

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



Aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* y otras especies de vibrios halofílicos patógenos a partir de varios reservorios acuáticos naturales en la zona de la bocana del río Lurín

Tesis para optar por el título profesional de  
Licenciado en Biología

Fernando Huamanchumo Llerena

Director de Tesis: Dr. Tomás Agurto Sáenz

Lima, Perú

2021



**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



Aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* y otras especies de vibrios halofílicos patógenos a partir de varios reservorios acuáticos naturales en la zona de la bocana del río Lurín

Tesis para optar por el título profesional de  
Licenciado en Biología

Fernando Huamanchumo Llerena

Director de Tesis: Dr. Tomás Agurto Sáenz

Lima, Perú

2021

*DEDICATORIA*

*A mi madre, Gladis Llerena Becerra, y a mi padre, Roberto Huamanchumo Huajardo, quienes son mi principal fuente de motivación para cada meta propuesta*

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Tomás Agurto Sáenz, director de tesis, y al Blgo. Jorge Mariazza Rodríguez, asesor externo, por sus consejos y asesorías brindadas para el desarrollo de esta investigación, sin las cuales este trabajo no hubiera podido ser posible.

De igual forma a quienes fueron mis mentores de microbiología durante mi etapa pregrado Dr. Tomás Agurto Sáenz, Blgo. Alcides Guerra Santa Cruz y Mg. Juan Carlos Ramos Gorbeña, con quienes tuve el agrado de adentrarme en el mundo de la Microbiología.

A la Blga. María Luz Zamudio Rojas (INS), por el apoyo para la realización de pruebas moleculares para *Vibrio*.

A mis buenos amigos/as Ángel Morales, Ángel Tito, Carlitos Sánchez, Diego Moses, Claudia Pazce, Diana Rodríguez, Johanna Vargas y Tatiana Martell. Por la dicha de haberlos conocido y haber compartido innumerables anécdotas juntos.

A mis primos Michell Llerena y Piero Gayozzo quienes admiro y considero mis hermanos.

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS Y FLUJOGRAMAS.....	9
ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	12
I. INTRODUCCIÓN.....	13
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
III. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	15
IV. OBJETIVOS.....	15
4.1. Objetivo general.....	15
4.2. Objetivos específicos.....	15
V. MARCO TEÓRICO.....	16
5.1. Género <i>Vibrio</i> .....	16
5.2. <i>Vibrio cholerae</i> .....	16
5.3. El cólera epidémico-pandémico.....	17
5.4. Serogrupo, biotipos y serotipos.....	17
5.5. El colerágeno.....	18
5.6. Cepas viables pero no cultivables.....	19
5.7. Otros vibrios patógenos de interés.....	19
5.7.1. <i>Vibrio vulnificus</i> .....	19
5.7.2. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	20
5.7.3. <i>Vibrio fluvialis</i> .....	20
5.7.4. <i>Vibrio furnissii</i> .....	20
5.8. Hábitat y nicho ecológico de <i>Vibrio cholerae</i> .....	20

5.9.	Reservorios acuáticos naturales de mayor importancia.....	21
5.9.1.	Aves acuáticas.....	21
5.9.2.	Cangrejos.....	22
5.9.3.	Copépodos.....	22
5.9.4.	Moluscos.....	22
5.9.5.	Quironómidos.....	22
5.9.6.	Peces.....	23
5.9.7.	Plancton.....	23
5.10.	Factores ambientales.....	23
VI.	ANTECEDENTES.....	24
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
7.1.	Lugar de ejecución.....	26
7.2.	Sitio de muestreo.....	26
7.3.	Identificación de especies de aves.....	26
7.4.	Recolección de muestras de aves.....	27
7.5.	Recolección de muestras de <i>Ocypode gaudichaudii</i> .....	27
7.6.	Análisis bacteriológico.....	27
7.6.1.	Aislamiento selectivo.....	28
7.6.2.	Identificación bioquímica.....	28
7.6.3.	Pruebas moleculares.....	28
VIII.	RESULTADOS.....	29
IX.	DISCUSIÓN.....	30
X.	CONCLUSIONES.....	33
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
XII.	ANEXOS.....	41

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Caracterización de las especies de <i>Vibrio</i> _____	41
<b>Tabla 2.</b> Cepas de <i>Vibrio</i> a partir de aves acuáticas _____	41
<b>Tabla 3.</b> Propiedades y bioquímica de los aislamientos de <i>V. cholerae</i> en aves acuáticas _____	42
<b>Tabla 4.</b> Propiedades y bioquímica de aislamientos de <i>V. fluvialis</i> en reservorios acuáticos _____	42
<b>Tabla 5.</b> Propiedades y bioquímica de los aislamientos de <i>V. furnissii</i> en aves acuáticas _____	43
<b>Tabla 6.</b> Otras cepas bacterianas (no-Vibrionaceae) aisladas en los diferentes reservorios _____	43
<b>Tabla 7.</b> Propiedades y bioquímica de los aislamientos de <i>Salmonella</i> spp. _____	44
<b>Tabla 8.</b> Propiedades y bioquímica de los aislamientos de <i>C. freundii</i> _____	44
<b>Tabla 9.</b> Propiedades y bioquímica del grupo <i>Proteus-Morganella-Providencia</i> _____	45
<b>Tabla 10.</b> Ornitofauna avistada en el estuario de Lurín _____	45
<b>Tabla 11.</b> Ornitofauna avistada en el río y estuario de Lurín _____	46

## ÍNDICE DE FIGURAS Y FLUJOGRAMAS

<b>Figura 1.</b> Ubicación específica en la bocana del río Lurín_____	26
<b>Figura 2.</b> Dendrograma del índice de similaridad de Jaccard entre cepas aisladas del grupo <i>Proteus-Morganella-Providencia</i> entre cepas estándar de la CDC_____	47
<b>Figura 3.</b> Informe de resultado (INS) de <i>Vibrio cholerae non-O1/non-O139</i> _____	48
<b>Figura 4.</b> Registro fotográfico_____	49
<b>Flujograma 1.</b> Aislamiento e identificación de <i>V. cholerae</i> y vibrios halofílicos a partir de excretas de aves acuáticas y hemolinfa/ tejidos de <i>O. guadichaudii</i> _____	50
<b>Flujograma 2.</b> Identificación bioquímica de <i>V. cholerae</i> y vibrios halofílicos patógenos_____	51

# ABREVIATURAS

**CTA<sub>1</sub>/ARF<sub>6</sub>** – Complejo factor ADP-ribosilación 6 unido a Subunidad A1

**CTX** – Colerotoxina

**ctxA** – Subunidad A de la toxina colérica

**g/l** – Gramos por litro

**GDP** – Guanosina difosfato

**Gm1** – Monosialogangliósido

**Gs  $\alpha$**  – Proteína G estimuladora alfa

**GTP** – Guanosina trifosfato

**kDa** – Kilo Daltons

**km** – Kilómetro

**MADPRT** – mono-ADP-Ribosiltransferasa

**ml.** - Mililitro

**NANasa** – Neuraminidasa

**ompW** – Proteína W de la membrana externa

**pH** – potencial de hidrogenión

**rpoB** – Subunidad beta de la ARN polimerasa

**tdh** – Hemolisina termoestable directa

**toxR** – Activador transcripcional de colerotoxina

**trh** – Hemolisina termostable relacionada

**VNC** – Viable no cultivable

## RESUMEN

Se sabe que las aves acuáticas son importantes indicadoras de salud ambiental para ecosistemas marino-costeros al ser potenciales portadoras de microorganismos patógenos como *Vibrio cholerae* y vibrios halófilos. En este estudio se colectaron 42 muestras de heces evacuadas frescas a partir 8 especies de aves acuáticas, entre migratorias y residentes, en la zona de la bocana del río Lurín. Las muestras se enriquecieron en Agua Peptonada Alcalina (APA) 1%, pH~9 por 24 horas a temperatura ambiente; posteriormente se procedió al aislamiento selectivo de colonias agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS), obteniendo un total de 93 cepas, de las cuales el 7.5% correspondieron a *V. cholerae*, 5.4% a *Vibrio furnissii*, 4.3% a *Vibrio fluvialis* y 5.4% a *Vibrio* spp. De esta manera, se asoció *V. cholerae* a los intestinos de *Haematopus palliatus*, *Leucophaeus atricilla*, *Pelecanus thagus* y *Sula variegata*; *V. furnissii* se asoció a *L. atricilla*; *V. fluvialis* a *H. palliatus* y *L. atricilla*; *Vibrio* spp. a *Charadrius vociferus*, *H. palliatus*, *L. atricilla*, *Leucophaeus modestus* y *Numenius phaeopus*. Asimismo, se realizó la identificación de otros grupos bacterianos, tales como Enterobacteriaceae (incluyendo *Salmonella*, el grupo *Proteus-Morganella-Providencia*, entre otros), cromobacterias y bacterias no fermentadoras. Se registra por primera vez a *H. palliatus* (ave migratoria) y *P. thagus* (ave residente) como reservorios naturales de *Vibrio cholerae* non-O1/ non-O139 no toxigénico, confirmado por PCR de los genes *ompW* y *ctxA*. De igual modo a *Ocyropode gaudichaudii*, como reservorio natural para *V. fluvialis*.

**Palabras clave:** *Vibrio cholerae*, vibrios halófilos, aves acuáticas, *Ocyropode gaudichaudii*, río Lurín.

## ABSTRACT

It is well known that waterfowl are important indicators of environmental health for marine-coastal ecosystems as they are potential carriers of pathogenic microorganisms such as *Vibrio cholerae* and halophilic vibrios. In this study, 42 samples of fresh evacuated feces were collected from 8 species of waterfowl, between migrants and residents, in Lurin river mouth area. The samples were enriched in 1% Alkaline Peptone Water (APW) pH ~ 9 for 24 hours at room temperature; subsequently, selective isolation of Thiosulfate-Citrate-Bile-Salts-Sucrose (TCBS) agar colonies allowed to obtain a total of 93 strains, of which 7.5% corresponded to *V. cholerae*, 5.4% to *Vibrio furnissii*, 4.3% to *Vibrio fluvialis* and 5.4% *Vibrio* spp. In this way, *V. cholerae* was associated to the intestines of *Haematopus palliatus*, *Leucophaeus atricilla*, *Pelecanus thagus* and *Sula variegata*. *V. furnissii* associated to *L. atricilla*; *V. fluvialis* to *H. palliatus* and *L. atricilla*; *Vibrio* spp. to *Charadrius vociferus*, *H. palliatus*, *L. atricilla*, *L. modestus* and *Numenius phaeopus*. Likewise, other bacterial groups were identified, such as Enterobacteriaceae (including *Salmonella*, the *Proteus-Morganella-Providencia* group, among others), chromobacteria and non-fermenting bacterias. *H. palliatus* (migratory bird) and *P. thagus* (resident bird) are registered for the first time as natural reservoirs of non-toxigenic *Vibrio cholerae* non-O1/ non-O139, confirmed by PCR of *ompW* and *ctxA* genes. In the same way to *Ocypode gaudichaudii*, as a natural reservoir for *V. fluvialis*.

**Keywords:** *Vibrio cholerae*, halophilic vibrios waterfowl, *Ocypode gaudichaudii*, Lurin river.

## I. INTRODUCCIÓN

*Vibrio cholerae* es el agente etiológico del cólera, una enfermedad diarreica aguda (EDA) de necesidad mortal si no se restituye con prontitud por vía endovenosa el agua y los electrolitos perdidos a través de los vómitos y la diarrea masiva. Estos síntomas son generalmente producto de la ingesta de agua o alimento de origen marino, crudo o inadecuadamente cocido, contaminado con el bacilo del cólera durante las estaciones de calor especialmente. Los microorganismos causantes de esta EDA superan la acidez gástrica del hospedador, arriban al íleon proximal y logran colonizarlo eficientemente mediante pili para luego evacuar una poderosa enterotoxina, el colerágeno, molécula de aproximadamente 100 000 daltons, capaz de producir severas alteraciones en el equilibrio hidroelectrolítico de los enterocitos, sobreviniendo vómitos y diarreas incesantes que provocan la muerte por coma y fallo renal agudo debido a un cuadro de acidez metabólica (De et al., 1951; Robles et al., 1999; Zhang et al., 1955).

La especie *V. cholerae* posee dos biotipos: El Clásico y El Tor, cada uno de ellos con tres serotipos: Inaba, Ogawa e Hikojima, incluidos en un solo serogrupo: O1, que es el principal responsable de la diarrea epidémico-pandémica vigente en el mundo, y que ha producido siete pandemias hasta nuestros días (Lekshmi et al., 2018). Actualmente vivimos la séptima pandemia de cólera cuyo origen se remonta a 1961, diseminándose desde Sulawesi o Célebes (Indonesia) hasta su manifestación en el Perú en el verano de 1991, provocando más de 4000 defunciones en aquel año. Se signó a Chimbote, Chancay y Piura como epicentros casi simultáneos de la epidemia (Bravo y Guillén, 2011); sin embargo, nunca se ha llegado a saber con exactitud cómo es que *V. cholerae* O1 El Tor Inaba llegó a nuestras costas, especulándose que ingresó vía navegantes enfermos e inclusive a través de vectores, tales como aves acuáticas migratorias (Ogg et al., 1989), por lo que se hace hincapié en designar a las aves silvestres tanto reservorios, como vectores interhemisféricos; es decir, ser capaces de transportar microorganismos con potencial zoonótico hacia ecosistemas no endémicos (Rodríguez et al., 2010).

Han transcurrido casi tres décadas desde que el cólera hizo su ingreso al Perú y el río Lurín se ha convertido literalmente en una cloaca, pues a escasos metros de su desembocadura en el mar, se vierten indiscriminadamente aguas de desecho (Proyecto “MESIAS”), alterando la ecología de esta zona, contaminando gravemente el litoral e introduciendo patógenos que ponen en peligro la salud humana. Otro hecho de interés durante los meses de verano lo constituye el evento “El Niño”, el cual está relacionado directamente con el aumento de las enfermedades diarreicas en la zona costera del Pacífico Sur, viéndose favorecida la proliferación de *V. cholerae* en los ecosistemas acuáticos (Gavilán et al., 2011).

El ecosistema estuarino del río Lurín ha sido desatendido y las investigaciones en torno al cólera han sido prácticamente dejadas de lado. Debido a esto, en el presente trabajo, se procedió a investigar la presencia de *V. cholerae* en reservorios acuáticos habitantes de la zona de bocana del río (aves de orilla y crustáceos) y también, se investigó la presencia de otros vibrios halofílicos patógenos que son problema de salud humana, de los que no existía registro para dicha zona.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de que en el Perú no haya ocurrido otra epidemia de cólera desde la década de los 90's, esto no quiere decir que nuestro país este exento de sufrir una de nuevo, puesto que *Vibrio cholerae* es una bacteria de vida libre, autóctona de los ecotonos que comprenden la convergencia de aguas dulces y salobres, como lo es el estuario del río Lurín, y si sumamos el hecho que la propagación del bacilo es multivectorial, el cólera es una de las enfermedades infecciosas que probablemente no sea erradicada jamás (Tarequl et al., 2017).

Los estudios de vigilancia de *V. cholerae* u otros vibrios halofílicos basados en pruebas microbiológicas de cultivo, muchas veces pueden dar falsos negativos, debido a que *Vibrio* tiene la capacidad de entrar en estados de “dormancia”, lo cual prolonga sus posibilidades de supervivencia en el medio acuático, pero impide su aislamiento, haciéndonos pensar en primera instancia, en su ausencia. Por otro lado, son bacterias que se asocian a múltiples reservorios acuáticos naturales (algunos de consumo humano), en los cuales además de protegerse y alimentarse, pueden realizar conversiones antigénicas de cepas non-O1 a O1 toxigénicas (Binsztein et al., 2004).

Por otra parte, dentro de los factores que hicieron posible los brotes de cólera a lo largo de la historia, se encuentran: la inadecuada gestión ambiental, el mal manejo de aguas residuales, la precariedad de la infraestructura sanitaria, la falta de higiene y el desconocimiento de la población sobre la cocción de agua y alimentos marinos (Tatah and Pulcherie, 2014).

El río Lurín viene siendo contaminado desde aproximadamente el 2004 con el vertimiento del agua excedente de las “Plantas de Tratamiento de Agua Residual” (PTAR) que forman parte del Proyecto “Mejoramiento del Sistema de Alcantarillado de la Zona Sur de Lima” (Proyecto MESIAS) (SEDAPAL., 2004). Estos efluentes vertidos a poco más de un kilómetro de la desembocadura al mar, son de naturaleza poluta, destacándose por su hediondez metros a la redonda, comunicando turbidez a sus aguas y aumentando su caudal natural. Además, durante esta investigación, se ha podido constatar otros efluentes clandestinos contaminantes, camino a la desembocadura en el mar. Esto ha conllevado a la alteración de la ecología de la zona, contaminando gravemente el litoral adyacente, perdiendo su atractivo paisajístico e introduciendo patógenos que podrían poner en peligro a la salud animal y humana.

Asimismo, el uso recreacional de aguas contaminadas con vibrios halofílicos tales como *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, entre otros, puede suponer un grave riesgo a la salud humana, al estar implicados en la producción de infecciones de heridas, oído medio, e incluso llegar a casos de sepsis, especialmente en individuos inmunocomprometidos y en los grupos etarios extremos (Centers for Disease Control and Prevention – CDC, 1999).

### **III. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA**

En la actualidad se desconoce en qué reservorios acuáticos de la zona estuarina del río Lurín se puede estar albergando *Vibrio cholerae*. Teniendo en cuenta que se trata de un ecosistema el cual ha sido descuidado y contaminado, es necesario monitorear y determinar la presencia del microorganismo en los diferentes reservorios acuáticos, tales como aves playeras (a nivel de especies) y crustáceos eurihalinos, como es el caso de *Ocypode gaudichaudii* “cangrejo carretero”, un habitante asiduo a nuestra zona litoral costera, cuyas cadenas tróficas están directamente vinculadas.

Más aún, siendo las aves indicadoras de la salubridad ambiental y por su potencial de dispersión de microorganismos patógenos (actuando como portadores) durante sus rutas migratorias. Adicionalmente, el valor teórico-epidemiológico de determinar otros vibrios marinos halofílicos que son problema para la salud humana de los cuales no se tiene ningún registro para este ecosistema.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo principal**

Aislar e identificar *Vibrio cholerae* y otras especies de vibrios halofílicos patógenos a partir de varios reservorios acuáticos naturales en la zona de la bocana del río Lurín.

#### **4.2. Objetivos específicos**

**4.2.1.** Aislar e identificar la especie *V. cholerae* y otros vibrios halofílicos patógenos en las excretas de aves acuáticas moradoras de dicho ecosistema.

**4.2.2.** Aislar e identificar *V. cholerae* y otros vibrios halofílicos patógenos en hemolinfa y tejidos del crustáceo eurihalino *Ocypode gaudichaudii*, habitante de dicho ecosistema.

## V. MARCO TEÓRICO

### 5.1. Género *Vibrio*

El género *Vibrio* (Pacini, 1854) es el más estudiado dentro de la familia Vibrionaceae, perteneciente a la clase Gammaproteobacteria del Dominio Bacteria. *Vibrio* comprende bacilos gramnegativos curvados y móviles, generalmente gracias a la posesión de un flagelo polar; estos microorganismos presentan metabolismo anaerobio-facultativo y fermentador; además, producen las enzimas citocromo oxidasa, catalasa y quitinasa extracelular (Huq et al., 1983; Leyton y Riquelme, 2008; Murray, 2017).

*Vibrio* se encuentra distribuido alrededor de todo el mundo y se caracteriza preponderantemente por estar adaptado a los ambientes acuáticos (ríos, mares, bahías, estuarios y lagos, entre otros cuerpos de agua). La gran mayoría de las especies que componen este género son halófilas; es decir, poseen la capacidad de tolerar elevados niveles de salinidad. Además, por su naturaleza mesófila, son en su mayoría encontradas en aguas cálidas, consecuentemente, son susceptibles al entorno hostil, pero poseen versátiles estrategias de adaptación y supervivencia (Gavilán et al., 2011; Huq et al., 1983; León et al., 2013; Sullivan et al., 2018; Tamplin et al., 1990).

El género *Vibrio* comprende más de cien especies descritas, de las cuales doce han sido catalogadas en mayor o menor medida como agentes patógenos para el ser humano (Pal et al., 2014), pues dichos microorganismos pueden ser potencialmente zoonóticos, estableciendo relaciones comensales y/o patogénicas con aves, mamíferos, crustáceos, insectos y algas (Fernández-Delgado et al., 2016; Lekshmi et al., 2018; Senderovich et al., 2010; Sullivan et al., 2018).

Desde el punto de vista clínico, las especies más importantes son *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, agentes etiológicos de infecciones que pueden llegar a comprometer severamente la salud de quien los padezca. Por otro lado, el aumento de la incidencia de estos microorganismos emergentes en todo el mundo, ha hecho que tomen mayor relevancia en el ámbito de la salud pública (Gavilán et al., 2011).

### 5.2. *Vibrio cholerae*

Este microorganismo es un habitante natural de los ambientes acuáticos salobres, siendo considerada una bacteria autóctona para estos ecosistemas, debido a que no es necesaria su reintroducción en los cuerpos de agua a través de las deposiciones, no asociándose necesariamente a la contaminación fecal (Lutz et al., 2013).

*V. cholerae* es definitivamente la especie más estudiada dentro de su género, tanto a nivel ecológico, genético y molecular (Pruzzo et al., 2008). Presenta dos serogrupos de naturaleza toxigénica (O1 y O139), considerados los agentes causales del cólera, una enfermedad diarreica aguda (EDA) de características epidémico-pandémicas (Gavilán et al., 2011).

### **5.3. El cólera epidémico-pandémico**

El cólera es una enfermedad muy antigua, de naturaleza diarreica aguda, producida por las cepas toxigénicas de *V. cholerae* O1 y O139 y de necesidad mortal si no se restituyen con prontitud por vía endovenosa el agua y los electrolitos perdidos a través de los vómitos y la diarrea masiva. Estos síntomas son producto de la ingesta de agua impura o alimentos de origen marino, crudos o de cocción inadecuada, contaminados con el bacilo del cólera, preferentemente durante las estaciones de calor (Laviad-Shitrit et al., 2019). Cabe destacar que la dosis infectiva mínima para provocar esta enfermedad (probada en voluntarios sanos) es de  $10^8$  microorganismos, inóculo que puede ser menor en caso de pacientes con aclorhidria, sometidos a gastrectomía, consumidores compulsivos de antiácidos e inmunocomprometidos (Clemens et al., 2017).

Los microorganismos causantes de esta EDA superan la acidez gástrica del hospedador, arriban al íleon proximal y logran colonizarlo masiva y eficientemente mediante pili específicos, para luego secretar una poderosa enterotoxina: el colerágeno. Esta molécula es capaz de producir severas alteraciones en el equilibrio hidroelectrolítico de los enterocitos, sobreviniendo vómitos copiosos y diarreas incesantes que provocan la muerte por coma y fallo renal agudo, debido a un cuadro de acidez metabólica (Robles et al., 1999; Zhang et al., 1955).

En consecuencia, el cólera ha sido responsable de millones de muertes humanas a lo largo de la historia, devastando civilizaciones, especialmente antes de la era pre-antibiótica (Almagro-Moreno et al., 2015). Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) registra alrededor de 3.5 millones de personas infectadas y 100,000 defunciones al año, debido al cólera en países en desarrollo (Lekshmi et al., 2018).

### **5.4. Serogrupos, biotipos y serotipos**

Se ha clasificado serológicamente a *V. cholerae* en función al antígeno somático O de los lipopolisacáridos de su pared celular, identificando más de 200 serogrupos; de ellos, solamente las cepas que aglutinan con los sueros mono-específicos O1 y O139 son las involucradas en las epidemias y pandemias de cólera. A pesar de ello, se ha registrado

que *Vibrio cholerae non-O1/non-O139* pueden producir diarreas coleriformes menos severas que el cólera y cuadros de enteritis (Laviad-Shitrit et al., 2018). A su vez, los individuos inmunocomprometidos son susceptibles a infecciones de oído, heridas, meninges, bacteriemia y septicemia (Filetici et al., 1997). Más aún, con base en las mutaciones del gen *wbeT*, la expresión del antígeno somático O1 es mayormente determinada mediante la aglutinación con los antisueros A, B y C, en los serotipos o serovares Ogawa (AB), Inaba (AC) e Hikojima (ABC) (Centers for Disease Control and Prevention – CDC, 1999).

*V. cholerae* O1 es clasificado en los biotipos Clásico y El Tor, basados en propiedades fenotípicas, sensibilidad a antibióticos y a bacteriófagos. Por un lado, las cepas clásicas son Voges-Proskauer negativas y no aglutinan eritrocitos de pollo, pero sí son resistentes a Polimixina B; caso contrario a las cepas El Tor; sin embargo, el ensayo “gold standard” para la diferenciación de estos biotipos son, la lisis mediada por los bacteriófagos IV y V, a los cuales el biotipo Clásico y El Tor son susceptibles, respectivamente. (Hatai et al., 2014; Lekshmi et al., 2018; Tarequl et al., 2017).

## 5.5. El Colerágeno

También llamado colerotoxina (CTX), es la toxina generada por las cepas *V. cholerae* O1 y O139, la cual basada en su estructura y función, pertenece a la familia de las enterotoxinas AB<sub>5</sub>, específicamente al tipo I de las enterotoxinas termolábiles. La holotoxina posee una masa molecular de 85,4 kDa y está constituida por una subunidad A, dividida en los fragmentos A<sub>1</sub> (22kDa) y A<sub>2</sub> (5,4 kDa), y por una subunidad B de cinco monómeros idénticos en forma de anillo (11,6 kDa) (Komiazyk et al., 2015).

El colerágeno (principal factor de virulencia) es el responsable directo de la alteración metabólica del enterocito, y está codificado a partir de los genes *ctxAB*, los mismos que forman parte del genoma viral del bacteriófago lisogénico CTXφ, introducido en el genoma de *V. cholerae* por transducción otorgándole toxigenicidad (Nahar et al., 2012).

La subunidad B o coleragenoide, actúa reconociendo los gangliósidos GM<sub>1</sub> de la membrana apical de los enterocitos. Estructuralmente, estos receptores, son glicoesfingolípidos constituidos por ceramida, una o más unidades de monosacáridos y un residuo de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico o ácido neuramínico) (Komiazyk M, 2015).

Para llevar a cabo la internalización de CTX, mediante endocitosis, es necesaria la unión de cada uno de los monómeros del coleragenoide a los respectivos gangliósidos GM<sub>1</sub> del enterocito (Álvarez et al., 2004; Komiazyk et al., 2015; Rauffman et al., 1998); en adición, esta interacción es mejorada por la enzima neuraminidasa (NANasa), que cataliza la conversión de gangliósidos de alto orden a GM<sub>1</sub> (Pal, 2014).

Dentro de la célula, el fragmento A<sub>1</sub>, una mono-ADP-Ribosiltransferasa (mADPRT), es quien tiene la actividad toxina del colerágeno. Catalizando la transferencia de ADP-

Ribosa del NAD hacia un residuo de arginina de la proteína G estimuladora alfa (Gs  $\alpha$ ) localizada en la membrana basolateral (Álvarez et al., 2004; Pal, 2014).

Es preciso mencionar que, en condiciones normales, la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  de la proteína Gs, en forma de GTP, activa la enzima adenilato ciclasa para producir AMPc, y es desactivada por la hidrólisis de GTP a GDP de dicha subunidad. Es por ello que, mediante este mecanismo, el complejo activo CTA<sub>1</sub>/ARF<sub>6</sub> inhibe la hidrólisis de GTP a GDP, dejando a la enzima adenilato ciclasa activada constitutivamente (Álvarez et al., 2004; Pal, 2014); por consecuencia, los niveles de AMPc aumentan drásticamente en el enterocito. Este segundo mensajero se une a los reguladores de la proteína kinasa A, permitiendo la fosforilación de muchos sustratos y la apertura de los canales de cloro dependientes de AMPc, conduciendo a la hipersecreción de iones cloro al lumen intestinal e impidiendo la absorción de iones sodio, por ende, el aumento de la concentración de NaCl en el intestino genera un gradiente osmótico, resultando en la pérdida abundante de agua a través de la *zonula occludens*; producto de ello, la diarrea excesiva, deshidratación severa, hipokalemia, acidosis metabólica, choque hipovolémico, insuficiencia renal y muerte. (Álvarez et al., 2004; Centers for Disease Control and Prevention – CDC, 1999; Pal, 2014).

## **5.6. Cepas viables, pero no cultivables**

Los vibrios como microorganismos oriundos de los ambientes acuáticos, poseen ventajas adaptativas para poder persistir cuando las condiciones no le son favorables; como en aguas menores a 15 °C, ante la falta de nutrientes o estrés en general, pudiendo entrar en un estado de “dormancia” llamado viable pero no cultivable (VNC) (Binsztein et al., 2004).

El nombre de este estado hace mención a la imposibilidad de aislar estas bacterias empleando las técnicas microbiológicas de cultivo, haciendo pensar en primera instancia, en su ausencia. No obstante, por medio del empleo de técnicas como el ensayo de inmunofluorescencia directa de anticuerpos (AID) y/o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), puede ser identificado en cualquier época del año. Al microscopio de fluorescencia se puede apreciar el cambio estructural del citoesqueleto de un bacilo curvado típico a la forma cocoide y de menor tamaño, manteniendo su capacidad patogénica (Tarequl et al., 2017).

## **5.7. Otros vibrios patógenos de interés**

### **5.7.1. *Vibrio vulnificus***

Esta especie halofílica se encuentra presente en los ambientes marino-costeros de todo el mundo; establece relaciones de tipo comensal con mariscos, peces y otros

animales de su entorno. Es un patógeno oportunista para el ser humano, ya que la ingestión de alimentos contaminados con *V. vulnificus* puede producir fiebre, escalofríos, náuseas, sepsis o choque endotóxico (Baker-Austin C et al., 2018). Por otra parte, la exposición de heridas abiertas a aguas contaminadas puede conducir a infecciones severas de las mismas, incluyendo celulitis, equimosis, ampollas y sepsis. (Alipour et al., 2018).

#### **5.7.2. *Vibrio parahaemolyticus***

Es un patógeno halófilo oportunista de los ecosistemas marino-costeros a nivel mundial. Se trata de un patógeno facultativo que causa principalmente cuadros de enteritis por el consumo de crustáceos y bivalvos sin cocción; enfermado a aproximadamente 35.000 personas en los Estados Unidos. El serogrupo O3:K6 emergido de la India, ha sido catalogado como potencialmente pandémico, y se registró en el Perú por primera vez en 1996. Entre los factores de virulencia representativos se encuentran las hemolisinas *Tdh* y *Trh* (Davis et al., 2017).

#### **5.7.3. *Vibrio fluvialis***

Es un patógeno halófilo oportunista relacionado al consumo de alimentos crudos de origen marino y aguas contaminadas. Es una bacteria emergente de la cual no se tiene conocimiento sobre su epidemiología, ni de los factores de virulencia precisos implicados en la patogenia (Ramamurthy et al., 2014). Se ha registrado que produce diarreas similares al cólera, pero más leves, infección de heridas y septicemia, especialmente en personas inmunocomprometidas (Igbiosa and Okoh, 2010).

#### **5.7.4. *Vibrio furnissii***

Microorganismo ubicuo halófilo, considerado un patógeno facultativo emergente; se transmite por el consumo de alimentos marinos crudos o mal cocidos. *V. furnissii* se caracteriza de otros vibrios por ser la única especie productora de gas a partir de la fermentación de glucosa. Se asocia principalmente a cuadros de enteritis, y en menor medida infecciones extraintestinales. Presenta genes de virulencia *toxR* y *rpoB*, implicados en la patogenia (Ballal et al., 2017).

### **5.8. Hábitat y nicho ecológico de *Vibrio cholerae***

A pesar de que *Vibrio cholerae* y los otros vibrios, supongan una amenaza potencial para la salud pública, juegan un papel crucial en la estabilidad de los ecosistemas marinos. Muchos investigadores ponen en manifiesto la complejidad ecológica del bacilo del cólera al registrarlo en asociación con muchos organismos de su ecosistema, con el fin de sobrevivir a condiciones no favorables (Martinelli et al., 2011; Tarekul et al., 2017). Ejemplo de ello, son los organismos quitinosos con los que *V. cholerae* establece relaciones de tipo comensal. Estas bacterias presentan la ventaja adaptativa de producir la enzima quitinasa, la que les permite degradar la quitina, empleándola como fuente de

nitrógeno, carbono y energía (Huq et al., 1983), muy útil en los períodos de escasez de nutrientes; además, este abundante biopolímero es usado como sustrato para la formación de biofilms y agente protector en el ambiente hostil (Senderovich et al., 2010).

Se resalta la importancia de *Vibrio* al degradar la quitina insoluble en formas más simples para el metabolismo; caso contrario, ocurriría una acumulación excesiva de exoesqueletos de crustáceos, sobre todo en aguas salobres (Nahar et al., 2012).

Por otro lado, un posible rol ecológico para el colerígeno, sería la acción osmorreguladora en crustáceos, mediante la concentración de sales fuera de las células epiteliales, permitiendo a ambos organismos beneficiarse en ecosistemas salobres (Singleton et al., 1982).

## **5.9. Reservorios acuáticos naturales de mayor importancia**

### **5.9.1. Aves acuáticas**

A diferencia de los otros reservorios naturales de *Vibrio* mencionados, las aves son probablemente el “eslabón perdido” para la rápida diseminación de cólera en el mundo, debido a que recorren miles de kilómetros de distancia dentro de su itinerario migratorio, por lo que son considerados diseminadores o vectores de transmisión a gran escala. A pesar de que han sido pocos los estudios para comprender la epidemiología del cólera en asociación a aves, en las últimas décadas ha habido un creciente interés por estar relacionados a muchos otros patógenos, incluidos virus, hongos y protozoos (Fu et al., 2019; Gogu-Bogdan et al., 2014).

Vale recalcar que muchos de los microorganismos patógenos para el hombre, no son necesariamente patógenos para las aves, por lo que pueden ser solo portadores y vectores, transportando los patógenos de zonas endémicas a zonas libres de los mismos (Rodríguez et al., 2010). Entre las bacterias patógenas potencialmente transmisibles por las aves, se encuentran: *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* sp., *Helicobacter* sp., *Mycobacterium* sp., *Yersinia* sp., *Listeria* sp., *Mycoplasma* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp. y *Vibrio cholerae* O1, razón por la cual las aves acuáticas son catalogadas como indicadores de salud ambiental para los ecosistemas marino-costeros (Ogg et al., 1989; Rodríguez et al., 2010).

Por último, la contaminación de los cuerpos de agua mediante actividades antropogénicas, tales como el vertimiento de aguas residuales, supone una alteración drástica de la microbiota de las aves, generando un peligro potencial no solo a zonas aledañas, sino también a todas las que se encuentren dentro de su ruta migratoria, pues, a través de sus excretas contaminarían otros suministros de agua para el ser humano y animales (Contreras-Rodríguez et al., 2019; Fu et al., 2019; Laviad-Shitrit et al., 2018).

### **5.9.2. Cangrejos**

Macrorustáceos del orden Decapoda, cuyo exoesqueleto está compuesto principalmente por quitina a la cual *Vibrio* spp. se adhiere por quimiotaxis (Martinelli et al., 2011). Estos organismos presentan una dieta variable; consumen lo que encuentran (invertebrados más pequeños, gusanos, algas, plancton y cadáveres de aves o mamíferos marinos varados) y son filtradores de detritos. La relación puede ser patogénica si *Vibrio* alcanza altas concentraciones en su hemolinfa, afectando funciones fisiológicas, como la capacidad respiratoria y la actividad metabólica llegando a causar la muerte (Sullivan et al., 2018).

### **5.9.3. Copépodos**

Microcrustáceos de la clase Maxillopoda, que forman parte del zooplancton. De igual forma, el exoesqueleto quitinoso permite el alojamiento de *Vibrio*. Contribuyen a la dispersión del microorganismo en el ambiente acuático tras la evacuación de excretas, siendo un vector a menor escala y parte de la dieta de los peces (Huq et al., 1983; Tamplin et al., 1990).

### **5.9.4. Moluscos**

Dentro de estos, destacan los bivalvos, como mejillones (mytilidae), ostras (ostreidae) y conchas de abanico (pectinidae), especies de gran importancia gastronómica, las cuales se alimentan por filtración succionando el agua y con ello fitoplancton y la materia orgánica disuelta, por lo que son potencialmente susceptibles a contaminarse y a bioacumular considerables concentraciones de diferentes microorganismos patógenos, además de *Vibrio*, tales como *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp. y *Pseudomonas* sp. (Romalde et al., 2014).

### **5.9.5. Quironómidos**

Estos son una familia de dípteros, cuyas larvas forman parte importante de la dieta de los peces; son abundantes en agua dulce y marina. También son fuente de alimento de aves, siendo transportados por estas mediante endozoocoria al consumirlos o por epizoocoria, llevándolos externamente (Senderovich, 2010).

### **5.9.6. Peces**

*Vibrio* establece relaciones mutuales con los peces para ayudarlos en la digestión de los exoesqueletos de copépodos y quironómidos, parte importante de la dieta de estos animales; además, distribuyen especies de *Vibrio* a través de las corrientes de agua, estableciendo una fuente de transmisión hacia las aves playeras (Senderovich, 2010).

### **5.9.7. Plancton**

Se ha registrado la asociación de *Vibrio* en forma de clústeres de biofilm. Mecanismo importante para la supervivencia del microbio cuando las condiciones ambientales no le son favorables. Otorgando resistencia hacia la acidez, estudios demuestran que las bacterias del consorcio de biofilm sometidas a ácido clorhídrico pueden ser recuperadas en cultivos, caso contrario, cuando se aplica a células libres (Nahar et al., 2012).

### **5.10. Factores ambientales**

La dinámica epidemiológica de *Vibrio* está fuertemente influida por las condiciones fisicoquímicas de los cuerpos de agua, afectando directamente su presencia y abundancia; evidencia de ello es el aumento de la temperatura (aguas > 15° C) con la ocurrencia de brotes de cólera en los meses de verano, donde las formas VNC se revierten, aumenta la proliferación y el consumo de alimentos de origen marino (Gavilán et al., 2011).

Asimismo, la tolerancia y adaptabilidad a la salinidad por parte de *Vibrio* spp. ha sido documentada, sugiriendo el óptimo rango de 1 ppm (agua dulce) a 17 ppm (agua salobre). Cabe destacar que *Vibrio cholerae* no es una especie necesariamente halófila, siendo este un criterio de diferenciación entre otras especies de *Vibrio* (Singleton et al., 1982; Sullivan et al., 2018).

De igual forma el pH es un muy importante en la persistencia de *Vibrio*, siendo sensible a los ambientes ácidos, razón por la cual se opta por medios de cultivo alcalinos, para favorecer su desarrollo e inhibir otros microorganismos acompañantes (Borroto, 1998).

## VI. ANTECEDENTES

Ha sido demostrado que *V. cholerae* es una bacteria autóctona o nativa de ambientes salobres, tales como estuarios o bocanas de ríos, donde encuentra las condiciones óptimas para su desarrollo (Barbieri et al., 1999; Colwell et al., 1981; Singleton et al., 1982); además, se asocia eficientemente a una serie de reservorios acuáticos que le sirven de refugio cuando las condiciones del ambiente le son adversas, tales como la depleción de nutrientes, aguas frías y niveles inadecuados de salinidad o pH (Huq et al., 1983; Tamplin et al., 1990., Tatah et al., 2014).

Los vibrios en general, pueden alterar su forma típica bacilar curvada para adoptar una forma cocoide y de menor volumen, llamada viable pero no cultivable (VNC), facilitando su supervivencia, para luego recuperar su morfología original cuando los factores ambientales mejoran (Amy and Morita, 1983; Baker et al., 1983; Binsztein et al., 2004; Hood et al., 1986).

*V. cholerae* también se asocia al intestino de aves playeras, donde podría sufrir mutaciones de non-O1 (cepas generalmente no epidémicas) a cepas O1 (epidémicas), para protegerse y además utilizarlas como vectores de diseminación desde zonas endémicas de cólera hacia áreas libres de la enfermedad durante su itinerario migratorio (Fernández-Delgado et al., 2016), siendo la microbiota de las aves, susceptible a variaciones en función al tipo de dieta, a las condiciones ambientales y a la contaminación antropogénica, sea por antibióticos, mal manejo de aguas residuales o vertimiento indiscriminado de basura (Ebert et al., 2016).

Por otra parte, cabe enfatizar que los diferentes reservorios naturales de *Vibrio*, como larvas de quironómidos, cangrejos, copépodos, protozoos, bivalvos y peces, son fuente de alimento de las aves acuáticas, completando la red trófica (Ebert et al., 2016; Fernández-Delgado et al., 2016). Evidencia de ello son los aislamientos de *V. parahaemolyticus* clonalmente relacionados obtenidos a partir de *Numenius arquata* “zarapito real” y moluscos. De igual modo, el aislamiento de clones de cepas de *V. parahaemolyticus* en ciudades a más de 1,000 Km. de distancia, a partir de muestras de heces de aves, sugiriendo que son vectores de transmisión a gran escala (Fu et al., 2019).

Asimismo, es bien sabido que *Vibrio* utiliza organismos quitinosos (crustáceos e insectos) del ambiente marino-costero como reservorios, al ser la quitina fuente de alimento, protección e insumo para la formación de biofilms (León et al., 2013; Nahar et al., 2012). Un ejemplo en particular, es la colonización con éxito del intestino posterior de cangrejos (rico en quitina) que son de consumo humano y que se convierten no solo en un reservorio ecológico sino también en organismos sumamente peligrosos por su capacidad para bioacumular bacterias (pudiendo contener  $>10^5$  bacterias/ml de hemolinfa); estableciéndose el importante papel que juega la quitina de estos crustáceos en la biología de la bacteria (Huq et al., 1986; Pruzzo et al., 2008; Sullivan and Neigel, 2018), sustrato que también tiene gran

importancia en el fenómeno de “quorum sensing” (regulación génica poblacional) para que *Vibrio* pueda formar sincronizadamente biopelículas que protejan a la población bacteriana eficientemente (f and Bassler, 2003).

Se han planteado múltiples teorías para explicar cómo la séptima pandemia del cólera, emergente de las Islas Célebes (Indonesia), arribó las costas peruanas, iniciando la distribución en el continente americano. Entre ellas están la dispersión de *V. cholerae* producto del agua de lastre usada en barcos; la propagación por el ser humano a través de viajes internacionales, y por cambios en las corrientes oceánico-marinas. Esta última teoría, propone que estos cambios generan variaciones en las condiciones oceanográficas y climáticas alrededor del mundo, como lo fue el evento “El Niño” de 1991, con la inversión de corrientes de agua de la zona ecuatorial, siendo un posible factor en la llegada de *V. cholerae* al Perú (Gavilán et al., 2011; Maguiña et al., 2010); no obstante, ninguna de estas teorías logra explicar completamente el mecanismo epidemiológico de la dispersión de *V. cholerae*.

Por otro lado, a diferencia de patógenos ampliamente estudiados del género como *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, también han emergido otros vibrios, como *V. furnissii* y *V. fluvialis* productores de enteritis, infecciones de heridas y sepsis en inmunocomprometidos; microorganismos relacionados mayormente a lugares donde no hay una infraestructura adecuada sobre el manejo de aguas servidas y, de igual forma, al consumo de alimentos poco cocidos y aguas contaminadas, sobre los cuales falta realizar estudios correspondientes a su epidemiología y factores de virulencia (Ballal et al., 2017; Igbinsola and Okoh., 2010; Ramamurthy et al., 2014).

Mariazza y colaboradores (2006) lograron aislar e identificar *V. cholerae* y cepas en fase R en el ecosistema estuarino del río Lurín, tanto en heces de aves y en cangrejos, durante las épocas estival e invernal, después de la epidemia de cólera en nuestro país, y plantearon la posibilidad de que dicho microorganismo pudiera adquirir oriundez en éste y otros ecosistemas semejantes.

Dado el tiempo transcurrido y la posibilidad latente de este tipo de enfermedades en nuestro país, es que este trabajo es de interés, pues se desconoce la situación actual del bacilo del cólera en este ecosistema. De igual modo, es la primera vez que se plantea investigar la presencia de vibrios halofílicos peligrosos para la salud humana en este lugar.

## VII. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1. Lugar de ejecución

Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma. Av. Benavides 5440, distrito de Santiago de Surco, Provincia de Lima, Perú.

### 7.2. Sitio de muestreo

El muestreo se llevó a cabo en el ecosistema costero-fluvial estuarino del río del Lurín ( $12^{\circ}16'22''$  S,  $76^{\circ}54'13''$  W) y en áreas inmediatas intertidales de influencia del ecotono, a una distancia no mayor a 200 metros en la playa Mamacona, a la altura del Km. 29 de la antigua carretera de la Panamericana Sur, distrito de Lurín, Provincia de Lima, Perú.



**Figura 1.** Ubicación específica en la bocana del río Lurín (Fuente: Google Earth, 2020)

### 7.3. Identificación de especies de aves

Se realizaron 4 salidas de campo entre las 10:30 a 12:00 horas, rango en el cual se identificaron las especies de aves acuáticas mediante el uso de binoculares y con base en el libro “Aves de Perú” (Schulenberg et al., 2010). A continuación, los individuos identificados fueron muestreados “al acecho”, una vez que estos defecaron se procedía rápidamente a recolectar la muestra.

#### **7.4. Recolección de muestras de aves**

Con la ayuda de un hisopo estéril se colectaron 42 muestras de heces evacuadas frescas, incluyendo 8 especies de aves acuáticas: *Charadrius vociferus* “Chorlo gritón” (2), *Haematopus palliatus* “Ostrero americano” (15), *Leucophaeus atricilla* “Gaviota reidora” (7), *L. modestus* “Gaviota gris” (5), *Numenius phaeopus* “Zarapito trinador” (9), *Phalacrocorax bougainvilli* “Cormorán guanay” (1), cloaca de *Pelecanus thagus* “Pelícano peruano” (2) y cloaca de *Sula variegata* “Piquero peruano” (1).

Se tuvo en cuenta las características macroscópicas de la materia fecal, como consistencia, color y concreciones; es decir, material de naturaleza quitinosa o algal. Cada muestra fue inmediatamente enriquecida en viales estériles con Agua Peptonada Alcalina al 1%, a simple concentración (APA, 1X), pH~9, colocándolos en un contenedor con hielo (gelipack) en la base para su transporte al laboratorio de microbiología. Una vez ahí, el enriquecimiento propiamente dicho fue de 24 horas a temperatura ambiente.

#### **7.5. Recolección de muestras de *Ocypode gaudichaudii***

Se capturaron 5 individuos de *O. gaudichaudii* mediante acecho y/o por excavación de sus madrigueras, residentes de la línea de mareas o zona tidal. A continuación, se sacrificaron y diseccionaron. Con la ayuda de hisopos estériles se tomaron muestras de la hemolinfa y vísceras de los especímenes. De igual modo, las muestras se enriquecieron siguiendo el mismo protocolo usado para las muestras de heces de aves.

#### **7.6. Análisis bacteriológico**

Los protocolos de aislamiento e identificación microbiológica de *Vibrio cholerae* y los demás vibrios halofílicos (Flujograma 1) llevados a cabo, estuvieron basados en los criterios de Farmer III and Hickman-Brenner (2006), Farmer III et al., (1985), Mac Faddin (2003) y Mariazza (2018, dnp).

### **7.6.1. Aislamiento selectivo**

Para el aislamiento selectivo, las muestras enriquecidas fueron cultivadas en agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS) (HiMedia Laboratories, India) a 37 °C por 24 horas. Se eligieron de 2 a 4 colonias entre sacarosa positivas y negativas sospechosas de *Vibrio*, las cuales fueron transferidas a tubos con Agar Soya Triptosa inclinado (AST) (Oxoid), los cuales fueron incubados a 37 °C por 24 horas, para obtener subcultivos y proceder a la identificación bioquímica de las cepas.

### **7.6.2. Identificación bioquímica**

Se utilizaron los siguientes medios y pruebas de diferenciación bioquímica: TSI (Triple Sugar Iron), LIA (Lysine Iron Agar), citrato de Simmons, SIM (Sulfide Indol Motility), oxidasa, string y catalasa; además, tinción de Gram y desarrollo en agua peptonada al 0% de NaCl, a partir de los cuales se consideraron los siguientes parámetros: Fermentación de glucosa, sacarosa y lactosa; producción de gas a partir de glucosa; descarboxilación de la lisina; utilización del citrato; producción de sulfuro de hidrógeno; producción de indol; motilidad; motilidad; reacción de oxidasa, string, catalasa, crecimiento al 0% de NaCl en peptona, y tinción Gram.

### **7.6.3. Pruebas moleculares**

Se recibió apoyo del laboratorio de enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud (INS) del Perú, para la realización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) del gen *ompW*, a fin de confirmar molecularmente las cepas de *V. cholerae*, además del gen *ctxA* para la determinación de cepas toxigénicas (O1/ O139).

## VIII. RESULTADOS

Las colonias en TCBS sospechosas de *Vibrio* presentaron morfología típicamente circular, consistencia cremosa, borde entero, elevación convexo-moderada, 2-4 mm de diámetro, considerando, además, la fermentación de la sacarosa (colonias amarillas) y la incapacidad para utilizar este sustrato como fuente de carbono (colonias verdes).

Las cepas que se identificaron como *V. cholerae* presentaron los siguientes parámetros: **i)** Reacción positiva a oxidasa, al producir una mancha morado-azul intenso en no más de 60 segundos; **ii)** Reacción positiva a catalasa, con diferente grado de intensidad de burbujeo tras agregar peróxido de hidrógeno; **iii)** Test de String con formación de fleco; **iv)** Fermentación de azúcares en TSI (A/A - - o K/A - -); **v)** Descarboxilación de la lisina en LIA (K/K); **vi)** Utilización del citrato; **vii)** Producción de indol; **viii)** Motilidad positiva; **ix)** Desarrollo en APA 0% NaCl y **x)** Bacilos curvados gramnegativos. La especie halofílica *V. alginolyticus*, diferenciada de *V. cholerae* por ser citrato-negativa. Las cepas aisladas correspondientes a *V. fluvialis* y *V. furnissii* no reaccionaron con lisina (K/A o A/A en LIA), esta última especie fue la única aerogénica (Tabla 1) (Flujograma 2).

El análisis bacteriológico permitió aislar un total de 93 cepas a partir de aves acuáticas, de las cuales 21 fueron pertenecientes al género *Vibrio*, identificando 7 cepas de *V. cholerae* (7.5%), 4 de *V. fluvialis* (4.3%), 5 de *V. furnissii* (5.4%) y 5 correspondientes a *Vibrio* spp. (5.4%), obteniendo un porcentaje de aislamiento de cepas del género *Vibrio* del 22.6% (Tabla 2). A continuación, se detallan las aves acuáticas portadoras de las especies de *Vibrio*: *V. cholerae* en *Haematopus palliatus* (4/15), *Leucophaeus atricilla* (1/7), *Pelecanus thagus* (1/1) y *Sula variegata* (1/1) (Tabla 4). Dos de estos aislamientos fueron analizados en los laboratorios de enteropatógenos del INS (cepas La-f2 y PT1-1, recuperadas a partir de *H. palliatus* [materia fecal] y de *P. thagus* [cloaca], respectivamente), confirmando las cepas de *V. cholerae* non-O1/non-O139 no-toxigénico, mediante la amplificación de los genes *OmpW* y *ctxA*, para ambos reservorios naturales.

Se aisló *V. fluvialis* en *H. palliatus* (2/15) y *L. atricilla* (1/15) (Tabla 5); *V. furnissii* se asoció únicamente a *L. atricilla* (1/7) (Tabla 6) y *Vibrio* spp. en *Charadrius vociferus* (1/1), *H. palliatus* (1/15), *L. atricilla* (1/7), *L. modestus* (1/7) y *Numenius phaeopus* (1/1). Por otra parte, se aislaron 10 cepas, a partir *Ocyrops gaudichaudii*, identificando una de ellas como *V. fluvialis* y la otra, correspondiente a *Vibrio* sp.

Además, se realizaron análisis bacteriológicos de otros reservorios acuáticos pertenecientes al ecosistema, identificando una cepa de *Vibrio* sp. en el agua de la bocana, dos cepas de *V. fluvialis* en el agua de MESIAS, 3 *Vibrio* spp. en algas y 3 biotipos no determinados, a partir de *Coragyps atratus*, ave no acuática, residente y carroñera. En adición, se registraron otras cepas bacterianas (no-Vibrionaceae) a partir de todos los reservorios estudiados (Tabla 7), destacándose la presencia de *Salmonella* en *H. palliatus*, *L. atricilla* y *O. gaudichaudii*, cuyas respectivas reacciones bioquímicas se detallan en la tabla 8.

Por su parte, *C. freundii*, se aisló en tres especies de aves y en un cangrejo (Tabla 9). Además, se aislaron cepas pertenecientes al grupo *Proteus-Morganella-Providencia*: 7 en *N. phaeopus*, 3 en *H. palliatus* y 2 en *L. atricilla* (Tabla 10). Este último grupo se analizó mediante el índice de similaridad de Jaccard, encontrándose un 100% de semejanza entre la cepa ATR2-2 (procedente de *L. atricilla*) y *P. penneri* (*P. vulgaris* biogrupo 1 [Hickman et al., 1982]). *P. penneri*, *Providencia* y *Morganella* son improbables agentes productores de diarrea (ver dendrograma).

La Ornitofauna avistada a lo largo del cauce del río y en la bocana se lista en las tablas 11 y 12.

## IX. DISCUSIÓN

Las aves, punto crítico de este estudio, se pueden constituir en “los eslabones perdidos” en la propagación de *Vibrio cholerae* entre continentes, como lo han sugerido Halpern et al., (2008). Por su parte, Ogg et al., (1989) lograron aislar *V. cholerae* O1 a partir de muestras de hisopados cloacales y heces evacuadas frescas colectadas de 20 especies de aves acuáticas en Colorado y Utah durante 1986 y 1987, pero no pudieron detectar la bacteria en muestras de agua tomada de su hábitat. Esto podría indicar que no fue el agua la fuente de contaminación, sino los alimentos que éstas ingerían (crustáceos, “lentejitas de agua” o algas).

Según lo observado, *Vibrio* spp. (incluyendo *V. cholerae*) se encuentra en los intestinos de las aves acuáticas migratorias, pero dudamos que éstas se hayan contaminado a partir del agua de la bocana, debido a que no se aisló *V. cholerae* en el agua poluta que vierte la compuerta del “Mesías”, ni en el agua procedente de este efluente, la que luego se embalsa en el último tramo del río (pH 7.5); sin embargo, sí se aisló *Vibrio fluvialis* y *Vibrio* spp., respectivamente.

Por otra parte, gran cantidad de las muestras de pellets fecales poseían contenido quitinoso anaranjado-rojizo, poniendo de manifiesto que las aves de orilla de Lurín se alimentan de *O. gaudichaudii*; además, se registró la presencia de caparazones de *Crepipatella dilatata* (molusco univalvo de la zona). Adicionalmente, se identificó *V. fluvialis* en *O. gaudichaudii*, el cual puede bioacumular estos microorganismos en su sistema digestivo, y que forma parte de la dieta de las aves, generándose así un interesante ciclo biológico para estas bacterias. Se afirma que *V. cholerae* sobrevive mejor dentro del intestino de las aves acuáticas, versus las condiciones adversas del entorno.

Las cepas que provienen del ambiente que corresponden generalmente a *V. cholerae* non-O1; se sabe que pueden haber perdido la capacidad de aglutinar con el antisuero polivalente O1, y que las formas O1 pueden hallarse en estado viable no cultivable (VNC), pasando desapercibidas cuando se rastrean por métodos microbiológicos convencionales (Binsztein et al., 2004; Chaiyanan et al., 2007); no obstante, también se sabe que las cepas non-O1

pueden revertir al tipo O1 y reciclar epidemias al mejorar las condiciones ambientales, cuando el agua se atempera en verano ( $> 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), coincidiendo con el “bloom” del fito y zooplancton (fuente de quitina).

Los resultados de esta investigación son concordantes con los que se han encontrado en otros lugares del mundo (Colwell et al., 1981; Singleton et al., 1982; Garay et al., 1985; Islam et al., 1996; Rodríguez et al., 2010); no obstante, es necesario profundizar y agudizar los estudios, aplicando técnicas más sensibles que permitan detectar formas VNC de *Vibrio cholerae* y de los vibrios halofílicos, aunque el solo hecho de demostrar la presencia de la especie es trascendente y determinante.

Respecto a *V. furnissii* (descrito inicialmente por Lee et al., [1981], como una biovariedad II aerogénica de *V. fluvialis*), es una especie que rara vez se aísla en estuarios, pero que se ha asociado a enfermedades diarreicas en el hombre (Esteve et al., 1995). Nuestros aislamientos son positivos a indol y capaces de crecer en agua peptonada con NaCl 0%, coincidentes con los de Esteve et al., (1995) y a diferencia de *V. furnissii*, aislado de las heces de un paciente, por Brenner et al., (1983): indol negativo e incapaz de crecer en ausencia de NaCl. Esteve et al., (1995) han llamado “atípicas” a las cepas de *V. furnissii* productoras de indol, pero han reconocido que su detección depende del método y del medio para su producción. Nosotros registramos el indol a partir del desarrollo en medio SIM. Noguera and Blanch (2008) registraron variabilidad respecto al desarrollo en ausencia de NaCl para *V. furnissii* (26-47% de positividad). Creemos que se pone de manifiesto una combinación de resultados en función de factores ajenos a las cepas; no obstante, hay consenso en la presencia de gas (se repitieron dos veces la prueba para gas en TSI, resultando siempre positivo).

Algunos resultados han llevado a discutir la selectividad del TCBS (HiMedia Laboratories, India), pues si bien es cierto, inhibió la microbiota grampositiva, ha permitido el desarrollo de Enterobacteriaceae y otros microorganismos que no debieron crecer en este medio. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, se sospechó su presencia debido a que el APA adquirió pigmento verde (pioverdina) y película flotante (no se formaron colonias en TCBS, pero se pudo aislar a partir de subcultivo en AST). Rodríguez et al., (2008) han encontrado *Pseudomonas* sp. asociada a aves residentes y migratorias en el estado de Sucre (Venezuela). Evidentemente, si se hubiera examinado muestras con agar MacConkey, la recuperación de bacilos entéricos y *Pseudomonas* habría sido mayor.

En este estudio se encontraron biotipos bacterianos no determinados (38% de cepas) de difícil afiliación, y cromobacterias (3% de cepas), a partir de algas tomadas en la periferia de estos empozamientos, siendo negativas a *V. cholerae*. Así como se refleja en estudios anteriores, se comprobó que la aplicación de análisis bioquímicos convencionales puede impedir la correcta distinción entre biotipos, y pueden presentarse algunas dificultades en la diferenciación a nivel de especies provenientes de muestras ambientales (Filetici et al., 1997; Mariazza et al., 2006).

Las aves predan a *O. gaudichaudii*; sin embargo, no se pudo hallar *V. cholerae* en sus tejidos o hemolinfa (pese a registrar una temperatura corporal media de  $26.6^{\circ}\text{C}$ , tomada en el momento de su sacrificio, aunque sí otros vibrios y enterobacterias, incluyendo *Salmonella*

spp.); quizá haya que intensificar su búsqueda aumentando el número de muestras y emplear técnicas más sensibles, además de considerar la posibilidad de que existan cepas VNC para todos los casos, incluyendo las muestras de agua de los hábitats. Se pudo observar cierto grado de mortandad preocupante de aves acuáticas en la zona (pelícanos, carádridos y suliformes, principalmente), sugiriendo que esto es debido al altísimo grado de polución del agua y a la escasez de alimento, haciendo hincapié que *Vibrio cholerae* no es una bacteria ornitopatógona.

Rhodes and Kator (1988) demostraron que *E. coli* y *Salmonella* spp. pueden sobrevivir en ambientes estuarinos; nuestros aislamientos refrendan sus hallazgos y revelan la contaminación fecal en la zona.

En los estudios en reservorios acuáticos es frecuente la presencia de *Aeromonas* y *Plesiomonas*, géneros que comparten el hábitat con *V. cholerae*, pudiendo incluso ser confundidos con esta especie; no obstante, estos microorganismos suelen ser inhibidos por las sales biliares (8 g/l) del medio TCBS (y si logran desarrollar en éste, lo hacen formando colonias enanas); además, *Plesiomonas* no degrada la sacarosa, *Aeromonas* es gas +, y estos géneros no forman “collar” con desoxicolato de sodio al 0.5%, a diferencia de *V. cholerae*: 100%+ (Keast and Riley, 1997).

En esta investigación se decidió levantar algunas muestras adicionales de excretas de *Cathartes aura* “gallinazo de cabeza roja”, por su condición de carroñero y asiduo visitante de la zona de la bocana, siendo negativas a *Vibrio*. También se tuvo la oportunidad de tomar una muestra del ano de un espécimen muerto de *Tursiops truncatus* “Delfín mular” que se hallaba varado en la playa Mamacona, siendo negativa a *Vibrio*. Buck and McCarthy (1994) registraron la ocurrencia de *V. cholerae* en esta especie en la costa del golfo de Texas, pero parece ser que el potencial diseminador de los delfines está restringido por las limitaciones de su propio hábitat.

Pese a su presencia y peligrosidad, *V. cholerae* no deja de ser una bacteria de vida libre (independiente de la contaminación fecal), de nicho ecológico fundamental en los ecosistemas marinos, cuya función natural principal es la de intervenir en los ciclos del carbono y nitrógeno, a través de la degradación del exoesqueleto de cangrejos, camarones, copépodos, moluscos e insectos, catabolizando N-acetilglucosamina de la quitina, el biopolímero más abundante de los mares, de lo contrario, los océanos estarían “repletos” de carapachos y conchas. A su vez, es una bacteria simbiótica que forma parte de la microbiota intestinal de los copépodos; estos prácticamente se “sepultan” con los microorganismos en épocas de frío, para retornar a la columna de agua en verano (cuando mejoran las condiciones de temperatura y la calidad de nutrientes) en un “bloom” reproductivo gracias al aumento de los niveles de clorofila, liberando millones de bacilos con capacidad potencialmente infectiva y toxigénica. Siendo así, debemos entender claramente la diferencia entre prevenir una enfermedad y pretender erradicar un microorganismo clave en el ecosistema marino; la polución interfiere el rol natural de los descomponedores.

## X. CONCLUSIONES

En estas circunstancias hemos aislado 7 cepas de *Vibrio cholerae* de 93 estudiadas, a partir de las excretas de aves acuáticas en la bocana del río Lurín. Dos de éstas confirmadas por PCR como *V. cholerae* non-O1/ non-O139 no toxigénicas por el INS, procedentes del ave migratoria *Haematopus palliatus* “ostrero americano” y la otra de un ave residente, *Pelecanus thagus* “pelicano peruano”, registrándose por primera vez a estos especímenes como reservorios de *V. cholerae*.

De igual modo, se registra por primera vez la presencia de vibrios emergentes como *V. fluvialis* y *V. furnissii* en aves acuáticas para el Perú. Además, *O. gaudichaudii* como portador de *V. fluvialis*.

*L. atricilla* es el ave acuática más poluta en términos de patógenos microbianos, siendo reservorio de *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *Vibrio* spp., Enterobacteriaceae ND, *Citrobacter freundii*, *Salmonella* spp, Cromobacterias, grupo *Proteus-Morganella-Providencia* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Es posible que *Vibrio cholerae* y otros vibrios halofílicos puedan hallarse en estado viable no cultivable, por lo que se sugiere realizar pruebas más sensibles que permitan hallar estos microorganismos en estados de “dormancia”, los cuales al momento de su emergencia podrían suponer un peligro a la salud pública.

La naturaleza del estuario de Lurín se ha visto perturbada por la contaminación antropogénica, especialmente el vertimiento de efluentes del proyecto MESIAS y el abandono de este ecosistema por parte de las autoridades; por lo cual la composición microbiana ya no es netamente propia de una bocana, sumando un mayor riesgo para la salud pública mediante el uso recreacional de estas aguas.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alipour, M., Mirabbasi, R., Gholampour, I., Yahyapour, Y. 2018. Isolation and detection of *Vibrio vulnificus* from Coastal Seawater of Babolsar. *Zahedan J Res Med Sci.* **20**: e67004.
- Almagro-Moreno, S., Pruss, K., and Taylor, R. K. 2015. Intestinal colonization dynamics of *Vibrio cholerae*. *PLOS Pathog.* **11**: e1004787.
- Álvarez, A. 2004. Mono-ADP-Ribosilación: Implicación en la fisiología de los organismos. *REB* **23** (4): 149-156.
- Amy, P.S., and Morita, R.Y. 1983. Protein patterns of growing and starved cells of marine *Vibrio* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1748-1752.
- Baker, R.M., Singleton, F.L., and Hood, M.A. 1983. Effects of nutrient deprivation on *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 930-940.
- Baker-Austin, C., and Oliver, J. D. 2018. *Vibrio vulnificus*: new insights into a deadly opportunistic pathogen. *Environmental Microbiology* **20**: 423-430.
- Ballal, M., Shetty, V., Rodney, S., Prabhu, M., and Umakanth, S. 2017. *Vibrio furnissii*, an emerging pathogen causing acute gastroenteritis: a case report. *JMM case reports.* **4**.
- Barbieri, E., Falzano, L., Fiorentini, C., Pianetti, A., Baffone, W., Fabbri, A., Matarrese, P., Casiere, A., Katouli, M., Kuhn, I., Mollby, R., Bruscolini, F., and Donelli, G. 1999. Occurrence, Diversity, and Pathogenicity of Halophilic *Vibrio* spp. and Non-O1 *Vibrio cholerae* from Estuarine Waters along the Italian Adriatic Coast. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2748-2753.
- Binsztein, N., Costagliola, M.C., Pichel, M., Jurquiza, V., Ramírez, F.C., Akselman, R., Vacchino, M., Huq, A., and Colwell, R.R. 2004. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7481-7486.
- Borroto, R. J. 1998. Supervivencia de *Vibrio cholerae* O1 en agua dulce superficial y cólera endémico: una hipótesis geocológica. *Rev. Panam. Salud Pública.* **4**: 371-374
- Bravo, N., y Guillén, A. 2011. Reporte histórico: primer aislamiento de *Vibrio Cholera* serogrupo O1 biovar El Tor Inaba durante la epidemia de cólera en el Perú-1991. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública.* **28**: 136-139.

Buck, J.D. and McCarthy, S.A. 1994. Occurrence of non-01 *Vibrio cholerae* in Texas gulf coast dolphins (*Tursiops truncatus*). Letters in applied microbiology.

Center of Disease Control and Prevention. 1999. Laboratory methods for the diagnosis of epidemic dysentery and cholera. Atlanta, Georgia 3033 USA.

Chaiyanan, S., Chaiyanan, S., Grim, C., Mangel, T., Huq, A. and Colwell, R.R. 2007. Ultrastructure of coccoid viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. Environmental Microbiology. **9**: 393-402.

Clemens, J. D., Balakrish, G., Ahmed, T., Qadri, F., and Holmgren, J. 2017. Cholera. Lancet **390**: 1539-49.

Colwell, R.R., Seidler, R.J., Kaper, J., Joseph, S.W., Garges, S., Lockman, H., Maneval, D., Bradford, H., Roberts, N., Remmers, E., Huq, I., and Huq, A. 1981. Occurrence of *Vibrio cholerae* serotype 01 in Maryland and Louisiana estuaries. Appl. Environ. Microbiol. **41**: 555-558.

Contreras-Rodríguez, A., Aguilera-Arreola, M. G., Osorio, A. R., Martin, M. D., Guzmán, R. L., Velarde, E., and Ruiz, E. A. 2019. Detection of potential human pathogenic bacteria isolated from feces of two colonial seabirds nesting on isla Rasa, Gulf of California: Heermann's Gull (*Larus heermanni*) and Elegant Tern (*Thalasseus elegans*). Tropical Conservation Science. **12**: 1-8.

Davis, B. J., Jacobs, J. M., Davis, M. F., Schwab, K. J., DePaola, A., and Curriero, F. C. 2017. Environmental determinants of *Vibrio parahaemolyticus* in the Chesapeake Bay. Applied and Environmental Microbiology. **83**: e01147-17.

De, S.N., Sarkar, J.K., and Tribedi, B.P. 1951. An experimental study of the action of cholera toxin. J. Pathol. Bacteriol. **63**: 707-717.

Ebert, L. A., Schlemper, J. C., Pelisser, M. R., Pereira, B. A., Da silva, M. A., and Branco, J. O. 2016. Pathogenic bacteria associated with Kelp gull *Larus dominicanus* (Charadriiformes, Laridae) on the coast of santa Catarina state – Brazil. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. **5**: 458-473.

Esteve, C., Amaro, C., Biosca, E.G. y Garay, E. 1995. Biochemical and toxigenic properties of *Vibrio furnissii* isolated from a European eel farm. Aquaculture. **132**: 81-90.

Farmer III, J.J., Hickman-Brenner, F.W., and Kelly, M.T. 1985. *Vibrio*. From Manual of Clinical Microbiology. Chapter 26. 4 ed., 282-301.

Farmer III, J.J., and Hickman-Brenner, F.W. 2006. The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. *The Prokaryotes*. 508-563.

Fernández-Delgado, M., Sanz, V., Giner, S., Suárez, P., Contreras, M., Michelangeli, F., and García-Amado, M. 2016. Prevalence and Distribution of *Vibrio* spp. In Wild Aquatic Birds of the Southern Caribbean Sea, Venezuela, 2011-12. *Journal of Wildlife Diseases*, **52**: 621-626.

Filetici, E., Bonadonna, L., Ciccozzi, M., Anastasio, M. P., Fantasia, M., and Shimada, T. 1997. Phenotypic and genotypic biotyping of environmental strains of *Vibrio cholerae* non-O1 isolated in Italy. *Applied and environmental microbiology*. **63**: 4102-4106.

Fu, S., Hao, J., Yang, Q., Lan, R., Wang, Y., Ye, S., Liu, Y., and Li, R. 2019. Long-distance transmission of pathogenic *Vibrio* species by migratory waterbirds: a potential threat to the public health. *Scientific Reports* **9**: 16303.

Garay, E., Arnau, A. and Amaro, C. 1985. Incidence of *Vibrio cholerae* and related vibrios in a coastal lagoon and seawater influenced by lake discharges along an annual cycle. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 426-430.

Gavilán, R., y Martínez-Urtaza, J. 2011. Factores ambientales vinculados con la aparición y dispersión de las epidemias de *Vibrio* en América del Sur. *Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública*; **28**: 109-15.

Gogu-Bogdan, M., Damoc, I., Páll, E., Niculae, M., and Spinu, M. 2014. Wild birds as potential vectors for pathogen dissemination on migration routes in the Danube Delta Wetlands. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **3**: 890-897.

Google. (s.f.). [Mapa de la bocana del río Lurín, Lima en Google Earth 2020].

Halpern, M., Senderovich, Y. and Izhaki, I. 2008. Waterfowl-the missing link in epidemic and pandemic cholera dissemination? *PLoS Pathog.* **4**: e1000173.

Hammer, B.K., and Bassler, B.L. 2003. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*. **50**: 101-104.

Hatai, J., Banerjee, P., Hatai, B., and Banerjee, S. 2014. Environmental factors, oxidative stress and the effects of mutation on *Vibrio cholerae*. *Int. J. Pharm. Med. Res.* **2**: 155-161.

Hickman, F.W., Steigerwalt, A.G., Farmer III, J.J. and Brenner, D.J. 1982. Identification of *Proteus penneri* sp. nov., formerly known as *Proteus vulgaris* indole negative or as *Proteus vulgaris* biogroup 1. *J. Clin. Microbiol.* **15**: 1097-1102.

Hood, M.A., Guckert, J.B., White, D.C., and Deck, F. 1986. Effect of nutrient deprivation on lipid, DNA, RNA, and protein levels in *Vibrio cholerae*. Appl. Environ Microbiol. **52**: 788-793.

Huq, A., Small, E.B., West, P.A., Huq, M.I., Rahman, R., and Colwell, R.R. 1983. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. Appl. Environ. Microbiol. **45**: 275-283.

Huq, A., Huq, S.A., Grames, D.J., O'Brien, M., Ka Hou Chun., McDowell Capuzzo, J., and Colwell, R.R. 1986. Colonization of the gut of the blue crab (*Callinectes sapidus*) by *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol. **52**: 586-588.

Igbinosa, E. O., and Okoh, A. I. 2010. *Vibrio fluvialis*: An unusual enteric pathogen of increasing public health concern. Int. J. Environ. Res. Public health. **7**: 3628-3643.

Islam, M.S., Drasar, B.S. and Sack, R.B. 1996. *Ecology of Vibrio cholerae* 6: role of aquatic fauna and flora. 1-41. Cholera and the Ecology of *Vibrio cholerae*. Edited by B.S. Drasar and B.D. Forrest. Published in 1996 by Chapman & Hall, London. ISBN 978-94-010-7178-9.

Keast, A. and Riley, T.V. 1997. Identification of *Vibrio* spp. with the 'string' test. Letters in Applied Microbiology. **25**: 106-108.

Komiazuk, M., Palczewska, M., Pikula, S., and Groves, P. 2015. Bacterial type AB<sub>5</sub> enterotoxins – structure, function and mechanism of action. Postepy Biochemii. **61**(4): 430-435.

Laviad-Shitrit, S., Izhaki, I., Arakawa, E., and Halpern, M. 2018. Wild waterfowl as potential vectors of *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* species. Tropical Medicine and International Health. **23**: 758-764.

Laviad-shitrit, S., Izhaki, I., and Halpern, M. 2019. Accumulating evidence suggests that some waterbird species are potential vectors of *Vibrio cholerae*. PLoS Pathog. **15**(8): e1007814.

Lekshmi, N., Joseph, I., Ramamurthy, T., and Thomas, S. 2018. Changing facades of *Vibrio cholerae*: An enigma in the epidemiology. Indian J Med Res **147**: 133-141.

León, A., Acedo, E., Gómez-Gil, B., Quiñones, E. I., Nevárez-Martínez, M., and Noriega-Orozco, L. 2013. Relationship of aquatic environmental factors with the abundance of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio mimicus* and *Vibrio vulnificus* in the coastal area of Guaymas, Sonora, Mexico. Journal of Water and Health. **11**: 700-712.

- Leyton, Y., and Riquelme, C. 2008. Vibrios en los sistemas marinos costeras. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. **43**: 441-456.
- Lutz, C., Erken, M., Noorian, P., Sun, S., and McDougald, D. 2013. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Frontiers in Microbiology*. **4**: 1-15.
- MacFaddin, J.F. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ed, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires-Argentina, 850 pp.
- Maguiña, C., Seas, C., Galán, E., y Santana, J. 2010. Historia del cólera en el Perú en 1991. *Acta Med. Per.* **27**: 212-17.
- Mariazza, J., Burger, L., Arenas, J., Burger, H., y Barrientos, J. 2006. Ecología del río Lurín en la zona de su desembocadura y su importancia médica. *Boletín de Lima*. **143**: 28-37.
- Martinelli, J. E., Lopes, R. M., Rivera, I. N., and Colwell, R. R. 2011. *Vibrio cholerae* O1 detection in estuarine and coastal zooplankton. **33**: 51-62.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., and Pfaller, M. A. 2017. *Microbiología médica*. 8ed, Editorial Elsevier, Barcelona-España, 836 pp.
- Nahar, S., Sultana, M., Naser, M., Nair, G. B., Watanabe, H., Ohnishi, M., Yamamoto, S., Endtz, H., Cravioto, A., Sack, R. B., Hasan, N. A., Sadique, A., Huq, A., Colwell, R. R., and Alam, M. 2012. Role of shrimp chitin in the ecology of toxigenic *Vibrio cholerae* and cholerae transmission. *Frontiers in Microbiology* **2**: 260.
- Ogg, J.E., Ryder, R.A., and Smith Jr. H.L. 1989. Isolation of *Vibrio cholerae* from aquatic birds in Colorado and Utah. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 95-99.
- Pal, P. 2014. Role of cholera toxin in *Vibrio cholerae* infection in humans – A review. *International Letters of Natural Sciences*. **22**: 22-32.
- Pruzzo, C., Vezzulli, L., and Colwell, R.R. 2008: Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin. *Environ. Microbiol.* **10**: 1400-1410.
- Ramamurthy, T., Chowdhury, G., Pazhani, G., and Shinoda, S. 2014. *Vibrio fluvialis*: an emerging human pathogen. *Frontiers in Microbiology*. **5**: 1-9.
- Rauffman, J.P. 1998. Cholera. *The american journal of medicine*. **104**: 386-394.

- Rhodes, M. and Kator, H. 1988. Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. In estuarine environments. **54**: 2902-2907.
- Robles, L.A., García, R.M., y Torres, J. 1999. Toxinas de *Vibrio cholerae*. Una revisión. Revista Mexicana de Patología Clínica. **46**: 255-258.
- Rodríguez, J., López, P., Muñoz, J., y Rodríguez, N. 2010. Detección de *Vibrio cholerae* no toxigénico en aves migratorias y residentes (Charadriiformes) en una laguna costera del Nororiente de Venezuela. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. **22**: 122-126.
- Rodríguez, J., López, P., Muñoz, J., Rodríguez, N. y Fuentes, J. *Pseudomonas* sp. En aves migratorias y residentes (Charadriiformes) en el estado Sucre, Venezuela. 2008. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. **20**: 277-282.
- Romalde, J., Diéguez, A. L., Lasa, A., and Balboa, S. 2014. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. Frontiers in Microbiology. **4**: 1-11.
- Schulenberg, T. S., Stotza, D., Lane, F., O'neill, D.F. and Parker, T.A. 2010. Aves del Perú. Serie Biodiversidad Corbidi 01. Lima. 660 pp.
- SEDAPAL. 2004. Boletín periodístico. Edición digital. Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento.
- Senderovich, Y., Izhaki, I., and Halpern, M. 2010. Fish as reservoirs and vectors of *Vibrio cholerae*. PLoS ONE. **5**: e8607.
- Singleton, F.L., Attwell, R., Jangi, S., and Colwell, R.R. 1982. Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. Appl. Environ. Microbiol. **44**: 1047-1048
- Sullivan, T. J., and Neigel, J. E. 2018. Effects of temperature and salinity on prevalence and intensity of infection of blue crabs, *Callinectes sapidus*, by *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* in Louisiana. Journal of Invertebrate Pathology **151**: 82-90.
- Tamplin, M.L., Gauzens A.L., Huq, A., Sack, D.A., and Colwell R.R. 1990. Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. Appl. Environ. Microbiol. **56**: 1977-1980.
- Tarequl, M., Alam, M., and Boucher, Y. 2017. Emergence, ecology, and dispersal of the pandemic generating *Vibrio cholerae* lineage. International Microbiology. **20**: 106-115.
- Tatah, J. F., and Pulcherie, C. 2014. Water sources as reservoirs of *Vibrio cholerae* O1 and non-O1 strains in Bepanda, Douala (Cameroon): relationship between isolation and physico-chemical factors. Akoachere and Mbuntcha BMC infectious Diseases. **14**: 1-10.

Zhang, R., Scott, D., Westbrook, M., Nance, S., Spangler, B., Shipley, G., and Westbrook, E. 1955. The three-dimensional crystal structure of cholera toxin. *J. Mol. Biol.* **251**: 563-573.

## XII. ANEXOS

**Tabla 1.** Caracterización de las especies de *Vibrio*

	<i>V. cholerae</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>
Sacarosa	+	+	+
Oxidasa	+	+	+
String Test	+	+	+
Catalasa	+	+	+
Tinción Gram	-	-	-
Morfología	BC	BC	BC
TSI	K/A --	A/A --	K/A ++-
LDC	+	-	-
Citrato	+	+	+
Indol	+	+	+
Motilidad	+	+	+
0% NaCl	+	-	+

+: Positivo; -: negativo; BC: Bacilo curvo; TSI: Triple sugar iron; LDC: Lisina descarboxilasa; 0% NaCl: Desarrollo sin sal

**Tabla 2.** Cepas de *Vibrio* a partir de aves acuáticas

	<i>V. cholerae</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>Vibrio</i> spp.
<i>C. vociferus</i>	-	-	-	1
<i>H. palliatus</i>	4	2	-	1
<i>L. atricilla</i>	1	2	5	1
<i>L. modestus</i>	-	-	-	1
<i>N. phaeopus</i>	-	-	-	1
<i>P. thagus</i>	1	-	-	-
<i>S. variegata</i>	1	-	-	-
<b>TOTAL de cepas (n=21)</b>	<b>7 (7.5%)</b>	<b>4 (4.3%)</b>	<b>5 (5.4%)</b>	<b>5 (5.4%)</b>

**Tabla 3.** Propiedades y bioquímica de los aislamientos de *V. cholerae* en aves acuáticas

CEPA	Fuente	Sac	Ox	Stg	Cat	Gram	TSI	LIA	Cit	Ind	Mot	0% NaCl	
1	La-4V	<i>L. atricilla</i>	+	+w	+	+	-	K/A --	K/K	+	+	+	+
2	LB-1.1	<i>S. variegata</i>	+	+	+	+	-	K/A --	K/K	+	+	+	+
3	Lab-2	<i>H. palliatus</i>	+	+	+	+	-	K/A --	K/K	+	+	+	+
4	La-d1	<i>H. palliatus</i>	+	+	+	+	-	K/A --	K/K	+	+	+	+
5	La-f2	<i>H. palliatus</i>	+	+	+	+	-	K/A --	K/K	+	+	+	+
6	La-g1	<i>H. palliatus</i>	+	+	+	+	-	K/A --	K/K	+	+	+	+
7	PT1-1	<i>P. thagus</i>	+	+	+	+	-	K/A --	K/K	+	+	+	+

Sac: sacarosa; Ox: oxidasa; Stg: test de String; Cat: catalasa; LIA: Lysine iron agar; Cit: citrato de Simmons; Ind: indol; Mot: motilidad; +w: positivo débil.

**Tabla 4.** Propiedades y bioquímica de aislamientos de *V. fluvialis* en reservorios acuáticos

CEPA	Fuente	Sac	Ox	Stg	Cat	Gram	TSI	LIA	Cit	Ind	Mot	0% NaCl	
1	La-a3	<i>H. palliatus</i>	+	+w	+	+	-	A/A --	K/A	+	+	+	-
2	H1-Q1	<i>H. palliatus</i>	+	+	+	+	-	A/A --	A/A	+	+	+	-
3	La-2.1	<i>L. atricilla</i>	+	+w	+	+	-	A/A --	A/A	+	+	+	-
4	La-2.2	<i>L. atricilla</i>	+	+w	+	+	-	A/A --	A/A	+	+	+	-
5	Cru-1.1	<i>O. gaudichaudii</i>	+	+	+	+	-	A/A --	K/A	+	+	+	-
6	Me-1A	Mesias	+	+	+	+	-	A/A --	A/A	+	+	+	-
7	Me-1B	Mesias	+	+	+	+	-	K/A --	K/A	+	+	+	-

**Tabla 5.** Propiedades y bioquímica de los aislamientos de *V. furnissii* en aves acuáticas

CEPA	Fuente	Sac	Ox	Stg	Cat	Gram	TSI	LIA	Cit	Ind	Mot	0% NaCl	
1	ATR4-1	<i>L. atricilla</i>	+	+	+	+	-	K/A ++ -	K/A	+	+	+	+
2	ATR4-2	<i>L. atricilla</i>	+	+	+	+	-	K/A +-	K/A	+	+	+	+
3	ATR4-3	<i>L. atricilla</i>	+	+w	+	+	-	K/A +-	K/A	+	+	+	+
4	ATR4-4	<i>L. atricilla</i>	+	+	+	+	-	K/A +++ -	K/A	+	+	+	+
5	ATR4-5	<i>L. atricilla</i>	+	+	+	+	-	K/A +++ -	K/A	+	+	+	+

**Tabla 6.** Otras cepas bacterianas (no-Vibrionaceae) aisladas en los diferentes reservorios

	<i>Citrobacter</i>	<i>Cromobacterias</i>	<i>Escherichia coli</i> R	<i>Enterobacteriaceae</i> ND	Grupo P-M-P	No Fermentador	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella</i> spp.	Biotipo ND
Agua bocana	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Agua MESIAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Algas	-	-	-	-	-	-	-	-	4
<i>C. atratus</i>	-	-	-	2	-	-	-	-	3
<i>C. vociferus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>H. palliatus</i>	1	1	-	-	3	1	-	1	11
<i>L. atricilla</i>	1	2	1	2	2	-	1	1	6
<i>L. modestus</i>	-	-	-	2	-	1	-	-	5
<i>N. phaeopus</i>	1	-	-	9	7	-	-	-	6
<i>O. gaudichadii</i>	1	-	-	-	-	1	-	1	5
<i>P. bougainvilli</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>P. thagus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>S. variegata</i>	-	-	-	2	-	-	-	-	-
<b>TOTAL (n=91)</b>	4 (3%)	4 (3%)	1 (1%)	17 (14%)	12 (10%)	4 (3%)	1 (1%)	3 (3%)	45 (38%)

Enterobacteriaceae ND: Enterobacteriaceae no determinada; Grupo P-M-P: Grupo *Proteus-Morganella-Provencia*; Biotipo ND: Biotipo no determinado

**Tabla 7.** Propiedades y bioquímica de los aislamientos de *Salmonella* spp.

CEPA	Fuente	Sac	Ox	Stg	Cat	Gram	TSI	LIA	
1	La-f3	<i>H. palliatus</i>	+	-	-	+	-	K/A -++++	K/K
2	LA-4G	<i>L. atricilla</i>	-	-	-	+	-	K/K +++++	K/K
3	Cru-4.1	<i>O. gaudichaudii</i>	-	-	-	+	-	K/A -++++	K/K

**Tabla 8.** Propiedades y bioquímica de los aislamientos de *C. freundii*

CEPA	Fuente	Sac	Ox	Stg	Cat	Gram	TSI	LIA	Mot	
1	LA-4F	<i>L. atricilla</i>	+	-	-	+	-	A/A +++++	K/A	+
2	CRU-2.2	<i>O. gaudichaudii</i>	+	-	-	+	-	A/A +++++	K/A	+
3	H7-1R	<i>H. palliatus</i>	+	-	-	+	-	A/A +++ +++++	K/A	+
4	ZP1-3	<i>N. phaeopus</i>	+	-	-	+	-	A/A ++ +++++	K/A	+

**Tabla 9.** Propiedades y bioquímica del grupo *Proteus-Morganella-Providencia*

CEPA	Fuente	Sac	Ox	Stg	Cat	Gram	TSI	LIA	Cit	Ind	Mot	
1	NU1-3	<i>N. phaeopus</i>	+w	-	-	+	-	A/A --	R/A	-	+	-
2	NU7-1	<i>N. phaeopus</i>	-	-	-	+	-	A/A <sup>R</sup> --	R/A	+	-	-
3	H3-1	<i>H. palliatus</i>	+	-	-	+	-	K/A --	R/A	+	-	-
4	H5-1	<i>H. palliatus</i>	-	-	-	+	-	K/A --	R/A	+	-	-
5	H6-1	<i>H. palliatus</i>	+	-	-	+	-	K/A +-	R/A	+	-	-
6	NU2-1	<i>N. phaeopus</i>	+w	-	-	+	-	A/A --	R/A	-	+	-
7	NU4-2	<i>N. phaeopus</i>	+	-	-	+	-	K/A --	R/A	+	-	-
8	NU6-2	<i>N. phaeopus</i>	+w	-	-	+	-	K/A --	R/A	+	-	-
9	NU7-2	<i>N. phaeopus</i>	+w	-	-	+	-	A/A <sup>R</sup> --	R/A	-	-	-
10	NU1-2	<i>N. phaeopus</i>	+w	-	-	+	-	A/A --	R/A	-	+	-
11	ATR2-2	<i>L. atricilla</i>	+	-	-	+	-	K/A --	R/A	-	-	+
12	ATR2-3	<i>L. atricilla</i>	+w	-	-	+	-	K/A +-	R/A	-	-	-

**Tabla 10.** Ornitofauna avistada en el estuario de Lurín

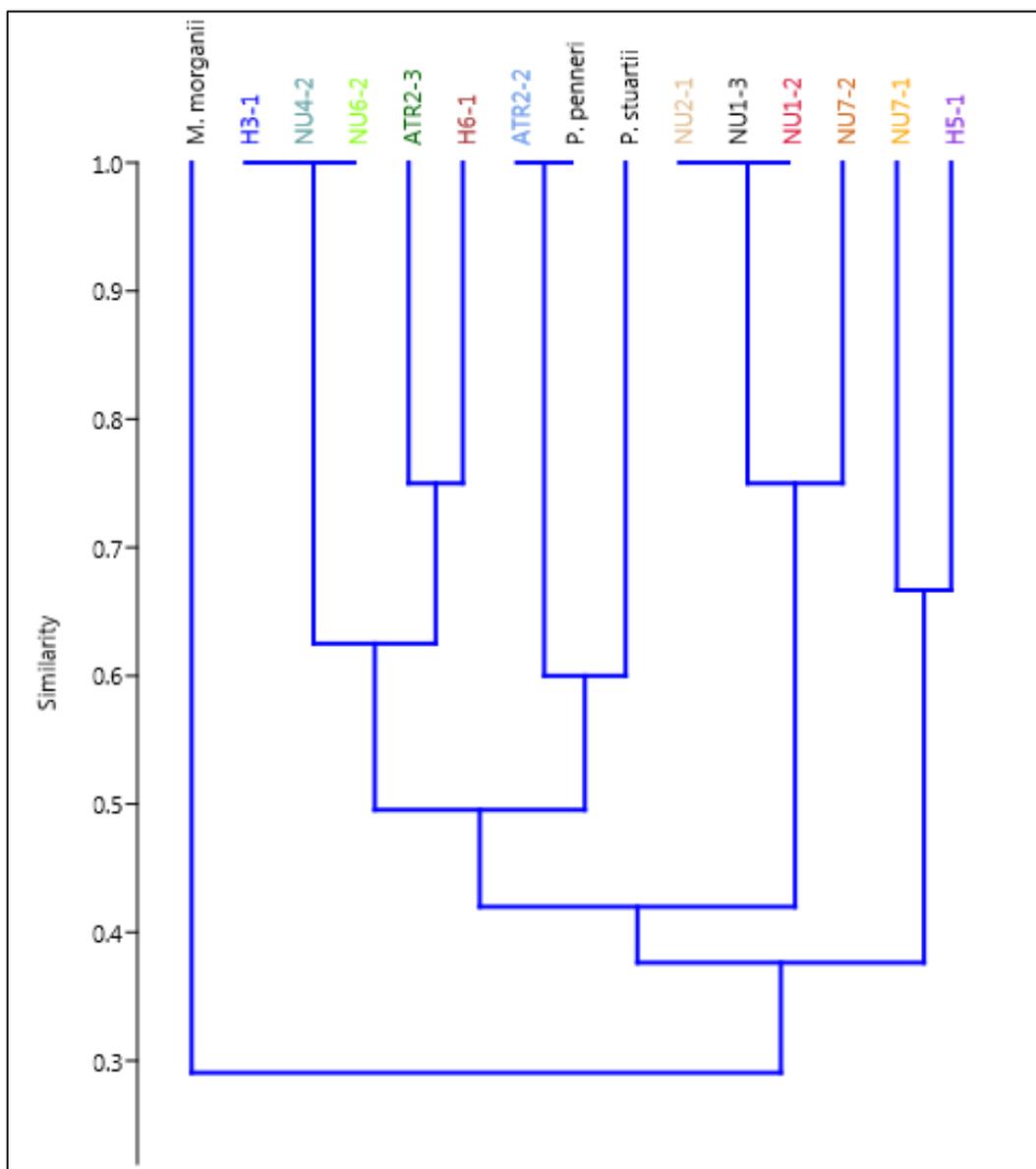
Nombre científico	Nombre común
<i>Calidris</i> sp.	Playerito
<i>Charadrius vociferus</i> †	Chorlo gritón
<i>Charadrius semipalmatus</i>	Chorlo semipalmado
<i>Haematopus palliatus</i> †	Ostrero americano
<i>Leucophaeus belcheri</i>	Gaviota peruana
<i>Leucophaeus modestus</i> †	Gaviota gris
<i>Leucophaeus atricilla</i> †	Gaviota reidora
<i>Numenius phaeopus</i> †	Zarapito trinador
<i>Pelecanus thagus</i> †	Pelicano peruano
<i>Phalacrocorax boungainvilli</i>	Cormorán guanay
<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	Cormorán neotropical
<i>Rynchops niger</i>	Rayador negro
<i>Sula variegata</i>	Piquero peruano
<i>Tringa flavipes</i>	Playero pata amarilla menor

† : Aves portadoras de *Vibrio* spp.

**Tabla 11.** Ornitofauna avistada en el río y estuario de Lurín

Nombre científico	Nombre común
<i>Ardea alba</i>	Garza blanca
<i>Bubulcus ibis</i>	Garcita bueyera
<i>Calidris sp.</i>	Playerito
<i>Cathartes aura</i>	Gallinazo de cabeza roja
<i>Charadrius vociferus</i> †	Chorlo gritón
<i>Charadrius semipalmatus</i>	Chorlo semipalmado
<i>Columbina cruziana</i>	Tortolita peruana
<i>Columba livia</i>	Paloma doméstica
<i>Coragyps atratus</i>	Gallinazo cabeza negra
<i>Crotophaga sulcirostris</i>	Garrapatero de pico estriado
<i>Dives sp.</i>	Tordo
<i>Egretta caerulea</i>	Garcita azul
<i>Egretta thula</i>	Garcita blanca
<i>Gallinula chloropus</i>	Polla de agua común
<i>Haematopus palliatus</i> †	Ostrero americano
<i>Himantopus mexicanus</i>	Cigüeñela de cuello negro
<i>Hirundo rustica</i>	Golondrina tijereta
<i>Leucophaeus belcheri</i>	Gaviota peruana
<i>Leucophaeus modestus</i> †	Gaviota gris
<i>Leucophaeus atricilla</i> †	Gaviota reidora
<i>Numenius phaeopus</i> †	Zarapito trinador
<i>Nycticorax nycticorax</i>	Huaco
<i>Pelecanus thagus</i> †	Pelicano peruano
<i>Phalacrocorax boungainvilli</i>	Cormorán guanay
<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	Cormorán neotropical
<i>Plegadis ridgwayi</i>	Yanavico
<i>Pyrocephalus rubinus</i>	Turtupilín
<i>Rynchops niger</i>	Rayador negro
<i>Sula variegata</i>	Piquero peruano
<i>Tringa flavipes</i>	Playero pata amarilla menor
<i>Troglodytes aedon</i>	Cucarachero común
<i>Volatinia jacarina</i>	Saltapalito
<i>Zenaida meloda</i>	Cuculí

**Figura 2.** Dendrograma del índice de similaridad de Jaccard entre cepas aisladas del grupo *Proteus-Morganella-Providencia* entre cepas estándar de la CDC.



**Figura 3. Informe de resultado (INS) de Vibrio cholerae non-O1/non-O139.**



**MINISTERIO DE SALUD DE PERÚ**  
**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD**  
 ORGANISMO PÚBLICO EJECUTOR DEL SECTOR SALUD  
*"Investigar para proteger la salud"*

**INFORME DE RESULTADO**

<b>CODIGO DE ORIGEN</b>	1		
<b>ESTABLECIMIENTO</b>	INSTITUTO NACIONAL DE SALUD		
<b>LABORATORIO</b>	ENTEROPATOGENOS		
<b>ENFERMEDAD</b>	ENTEROPATOGENOS		
<b>MÉDICO</b>			
<b>DOC REFERENCIA</b>	NI2692019EPTDEETCNSPINS	<b>FECHA DE OBTENCION DE MUESTRA</b>	08/07/2019
<b>TIPO DE MUESTRA</b>	CEPA	<b>FECHA DE RECEPCION LAB REG</b>	
<b>CODIGO DE MUESTRA</b>	INS074086219	<b>FECHA DE RECEPCION EN INS</b>	24/07/2019

**PRUEBAS**

CULTIVO Y TIPIFICACION ENTEROPATOGENOS	Res Laboratorio de Origen:	Res Lab Referencial	COMENTARIOS
Vibrio cholerae no O1 Negativo a O139 Código LANARE		Fecha:03/09/2019 Vibrio cholerae no O1 Negativo a O139 3.1360-2019	Investigación por PCR: negativo para toxina colérica

Observaciones:

Capec Yupanqui 1400 Telefono 4719920 Jesus Maria Lima 11

<https://www.netlab.ins.gob.pe>

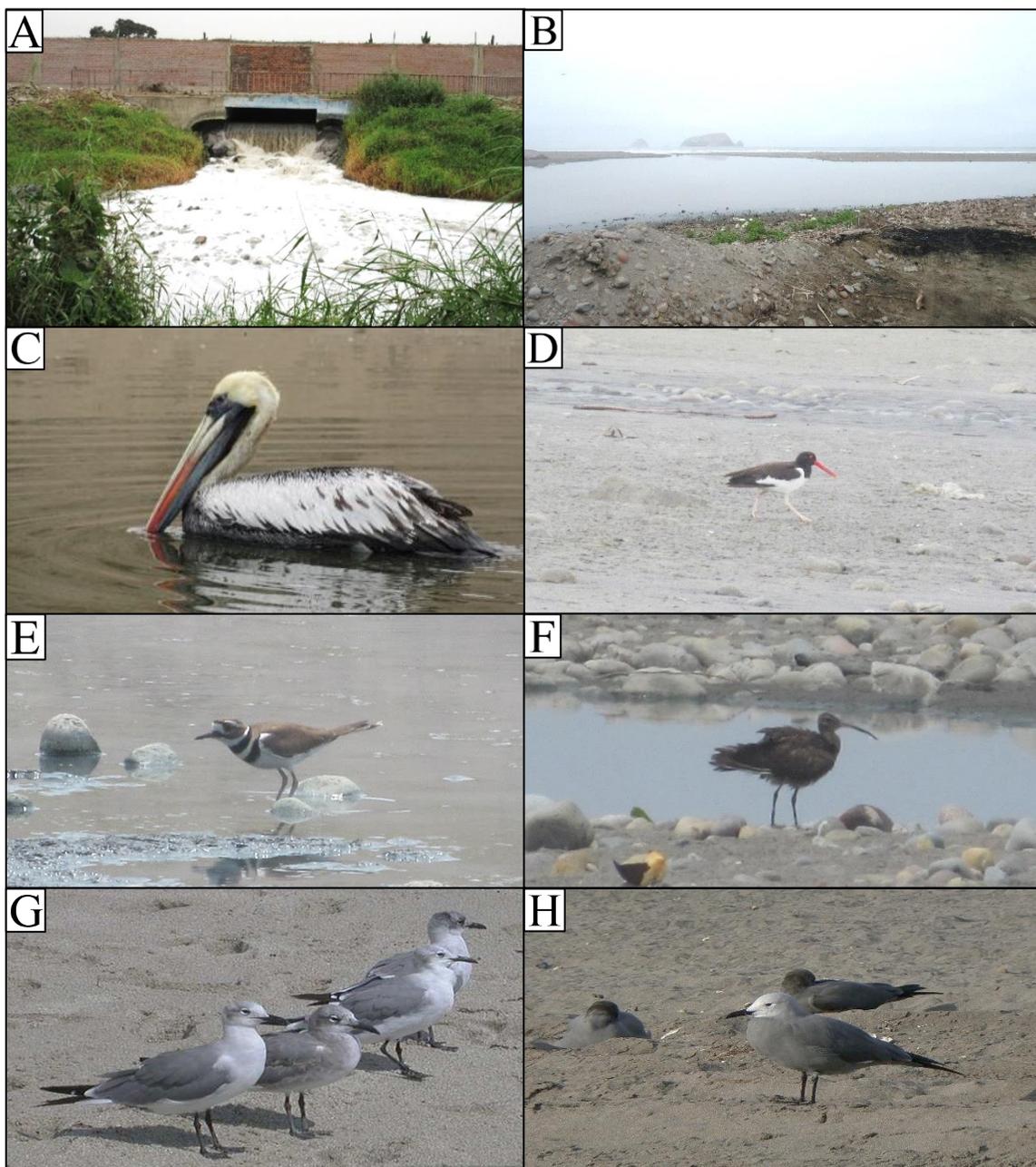


**COORD. DE LABORATORIO:**  
 Willi Quino Sifuentes  
 CTMP 5692

Fecha: 03/09/2019 Hora: 5:05 p.m.

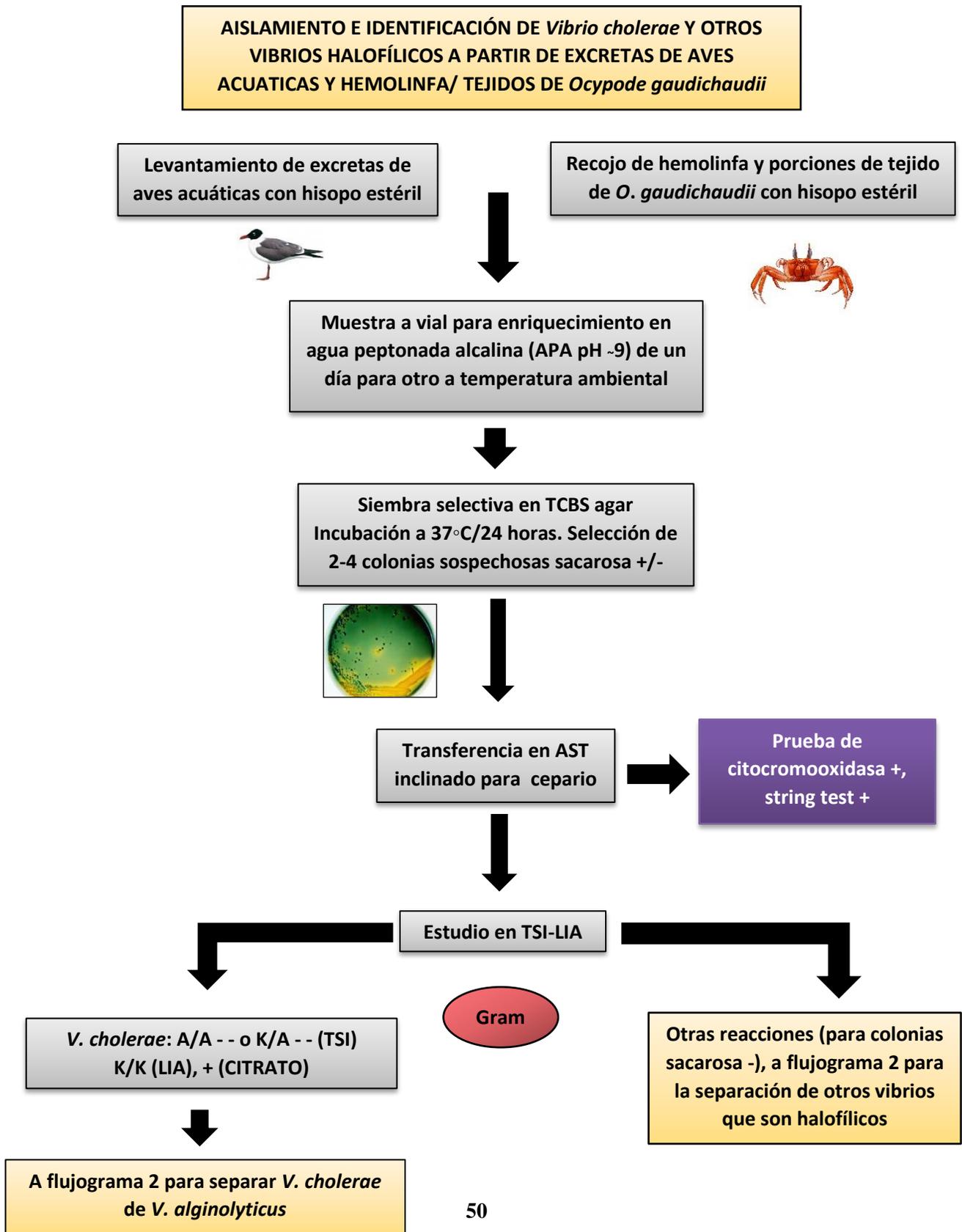
 Usted se encuentra en una zona segura

**Figura 4. Registro fotográfico**



**Fig 4.** A) Efluente MESIAS; B) Estuario de Lurín; C) *P. thagus*; D) *H. palliatus*; E) *C. vociferus*; F) *N. phaeopus*; G) *L. atricilla*; H) *L. modestus*.

**Flujograma 1.** Aislamiento e identificación de *V. cholerae* y vibrios halofílicos a partir de excretas de aves acuáticas y hemolinfa/ tejidos de *O. guadichaudii*



Flujograma 2. Identificación bioquímica de *V. cholerae* y vibrios halofílicos patógenos

