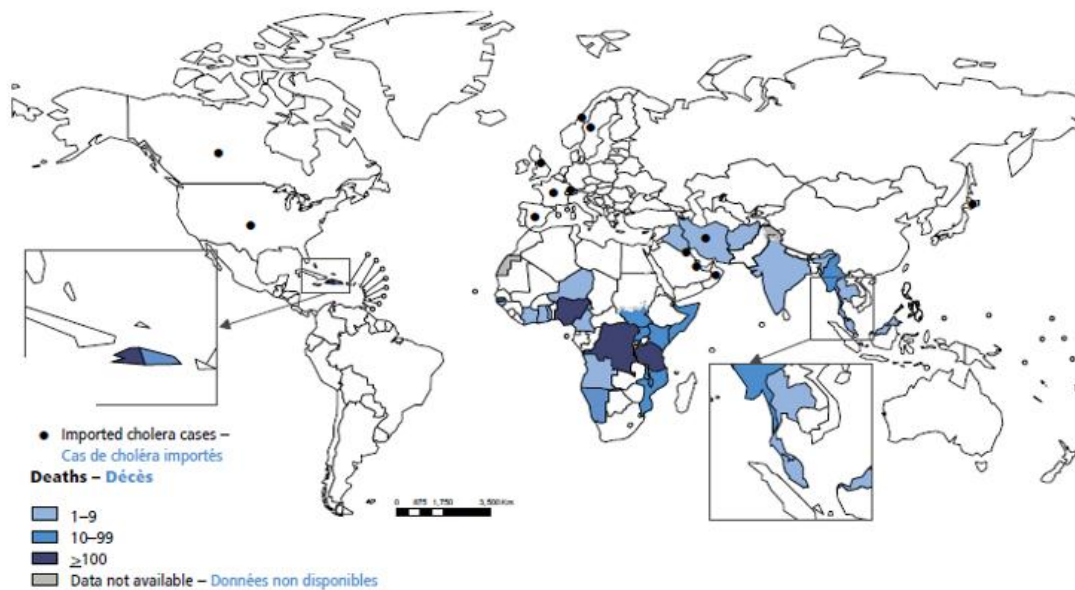


Fig. 2. Reporte de casos de mortalidad por cólera en el 2015.

Fuente: Organización Mundial de la salud, 2015.

Las infecciones causadas por *V. parahaemolyticus* a nivel mundial han aumentado considerablemente, siendo este patógeno asociado al consumo de mariscos pocos cocidos o crudos siendo la principal causa de gastroenteritis en los Estados Unidos y en el continente asiático (Mead *et al.*, 1999). En la India se aisló un total de 178 cepas de *V. parahaemolyticus* durante el periodo 2001-2012 desde 13, 607 pacientes con diarrea aguda y se determinó una frecuencia de cepas pandémicas en 68% de los casos, siendo estas confirmadas por el PCR del grupo específico (GS-PCR) (Pazhani *et al.*, 2014). En los estudios de Kanungo *et al* (2012) se determinó que la incidencia de *V. parahaemolyticus* es baja en comparación al cólera, siendo este más frecuente en grupos de personas que son más jóvenes. Asimismo, se determinó que existe una relación con los síntomas clínicos indicando que el dolor abdominal es más común en *V. parahaemolyticus* y la deshidratación severa en el cólera. En el aspecto sociodemográfico, aquellas personas que viven en hogares que no emplean agua hervida o filtrada presenta mayor riesgo de diarrea por *V.*

*parahaemolyticus*. Por otro lado, el grupo de personas que presentan un nivel socioeconómico más bajo se asocian al cólera.

Con respecto a Europa, de acuerdo al Comité científico de medidas veterinarias relacionadas con la salud pública de la comisión europea en el año 2001 concluyó que tanto los brotes de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* son de muy baja prevalencia ya que son raramente notificados, siendo el riesgo de infección mínima para el consumidor. Sin embargo, en las investigaciones de Robert-Pillot *et al* (2004) se indica que el consumo de camarones importados del Asia causó afección de 44 personas en Francia el año 1997, asimismo en 1999 hubo un brote en Galicia, España reportando 64 casos por consumo de ostras crudas (Martínez- Urtaza *et al.*, 2005).

### **5.3.1 SITUACIÓN SANITARIA EN EL PERÚ**

La enfermedad del cólera ha producido ya siete pandemias mundiales desde 1817 (Gil *et al.*, 2007). La segunda, cuarta y séptima llegaron alcanzar al Perú en 1832, 1869 y 1991 respectivamente (Gil *et al.*, 2007), siendo esta última la más grave donde se identificó al serotipo "Inaba" de *V. cholerae*, que hizo su aparición en la ciudad de Huacho (Lima), la cual se extendió tan rápidamente que terminó comprometiendo a distintos departamentos en las tres regiones del país (Brandling-Bennett, Libel y Migliónico, 1994). Las razones de su aparición fueron las condiciones insalubres imperantes tanto en el alimento crudo como el agua, ya que esta misma era empleada para la bebida, preparación de comidas, lavado de ropa y baño (Glass, Libel, y Brandling-Bennett, 1992). Como resultado final terminó afectando a alrededor de 322 562 peruanos de los cuales fallecieron 2 909 personas (Maguiña *et al.*, 2010). Adicionalmente, en el aspecto económico, el país sufrió un importante giro negativo ya que las naciones destino de su comercio impusieron severas restricciones a las exportaciones peruanas (Maguiña *et al.*, 2010).

Por otro lado, *V. parahaemolyticus*, caracterizado por aparecer durante la época de verano, donde las temperaturas ambientales son más altas, tuvo un cambio drástico en este patrón a partir de 1997 cuando en el invierno austral fue detectado el clon pandémico asiático de *V. parahaemolyticus* causando gran número de infecciones a lo largo de la

costa del Perú (Figuras 3 y 4). El surgimiento de *V. cólera* en 1991 y *V. parahaemolyticus* en 1997 fue una evidencia concurrente de la llegada de aguas cálidas producto del fenómeno El Niño (Martínez- Urtaza *et al.*, 2008).

Reportes de los casos atendidos en hospitales de nuestro país informan del aislamiento de cepas del grupo pandémico en pacientes >30 años (63%, n=46) y cepas no pandémicas (39.5%, n= 43), siendo más frecuentes en Lima los casos de gastroenteritis asociadas a las primeras (66%, n= 50), mientras los casos no pandémicos tuvieron mayor incidencia en Trujillo (70%, n=50) (Gil *et al.*, 2007).

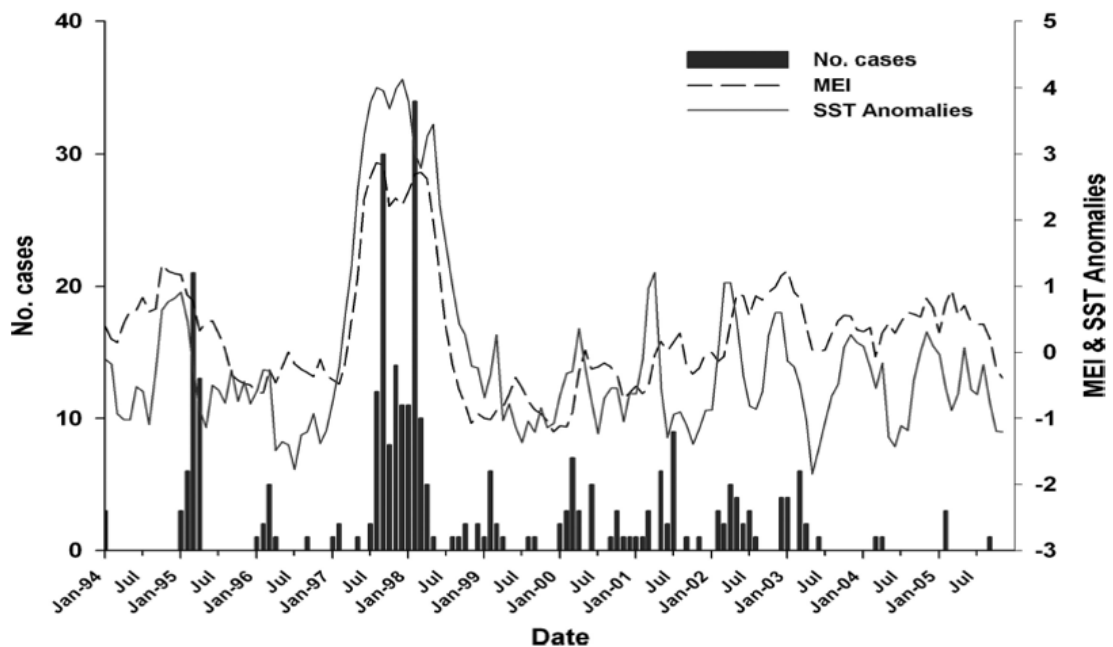


Fig. 3. Número de casos reportados de *V. parahaemolyticus* por mes en el Perú entre 1994 y 2005.

Fuente: Martínez- Urtaza *et al.*, 2008

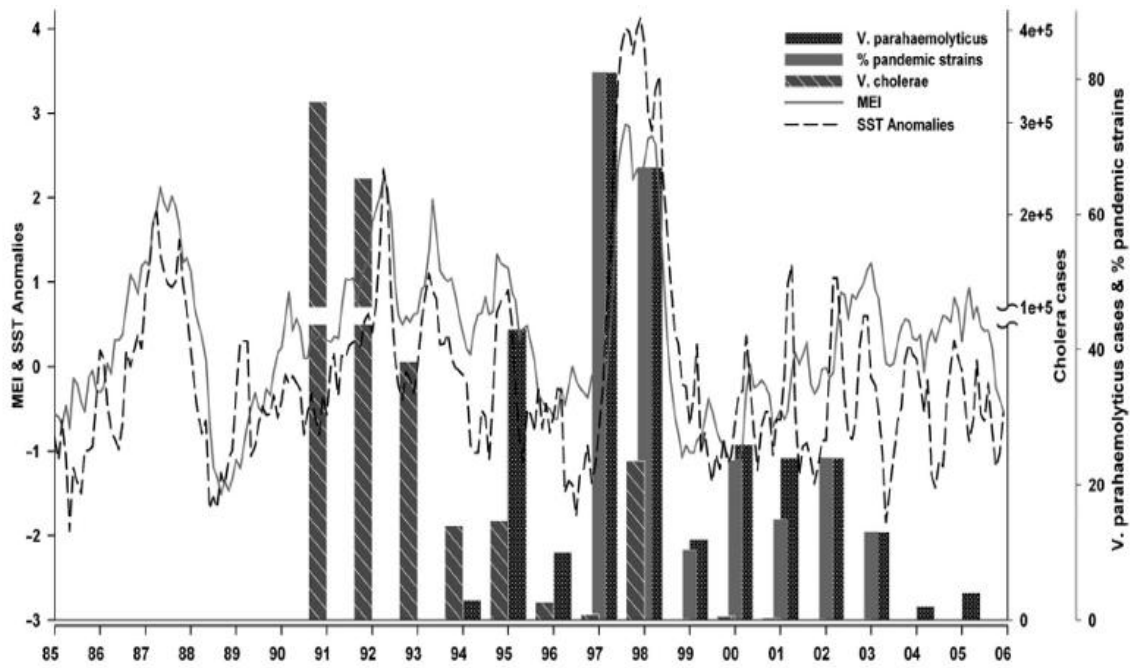


Fig. 4. Número de casos de infección por *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* en Perú entre los años de 1991 y 1997. Fuente: Martínez- Urtaza *et al.*, 2008

## 5.4 ALIMENTOS IMPLICADOS

*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. fluvialis* fueron las especies más comunes de hallar en ostras de origen marino (*Crassostrea gigas*) (93.8%, 68.8% y 68.8% respectivamente) y en moluscos de agua dulce (*Corbicula fluminea*) (85.7%, 92.9% y 65%), mientras que *V. alginoliticus* y *V. parahaemolyticus* fueron los más prevalentes en camarones (*Penaeus sp*) (70.2% para ambas bacterias) (Wong, Ting y Shieh, 1992). Respecto a recursos de agua dulce, Mishra *et al* (2010), aislaron, como parte de la microbiota intestinal, *V. fluvialis* en la carpa (*Ciprinus carpio*) y *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*, en dos especies de camarones de agua dulce (*Macrobrachium rosenbergii* y *M. malcomsoni*). Adicionalmente, en una investigación realizada en 150 peces de agua dulce, que incluían al pez gato (*Pangasius hypophthalmus*) y la tilapia roja (*Oreochromis sp*), procedentes de hipermercados en Malasia, se determinó una prevalencia de 98.76% para *Vibrio spp* y 24% para *V. parahaemolyticus*, a una densidad de 0 a  $1.1 \times 10^7$  MPN/g (Noorlis *et al.*, 2011). En el caso de camarones (n=770),

provenientes de centros de cultivos en la costa sur de Irán, se determinó una prevalencia de 2.1% de *Vibrio*, identificándose *V. parahaemolyticus*, *V. damsela*, *V. alginoliticus* y *V. fluvialis*, considerándose las tres últimas especies como indígenas del camarón así como del medio marino (Hosseini *et al.*, 2004).

Interesantemente, Yano *et al* (2006) hallaron, en un mercado del sur de China, *V. parahaemolyticus* en el cangrejo (*Eriocheir sinensis*), invertebrado diádromo que habita en agua dulce, pero que migra al mar para su reproducción y desove. Estos autores, en el mismo estudio, obtuvieron resultados negativos al intentar aislar *Vibrio* spp desde el lugar de procedencia, presumiendo que la presencia de esta bacteria se pueda deber a contaminación cruzada del alimento en el mercado (Yano *et al*, 2006). Asimismo, en el estudio de Dalsgaard y HØI (1997), se investigó la prevalencia de *V. vulnificus* en camarones congelados provenientes de zonas tropicales, detectando 7% del total de las 46 muestras evaluadas, mientras que en productos cocidos no se recuperó ningún tipo de *Vibrio* en los 61 productos analizados, sugiriendo que ninguna contaminación cruzada se produjo después de la cocción adecuada de estos productos. Finalmente, en la investigación de Aliaga, Miranda y Zeballos (2010), se aisló *Vibrio parahaemolyticus* (5.9%, n=254) en pescados y moluscos bivalvos en el mercado de Ventanilla, Callao, hallándose con más frecuencia en *Odontesthes regia regia* (pejerrey), *Aulacomya ater* (Choro) y *Argopecten purpuratus* (Concha de abanico), y solo una cepa del serovar O3:K6 a partir de *Odontesthes regia regia* (pejerrey).



## VI. HIPOTESIS

Los especímenes de camarón de río procedente del lugar de estudio presentan elevada carga de *Vibrio spp* fermentador de sacarosa.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Lugar de ejecución

Terminal pesquero de Villa María del Triunfo ubicado en la Av. Pachacútec, Villa María del Triunfo. Provincia de Lima, departamento Lima.

### 7.2 Tipo y diseño de investigación

El tipo de investigación es descriptiva y el diseño es de un estudio observacional del tipo transversal.

### 7.3 Variables

Tabla 01: Descripción de las variables a investigar.

Variable	Tipo de Variable	Definición	Unidades	Indicadores
Presencia de <i>Vibrios</i> en el mercado de VMT	Cualitativa binomial	Marco que diferencia <i>vibrios</i> fermentadores y no fermentadores de sacarosa en el medio TCBS agar	-Colonia amarilla (fermentador de sacarosa) -Colonia verde (No fermentador de sacarosa)	% de <i>Vibrio spp</i> fermentadora y no fermentadora
Cuantificación de colonias de <i>Vibrio spp</i>	Dependiente	Numero de colonias de <i>Vibrio spp.</i> fermentadora y no fermentadora en el medio TCBS agar	Numero de colonias por cada 25 g de muestreo	Unidad formadora de colonias (ufc)

## VARIABLE INDEPENDIENTE

- Presencia de *Vibrios spp.* en el mercado de Villa María del Triunfo (VMT)

## INDICADORES

- Si hay presencia de colonias amarillas (fermentador de sacarosa).
- Si hay presencia de colonias verdes (No fermentador de sacarosa).
- Presencia de ambas colonias.

## VARIABLE DEPENDIENTE

- Cuantificación de *Vibrio* fermentadora y no fermentadora de sacarosa

## INDICADORES

- Número de colonias por cada 25 g de muestreo

## 7.4 Marco lógico

Objetivo	Indicadores	Fuentes de Verificación	Supuestos
<b>FIN</b>			
<b>Salud pública.</b>	<p>-Control de vibriosis en camarón de río por parte de autoridad competente.</p> <p>-Escaso control de vibriosis en camarón de río por parte de autoridad competente.</p>	<p>Existe capacitación a operadores de mercado pesquero por parte de la autoridad competente.</p>	

<b>Propósito</b>			
<b>Identificar la presencia de vibriosis por cada 25 g de camarón de río en los principales mercados de la región Lima.</b>	-Especie contaminada.  -Especie no contaminada.	Identificación de <i>Vibrio spp</i> por cultivo en agar TCBS.	-Hay buena manipulación de alimento.
<b>Resultados esperados</b>			
<b>R1. Toma de muestras en los principales mercados de la región Lima.</b>	R1.-Recolección de camarón de río en estado fresco.	R1.-Cultivo en agar TCBS.	R1.-Hay presencia de <i>Vibrio</i> en muestras colectadas.
<b>R2. Envío al Laboratorio de las muestras.</b>	R2.-Análisis de cada 25g de muestra.	R2.-Pesaje de la muestra para analizar.	R2.- Disponibilidad de recursos para un rápido análisis de muestras.
<b>R3.-Establecer Base de datos.</b>	R3.-Análisis estadísticos.	R3.- Análisis estadístico descriptivo.	R3.- Creación de cuadros acorde a la relación entre variables.

<p><b>R4.-Establecer presencia de vibriosis por cada muestra analizada.</b></p>	<p>R4.-Alto porcentaje de vibriosis en camarón de río.  -Bajo porcentaje de vibriosis en camarón de río.</p>	<p>R4. -Número de colonias de <i>Vibrio</i> spp por 25 g de camarón de río.</p>	<p>R4.-Existe presencia de vibriosis en camarón de río.</p>
<p><b>R5. Discusión de resultados.</b></p>	<p>R5.- Variables independientes proporcionales a variable dependiente.</p>	<p>R5.- A mayor cantidad de vibrios fermentadores de sacarosa.  -A mayor cantidad de vibrios no fermentadores de sacarosa.</p>	<p>R5.- Existe presencia de vibriosis en camarón de río.</p>
<p><b>R6. Informe de los Jurados.</b></p>	<p>R6.-Informe emitido por los jurados.</p>	<p>R6.-Revisión estructural de la tesis.</p>	<p>R6.-Aprobación de la tesis.</p>
<p><b>R7. Sustentación.</b></p>	<p>R7.-Exposición del trabajo culminado ante los jurados.</p>	<p>R7.- Preguntas emitidas por los jurados.</p>	<p>R7.- Exposición satisfactoria.</p>
<p><b>R8.-Impresión de la tesis.</b></p>	<p>R8.-Impresión del trabajo culminado.</p>	<p>R8.- Trabajo de tesis impreso.</p>	<p>R8.- Trabajo de tesis archivado en la biblioteca de la Universidad Ricardo Palma.</p>

## 7.5 Muestreo

La población de estudio estará conformada por camarones de río (*Cryphiops caementarius*) procedente del terminal pesquero Villa María del Triunfo.

El tamaño muestral se fundamenta bajo una prevalencia mínima esperada de 20 % que corresponde a un total de 15 muestras. La “muestra” será definida como la mezcla y homogenización de 3 animales de los cuales se analizará 25 g.

## 7.6 Procedimientos y análisis de datos

- **Enriquecimiento, aislamiento e identificación de *Vibrio***

El método a emplear será realizado de acuerdo al Food and Drug Administration (2004). Se requerirá 25 g de la muestra entera de estudio para ser homogenizada en agua peptonada alcalina en una licuadora durante 2 minutos y se incubará a 35°C por seis u ocho horas. Luego se inocularán las muestras en el agar Thiosulfate citrate bile salts sucrosa (TCBS) a 35°C por 18 a 24 horas. Las colonias que presenten tanto el color amarillo y verde, y que a la coloración Gram se muestren como bacilos Gram negativos serán repicadas luego en agar TSA con 2% de CINA e incubadas a 35°C. La identificación presuntiva se realizará mediante las pruebas de la catalasa (+) y oxidasa (+), mientras que la identificación definitiva a nivel de especie será llevada a cabo empleando pruebas bioquímicas convencionales (agar LÍA, Kligler, Citrato y SIM) y prueba de crecimiento halófilo en agar nutritivo con CINA al 0%,1%,6% y 9%.

- **Análisis de datos**

El análisis de las muestras obtenidas será de tipo descriptivo empleando el método de máxima prevalencia esperada de acuerdo a Martin, Meek y Willeberg (1987)

$$x = \left(1 - \left(1 - NC\right)^{\frac{1}{4}}\right) \cdot \left(N - \frac{d - 1}{2}\right)$$

Donde:

n= tamaño de la muestra requerida

N= Tamaño de población

d= número de individuos esperados en la población

NC=Nivel de confianza como proporción

## VIII. RESULTADOS

En las quince muestras analizadas se identificó bacilos Gram negativos, catalasa y oxidados positivos que en las pruebas bioquímicas fueron identificados como pertenecientes al género *Vibrio*. Adicionalmente, en el medio TCBS, se identificó *Vibrio* spp fermentador de sacarosa en el 100 % de muestras y *Vibrio* spp no fermentadores de sacarosa en apenas el 20%, considerado como bajo (fotos 1 y 2). La cuantificación de los primeros varió entre  $4 \times 10^3$  y  $60 \times 10^6$  UFC/g, mientras entre los *Vibrio* no fermentadores varió entre 0 y  $32 \times 10^3$  UFC/g (cuadro 1).

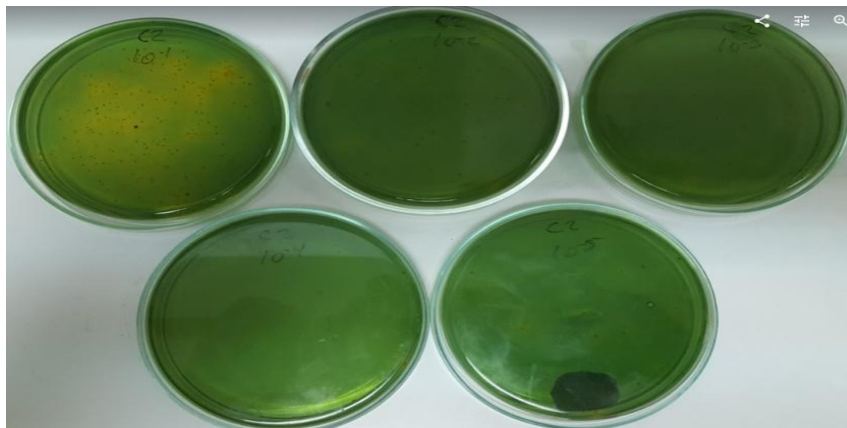


Figura 5. Recuento de colonias de *Vibrio* spp en 5 diluciones seriadas en agar TCBS.

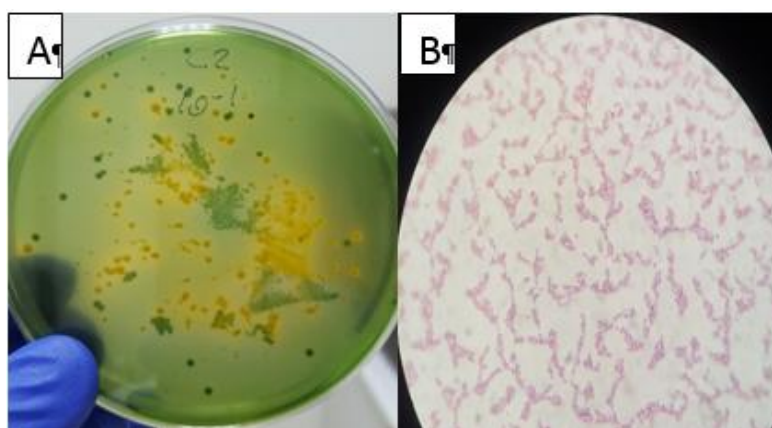


Figura 6. Presencia de colonias fermentadoras de sacarosa (color amarillo) y no fermentadoras a sacarosa (color verde) B. Tinción Gram de las colonias vistas en el medio de cultivo siendo Gram negativas.



Cuadro 2. Cuantificación de *Vibrio* spp fermentadores de sacarosa y no fermentadores de sacarosa mediante la unidad formadora de colonia (UFC)

# de muestra	Conteo total <i>Vibrio</i> UFC/g	Log	Fermentación de sacarosa			
			Positiva (UFC/g)	Log	Negativa (UFC/g)	Log
1	28 x 10 <sup>3</sup>	4.4	28 x 10 <sup>3</sup>	4.4	0	0
2	32 x 10 <sup>5</sup>	6.5	32 x 10 <sup>5</sup>	6.5	0	0
3	75 x 10 <sup>5</sup>	6.9	75 x 10 <sup>5</sup>	6.9	0	0
4	40 x 10 <sup>6</sup>	7.6	40 x 10 <sup>6</sup>	7.6	0	0
5	60 x 10 <sup>6</sup>	7.8	60 x 10 <sup>6</sup>	7.8	0	0
6	41 x 10 <sup>6</sup>	7.6	41 x 10 <sup>6</sup>	7.6	16 x 10 <sup>3</sup>	4.2
7	14 x 10 <sup>5</sup>	6.1	14 x 10 <sup>5</sup>	6.1	0	0
8	13 x 10 <sup>3</sup>	6.1	13 x 10 <sup>3</sup>	4.1	0	0
9	25 x 10 <sup>4</sup>	5.4	25 x 10 <sup>4</sup>	5.4	67 x 10 <sup>2</sup>	3.8
10	45 x 10 <sup>3</sup>	4.7	45 x 10 <sup>3</sup>	4.7	0	0
11	24 x 10 <sup>4</sup>	5.4	24 x 10 <sup>4</sup>	5.4	0	0
12	25 x 10 <sup>3</sup>	4.4	25 x 10 <sup>3</sup>	4.4	0	0
13	49 x 10 <sup>3</sup>	4.7	49 x 10 <sup>3</sup>	4.7	0	0
14	36 x 10 <sup>3</sup>	4.6	4 x 10 <sup>3</sup>	3.6	32 x 10 <sup>3</sup>	4.5
15	13 x 10 <sup>3</sup>	4.1	13 x 10 <sup>3</sup>	4.1	0	0

Cuadro 3. Cuantificación promedio del total número de muestras de *Vibrio* spp mediante la unidad formadora de colonia (UFC)

Conteo promedio <i>Vibrio</i> UFC/g	Log	Fermentación de sacarosa			
		Positiva (UFC/g)	Log	Negativa (UFC/g)	Log
10 x 10 <sup>6</sup>	7	10 x 10 <sup>6</sup>	7	18 x 10 <sup>3</sup>	4.3

## IX. DISCUSIÓN

*Vibrio* spp es un género de microorganismos halófilos, Gram negativos, autóctonos de ambientes marinos y estuarios, los cuales incluyen diversas especies patógenas que afectan al ser humano ya sea por consumo de alimento, agua contaminada o mediante lesiones cutáneas (a través de cortes o abrasiones) que tengan contacto con el ambiente acuático. Entre los principales factores que permiten la óptima modulación de nivel poblacional de *vibrios* se considera a la temperatura como el más importante siendo favorecido durante los meses de verano, mientras que a temperaturas inferiores a 10°C muchos de ellos pueden desaparecer, pudiendo persistir, sin embargo, en los sedimentos y reaparecer cuando encuentren condiciones favorables nuevamente (Tantillo *et al.*, 2004). Asimismo, otro factor es la salinidad, llegando en algunas especies el requerimiento a 0.6 % de ClNa, como en el caso de los *vibrios* no fermentadores de sacarosa, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Janda y Bryant, 1987). Adicionalmente, existen investigaciones que reportan alta prevalencia de esta bacteria halófila en recursos provenientes de agua dulce, indicando un riesgo potencial de causar infección en los seres humanos (Noorlis *et al.*, 2011). A pesar que el agua dulce posee una baja concentración de sales en comparación al mar (3.5 % de ClNa), pueden hallarse bacterias halófilas que puedan distribuirse de manera limitada y manifestarse de forma esporádica como en el caso de *V. parahaemolyticus*, bacteria sacarosa negativa cuya presencia puede asociarse a productos hidrobiológicos por la misma biología de la especie o por una contaminación cruzada al llegar al stock de comercialización (Sarkar *et al.*, 1985; Yano *et al.*, 2006). Siendo así, nuestros resultados en el camarón de río muestran que la presencia de *vibrios* no fermentadores de sacarosa fue muy baja (20%), por lo cual su presencia puede atribuirse a los factores mencionados anteriormente, añadiendo que como es una especie diádromo, puede contaminarse al migrar al mar para completar su etapa reproductiva.

La deficiencia de nutrientes en el ecosistema natural es un factor de estrés común, siendo el sodio uno de los iones que permite estimular el crecimiento y un requisito absoluto para la mayoría de las especies de *Vibrio* spp. Sin embargo,

algunos *Vibrio* patógenos como *V. vulnificus* y *V. cholerae* pueden mantenerse en un estado viable, pero no cultivable, cuando se exponen a un nivel reducido de este ion (Tantillo *et al.*, 2004). Asimismo, su capacidad halófila permite reflejar la diferente habilidad de cada especie para mantenerse viable en ambientes acuáticos con diversas concentraciones de sales (Oliver, Warner y Cleland, 1983). Es así que las especies sacarosa positivas como *V. cholerae*, *V. alginolyticus* y *V. metschnikovii* puede hallarse en agua dulce (Tantillo *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2006).

En todas las muestras evaluadas se confirmó la presencia de *Vibrio* fermentadores positivos y/o negativos de sacarosa con una media de  $10 \times 10^6$  UFC/g, reflejando una alta densidad de carga que puede incluir la presencia de *vibrio* patógenos. En concordancia con nuestros resultados, Noorlis *et al* (2011) obtuvieron una prevalencia de 98.76% para *Vibrio spp* con una densidad de 0 a  $1.1 \times 10^7$  *Vibrio spp* /g, empleando el método de conteo de número más probable (NMP), de los cuales el 24 % correspondió a *V. parahaemolyticus*. Asimismo, Yano (2006) identificó, en la microbiota de los camarones *Macrobrachium rosenbergii* y *M. malcomsoni*, la presencia de *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*. Por otro lado, el recuento de colonias en placa en ostras muestra que la presencia de *vibrio* es variable, variando entre 25 a  $59 \times 10^6$  UFC/g debido principalmente a las condiciones climáticas que influyen el número de *Vibrio spp* contable (dos Fernandes Vieira *et al.*, 2010; De Oliveira Barros *et al.*, 2013). Cabe añadir que las regulaciones de la autoridad sanitaria nacional peruana no definen un número límite de *Vibrio spp* que restringe el consumo del producto, siendo una de las consecuencias de esta ausencia en las regulaciones, la dificultad que resulta durante el monitoreo y desarrollo de indicadores para *Vibrio spp*, ya que es ubicuo en el agua y comparte características fisiológicas con las bacterias entéricas humanas (Dos Fernandes Vieira *et al.*, 2010).

Dentro de todas las especies del género *Vibrio*, la que presenta mayor capacidad de adaptación a los distintos ambientes acuáticos es *Vibrio cholerae*, microorganismo capaz de adherirse a la quitina de las especies que coloniza, la que emplea como nutriente, siendo este el polímero más abundante en la Tierra, después de la celulosa (Meibom *et al.*, 2004). En ese sentido, la utilización de la quitina por esta bacteria resulta de importancia para la salud humana, como demostrado en la investigación de Castro-Rosas y Escartín (2005), donde se

determinó que esta actividad metabólica contribuye con su resistencia frente a los ácidos que son secretados desde el revestimiento del estómago, es así que, si se tomara agua contaminada o consumiese inapropiadamente un marisco mal cocido, las posibilidades de contraer una infección por cólera son altas. Otro asunto a considerar es su capacidad de formar biopelícula sobre la superficie de quitina, elevando su número a niveles de dosis infectiva (Colwell, 1996). A pesar que en la actualidad no es una enfermedad frecuente en el país, no se debe olvidar que el cólera ya afectó a centenares de personas en los años 90 y que por eso este microorganismo debe ser considerado en la evaluación de los productos alimenticios de origen marino. Además, puede mantenerse viable en el medio acuático durante largos periodos de tiempo, pese a no contar con las condiciones necesarias para su multiplicación y reaparecer en condiciones más favorables, como durante los fenómenos naturales ocurridos recientemente en Haití.

Otro *Vibrio* de importancia médica corresponde a *V. alginolyticus*, que generalmente afecta a aquellas personas que han tenido algún contacto directo con el agua de mar o en la manipulación de moluscos bivalvos, causando infección sobre alguna herida u otitis, sin embargo, las causas de infección entérica suelen ser muy esporádicas afectando a personas inmunocomprometidas (Uh *et al.*, 2001; Caccamese y Rastegar, 1999).

Interesantemente, *V. metschnikovii*, es otra bacteria sacarosa positiva de la cual existe poca evidencia que represente algún peligro para la salud humana, derivado del consumo de mariscos (camarones y cangrejos) en los cuales está presente (Farmer *et al.*, 1988; Ramamurthy y Nair, 2007), el único reporte de aislamiento de la bacteria causante de una colecistitis fue en 1981 (Jean-Jacques *et al.*, 1981). Así, Buck, en 1991, determinó que esta puede ser aislada a partir de distintos productos comercializados en el mercado, incluyendo especies que se consumen crudas (ostras, surimi), semicocidas (almejas, mejillones) y cocidas (pescados y moluscos).

## X. CONCLUSIONES

- Todas las muestras evaluadas fueron positivas para la presencia de *Vibrio* fermentadores de sacarosa
- Existe una baja prevalencia de *Vibrio* no fermentadores de sacarosa en las muestras
- La cuantificación de *Vibrio* sacarosa positivo muestra un número alto.

## XI. RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas moleculares para la determinación de principales *vibrio* patógenos.
- Evaluación de resistencia bacteriana

## XII. REFERENCIAS CITADAS

1. Aliaga, R., Miranda, J., Zevallos, J. (2010). Aislamiento e identificación de *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 en pescados y moluscos bivalvos procedentes de un mercado pesquero de Lima, Perú. *Revista Médica Herediana*, 21(3), 139-145.
2. De Oliveira Barros, L. M., de Sousa, O. V., de Lima, E. A., Macrae, A., Vieira, G. H. F., y dos Fernandes Vieira, R. H. S. (2013). VÍBRIOS SACAROSE NEGATIVOS ISOLADOS DE OSTRAS *Crassostrea rhizophorae* COMERCIALIZADAS EM BARRACAS DE PRAIA NA CIDADE DE FORTALEZA, CEARÁ, BRASIL. *Tropical Journal of Fisheries and Aquatic Sciences (Boletim Técnico Científico do Cepnor)*, 7(1), 9-16.
3. Bisharat, N., Raz, R. (1996). *Vibrio* infection in Israel due to changes in fish marketing. *The Lancet*, 348(9041), 1585-1586.
4. Bisharat, N., Cohen, D. I., Harding, R. M., Falush, D., Crook, D. W., Peto, T., Maiden, M. C. (2005). Hybrid *Vibrio vulnificus*. *Emerging infectious diseases*, 11(1), 30.
5. Branding-Bennet, A.D., Libel, M., Migliónico, A. (1994). El cólera en las américas en 1991. Notas de población.
6. BUCK, J. D. (1991). Recovery of *Vibrio metschnikovii* from market seafood. *Journal of Food safety*, 12(1), 73-78.
7. Caccamese, S. M., Rastegar, D. A. (1999). Chronic diarrhea associated with *Vibrio alginolyticus* in an immunocompromised patient. *Clinical Infectious Diseases*, 29(4), 946-947.
8. Castro-Rosas, J., Escartín, E. F. (2005). Increased tolerance of *Vibrio cholerae* O1 to temperature, pH, or drying associated with colonization of shrimp carapaces. *International Journal of Food Microbiology*, 102(2), 195-201.
9. Chowdhury, N. R., Stine, O. C., Morris, J. G., Nair, G. B. (2004). Assessment of evolution of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* by

- Multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3), 1280-1282.
10. [CDC] Center for disease control and prevention. 2017. *Vibrio species causing vibriosis*. [Internet]. [acceso 01 julio 2017]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/vibrio/faq.html>
  11. Colwell, R. R. (1996). Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science*, 274(5295), 2025-2031.
  12. Dalsgaard, A., HØI, L. (1997). Prevalence and characterization of *Vibrio vulnificus* isolated from shrimp products imported into Denmark. *Journal of Food Protection*, 60(9), 1132-1134.
  13. Delgado, Morales, Mendez, Cravioto. (2010). The re-emergence of Cholera in the Americas. En Ramamurthy, & Bhattacharya, *Epidemiological and Molecular Aspects on Cholera* (págs.79-92). New York: Springer.
  14. Dos Fernandes Vieira, R. H. S., de Sousa, O. V., Costa, R. A., Theophilo, G. N. D., Macrae, A., Fonteles Filho, A. A., dos Prazeres Rodrigues, D. (2010). Raw oysters can be a risk for infections. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 14(1), 66-70.
  15. Farmer, J. J., Hickman-Brenner, F. W., Fanning, G. R., Gordon, C. M., Brenner, D. J. (1988). Characterization of *Vibrio metschnikovii* and *Vibrio gazogenes* by DNA-DNA hybridization and phenotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(10), 1993-2000.
  16. [FDA] Food and drug administration U.S. 2017. Kaysner, Ch y DePaola, A [Internet] [acceso 27 Junio 2017] Disponible en: <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm070830.htm>
  17. Gil, A. I., Lanata, C. F., Miranda, H., Prada, A., Seas, C., Hall, E. R., Nair, G. B. (2007). Gravedad de la gastroenteritis causada por *Vibrio parahaemolyticus* del grupo pandémico en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 24(4), 350-355.
  18. Glass, R. I., Libel, M., Brandling-Bennett, A. D. (1992). Epidemic cholera in the Americas. *Science*, 256(5063), 1524-1526.



19. González-Escalona, N., Cachicas, V., Acevedo, C., Rioseco, M. L., Vergara, J. A., Cabello, F., Espejo, R. T. (2005). *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerging Infectious Diseases*, 11(1), 129.
20. Gomez-Gil y Roque (2006). Isolation, enumeration and preservation. Thompson, Austin y Swings, The biology of *vibrios* (pags. 15-16). Washington: ASM Press.
21. Honda, T., Lida, T. (1993). The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. *Reviews in Medical Microbiology*, 4(2), 106-113.
22. Hosseini, H., Cheraghali, A. M., Yalfani, R., Razavilar, V. (2004). Incidence of *Vibrio* spp. in shrimp caught off the south coast of Iran. *Food control*, 15(3), 187-190.
23. [IMARPE] Instituto del mar del peru. 2013. [Internet] [acceso 2 Julio 2017] Disponible en:  
[http://www.imarpe.gob.pe/imarpe/index.php?id\\_seccion=I0131010202010000000000](http://www.imarpe.gob.pe/imarpe/index.php?id_seccion=I0131010202010000000000)
24. Jahangir Alam, M., Tomochika, K. I., Miyoshi, S. I., Shinoda, S. (2002). Environmental investigation of potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in the Seto-Inland Sea, Japan. *FEMS microbiology letters*, 208(1), 83-87.
25. Janda, J. M., Bryant, R. G. (1987). Pathogenic *Vibrio* spp.: an organism group of increasing medical significance. *Clinical Microbiology Newsletter*, 9(7), 49-53.
26. Jean-Jacques, W., Rajashekaraiyah, K. R., Farmer, J. J., Hickman, F. W., Morris, J. G., y Kallick, C. A. (1981). *Vibrio metschnikovii* bacteremia in a patient with cholecystitis. *Journal of clinical microbiology*, 14(6), 711-712.

27. Jiménez-Corona, A., Gutiérrez-Cogio, L., López-Moreno, S., Tapia-Conyer, R. (1995). El cólera en México Situación epidemiológica actual. *Gaceta Médica de México*, 131(3), 363-366.
28. Jutla, A. S., Akanda, A. S., Griffiths, J. K., Colwell, R., Islam, S. (2011). Warming oceans, phytoplankton, and river discharge: implications for cholera outbreaks. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(2), 303-308.
29. Kanungo, S., Sur, D., Ali, M., You, Y. A., Pal, D., Manna, B., Nair, G. B. (2012). Clinical, epidemiological, and spatial characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea and cholera in the urban slums of Kolkata, India. *BMC public health*, 12(1), 830.
30. Koneman, E. W., Allen, S. (2006). Diagnósticos microbiológico texto y atlas en color. USA: Medica panamericana S.A.
31. Kriem, M. R., Banni, B., El Bouchtaoui, H., Hamama, A., El Marrakchi, A., Chaouqy, N., Y Quilici, M. L. (2015). Prevalence of *Vibrio* spp. in raw shrimps (*Parapenaeus longirostris*) and performance of a chromogenic medium for the isolation of *Vibrio* strains. *Letters in applied microbiology*, 61(3), 224-230.
32. Maguiña Vargas, C., Seas Ramos, C., Galán Rodas, E., Canchanya, S., Jesús, J. (2010). Historia del cólera en el Perú en 1991. *Acta Médica Peruana*, 27(3), 212-217.
33. Martin, S. W., Meek, A. H., Willeberg, P. (1987). *Veterinary epidemiology: principles and methods*. Iowa State University Press, Ames IA.
34. Martínez-Urtaza, J., Simental, L., Velasco, D., DePaola, A., Ishibashi, M., Nakaguchi, Y., Pousa, A. (2005). Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 11(8), 1319.

35. Martínez-Urtaza, J., Huapaya, B., Gavilan, R. G., Blanco-Abad, V., Ansede-Bermejo, J., Cadarso-Suarez, C., Trinanes, J. (2008). Emergence of Asiatic *Vibrio* diseases in South America in phase with El Niño. *Epidemiology*, 19(6), 829-837.
36. Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Rammamurthy, T., Nishibuchi, M. (2000). Pandemic spread of an O3: K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(2), 578-585.
37. Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Tauxe, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging infectious diseases*, 5(5), 607.
38. Meruane, J. A., Morales, M. C., Galleguillos, C. A., Rivera, M. A., y Hosokawa, H. (2006). Experiencias y resultados de investigaciones sobre el camarón de río del norte *Cryphiops caementarius* (Molina 1782)(Decapoda: Palaemonidae): historia natural y cultivo. *Gayana (Concepción)*, 70(2), 280-292.
39. Meibom, K. L., Li, X. B., Nielsen, A. T., Wu, C. Y., Roseman, S., y Schoolnik, G. K. (2004). The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(8), 2524-2529.
40. Miller, W. A., Miller, M. A., Gardner, I. A., Atwill, E. R., Byrne, B. A., Jang, S., Worcester, K. (2006). *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Clostridium perfringens*, and *Plesiomonas shigelloides* in marine and freshwater invertebrates from coastal California ecosystems. *Microbial Ecology*, 52(2), 198-206.
41. Mishra, P., Samanta, M., Mohanty, S., Maiti, N. K. (2010). Characterization of *Vibrio* species isolated from freshwater fishes by ribotyping. *Indian Journal of Microbiology*, 50(1), 101-103.

42. Morales, M. C., Meruane, J. (2013). The northern river shrimp *Cryphiops caementarius* (Decapoda, Palaemonidae), research chronology between 1958 and 2008, II: aquaculture research and development in northern Chile. *Crustaceana*, 86(12), 1452-1467.
43. Nair, Faruque y Sack (2006). Vibrios. Y. Motarjemi y M. Adams. Emerging foodborne pathogens (pags 333-334). USA. Woodhead
44. Noorlis, A., Ghazali, F. M., Cheah, Y. K., Tuan Zainazor, T. C., Ponniah, J., Tunung, R., Son, R. (2011). Prevalence and quantification of *Vibrio* species and *Vibrio parahaemolyticus* in freshwater fish at hypermarket level. *International Food Research Journal*, 18(2).
45. Okuda, J., Ishibashi, M. A. S. A. N. O. R. I., Hayakawa, E., Nishino, T., Takeda, Y., Mukhopadhyay, A. K., Nishibuchi, M. (1997). Emergence of a unique O3: K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(12), 3150-3155.
46. Oliver, J. D., Warner, R. A., Cleland, D. R. (1983). Distribution of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting vibrios in the marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(3), 985-998.
47. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* European Commission. 2001
48. Pascual, M., Rodó, X., Ellner, S. P., Colwell, R., Bouma, M. J. (2000). Cholera dynamics and El Nino-southern oscillation. *Science*, 289(5485), 1766-1769.
49. Pazhani, G. P., Bhowmik, S. K., Ghosh, S., Guin, S., Dutta, S., Rajendran, K., Ramamurthy, T. (2014). Trends in the epidemiology of pandemic and non-pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diarrheal patients in Kolkata, India. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(5), e2815.

50. Raghunath, P., Acharya, S., Bhanumathi, A., Karunasagar, I., Karunasagar, I. (2008). Detection and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood harvested along the southwest coast of India. *Food microbiology*, 25(6), 824-830.
51. Ramamurthy, T., Nair, G. B. (2007). Foodborne pathogenic vibrios. In *Foodborne diseases* (pp. 115-156). Humana Press.
52. Robert-Pillot, A., Guénolé, A., Lesne, J., Delesmont, R., Fournier, J. M., Quilici, M. L. (2004). Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. *International Journal of Food Microbiology*, 91(3), 319-325.
53. Salinas, P. J. (1992). Cólera: una revisión actualizada. parte 1. introducción, historia, definición, diagnóstico. *MedULA*, 1(4), 167-171.
54. Sarkar, B. L., Nair, G. B., Banerjee, A. K., Pal, S. C. (1985). Seasonal distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in freshwater environs and in association with freshwater fishes in Calcutta. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(1), 132-136.
55. Tantillo, G. M., Fontanarosa, M., Di Pinto, A., Musti, M. (2004). Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections. *Letters in Applied Microbiology*, 39(2), 117-126.
56. Tovar Guzmán, V., y Bustamante Montes, P. (2000). Historia del cólera en el mundo y México. *Ciencia Ergo Sum*, 7(2).
57. Uh, Y., Park, J. S., Hwang, G. Y., Jang, I. H., Yoon, K. J., Park, H. C., Hwang, S. O. (2001). *Vibrio alginolyticus* acute gastroenteritis: report of two cases. *Clinical Microbiology and Infection*, 7(2), 104-106.
58. Vadillo Machota, S., Piriz Duran, S., Mateos Yanes, E. (2002). *Manual de microbiología veterinaria*. España: McGRAW-HILL

59. Walton, D. A., Ivers, L. C. (2011). Responding to cholera in post-earthquake Haiti. *N Engl J Med*, 2011(364), 3-5.
60. Wong, H. C., Ting, S. H., Shieh, W. R. (1992). Incidence of toxigenic vibrios in foods available in Taiwan. *Journal of Applied Microbiology*, 73(3), 197-202.
61. World Health Organization. Cholera [every year since 2000]. *Wkly Epidemiol Rec*.
62. Yano, Y., Kaneniwa, M., Satomi, M., Oikawa, H., Chen, S. S. (2006). Occurrence and density of *Vibrio parahaemolyticus* in live edible crustaceans from markets in China. *Journal of Food Protection*, 69(11), 2742-2746.
63. Yeung, P. M., Boor, K. J. (2004). Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Foodborne Pathogens & Disease*, 1(2), 74-88.