



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
ESCUELA DE POSGRADO

“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN  
FENOTÍPICA DE CEPAS DE *Vibrio* spp. Y  
*Salmonella* spp. CON POTENCIAL  
ZONÓTICO, PRESENTES EN *Donax*  
spp.(PALABRITAS) PROCEDENTES DE  
BANCOS NATURALES DE LA REGIÓN  
LAMBAYEQUE: DETERMINACIÓN DEL  
PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS  
PRINCIPALES ANTIBIÓTICOS USADOS  
EN LA SALUD HUMANA”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN  
SANIDAD ACUÍCOLA

MVZ Rosa Luz Fernández Fernández

LIMA – PERU

2018



**ASESOR DE TESIS**

Carlos Shiva Ramayoni, MVZ, MSc, DVM

**MIEMBRO DE JURADO**

Dr. Luis Miguel Jara Salazar

Dra. Cielo Llerena Zavala

Mg. Néstor Gerardo Falcón Pérez

## **DEDICATORIA**

A mis padres, porque ellos me brindan día a día cosas no materiales que me hacen ser una mejor persona.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi madre, por la paciencia que siempre me brinda cuando más la he necesitado, especialmente durante el primer muestreo.

A mi padre, por demostrar su apoyo incondicional tanto en casa como fuera de ella.

Al Dr. Carlos Shiva, por su tiempo, guía y conocimientos brindados para que esta investigación culmine con éxito.

Al Sr. Lorenzo Olivera y familia, por el tiempo dedicado durante mis visitas a Lambayeque.

A Karolina De La Cruz, por la paciencia y conocimientos brindados durante la ejecución de la tesis.

A cada uno de mis amigos, que de una u otra manera ayudaron a la culminación de este trabajo.

Finalmente, al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la UPCH subvencionado por Cienciactiva del CONCYTEC (Convenio de Gestión N° 230-2015 FONDECYT), por el apoyo financiero brindado para la capacitación y ejecución de este estudio.

## TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE TABLAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE ANEXOS

I. INTRODUCCIÓN	1
II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	4
1. Planteamiento del problema	4
2. Marco teórico	5
2.1 <i>Donax</i> spp.	6
2.2 Agentes causales de enfermedades transmisibles por alimentos	6
2.2.1 <i>Vibrio</i> spp.	6
2.2.1.1 <i>Vibrio alginolyticus</i>	7
2.2.1.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	8
2.2.1.3 <i>Vibrio fluvialis</i>	9
2.2.1.4 Aislamiento e identificación de <i>Vibrio</i> spp.	9
2.2.1.5 Tratamiento para <i>Vibrio</i> spp.	10

<b>2.2.2 <i>Salmonella</i> spp.</b>	<b>11</b>
<b>2.2.2.1 Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> spp.</b>	<b>11</b>
<b>2.3 Resistencia antibiótica</b>	<b>12</b>
<b>2.3.1 Perfil de susceptibilidad antibiótica</b>	<b>12</b>
<b>2.3.2 Antibióticos usados en humanos para gastroenteritis</b>	<b>13</b>
<b>2.3.2.1 Ampicilina</b>	<b>13</b>
<b>2.3.2.2 Ciprofloxacina</b>	<b>13</b>
<b>2.3.2.3 Cloranfenicol</b>	<b>14</b>
<b>2.3.2.4 Sulfatrimetropim</b>	<b>15</b>
<b>2.3.2.5 Tetraciclina</b>	<b>15</b>
<b>III. ANTECEDENTES</b>	<b>16</b>
<b>IV. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN</b>	<b>19</b>
<b>V. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>1. Hipótesis</b>	<b>22</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>22</b>
<b>2.1 General</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Específicos</b>	<b>22</b>

<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
<b>VII. RESULTADOS</b>	<b>32</b>
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	<b>36</b>
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	<b>49</b>
<b>X. RECOMENDACIONES</b>	<b>50</b>
<b>XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>51</b>
<b>XII. ANEXOS</b>	<b>60</b>

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.-** Aislamientos positivos a *Vibrio* spp. según procedencia de *Donax* spp.

**Tabla 2.-** Frecuencia de muestras positivas a *Vibrio* spp. durante los meses de muestreo por lugar de procedencia..

**Tabla 3. –** Identificación de especies de *Vibrio* spp. y sensibilidad al agente vibriostático O/129 por playa muestreada.

**Tabla 4.-** Porcentaje de aislados de especies de *Vibrio* spp. resistentes a Ampicilina

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1.-** Perfil de susceptibilidad antibiótica de las muestras positivas a *Vibrio* spp. según playa muestreada

## LISTA DE ANEXOS

**Anexo 1.** Ubicación de los lugares de muestreo : Playa Los Lobos (A), Playa Santa Rosa (B) y Playa San Pedro (C). Lambayeque, Perú. (Fuente: Google Maps®).

**Anexo 2.** Muestreo realizado de manera manual para la colección de *Donax* spp.. Lugar: Playa Santa Rosa.

**Anexo 3.** Medición de longitud valvar de ejemplar de *Donax* spp. con vernier, acorde a la talla comercial (22 mm de longitud).

**Anexo 4.** Aislado compatible a *Vibrio* spp. en agar TCBS.

**Anexo 5.** Aislado sensible al agente vibriostático O/129.

**Anexo 6.** Antibiograma realizado en aislado compatible a *Vibrio* spp. [resistencia a Ampicilina en la placa 73 (izquierda) y sensibilidad a todos los anitbióticos usados en la placa 42 (derecha)]

## RESUMEN

La maricultura en el Perú posee grandes expectativas en el sector acuícola, siendo la *Donax* spp. “palabritas” uno de los recursos hidrobiológicos más valorados en el norte del país, el cual se extrae de manera libre y artesanal de bancos naturales. Debido a la naturaleza filtradora de este molusco bivalvo y a la contaminación ambiental de fuentes hídricas aledañas, el consumo de este recurso representa un riesgo a la salud de los consumidores. El objetivo del estudio fue aislar y caracterizar fenotípicamente cepas de *Vibrio* spp. y *Salmonella* spp. aisladas en *Donax* spp. “palabritas” de bancos naturales de la región Lambayeque, Perú en la zona de Eten, Mórrope y Santa Rosa. Se utilizó los protocolos para el análisis microbiológico de alimentos del Food & Drugs Administration para el aislamiento de colonias, mientras que el kit comercial API 20 E se utilizó para la caracterización bioquímica. Por caracterización bioquímica se determinó que el 89,5% (43/48) de aislados fueron compatibles a *Vibrio* spp, todos sensibles al agente vibriostático O/129. Se encontró que el 88,4% (38/43) resultó compatible para *V. alginolyticus*, y el 11,6% (5/43) para *V. fluvialis*. No se encontraron aislados compatibles con *Salmonella* spp. Además, se usó el método Kirby-Bauer para determinar el perfil de susceptibilidad a los principales antibióticos usados en la salud humana para casos de vibriosis y salmonelosis. Es así que se identificó un 39,5% (17/43) de cepas de *V. alginolyticus* resistentes a Ampicilina.

**Palabras clave:** Moluscos bivalvos, resistencia antibiótica, gastroenteritis, vibriosis, salmonelosis

## ABSTRACT

Mariculture in Peru is optimistic in the aquaculture sector, being the *Donax* spp. "palabritas" one of the most valued hydrobiological resources in the north of the country, which is extracted in a free and traditional way from natural banks. Due to the filtering nature of this bivalve mollusk and the environmental contamination of nearby water sources, the consumption of this resource represents a risk to the health of consumers. The objective of the study was to isolate and characterize phenotypically strains of *Vibrio* spp. and *Salmonella* spp. Inserted in *Donax* spp. "palabritas" from natural banks of the Lambayeque, Peru in the area of Eten, Mórrope and Santa Rosa. The protocol for the microbiological analysis of food from the Food & Drugs Administration was used for the isolation of colonies, while the commercial kit API 20 was used for the biochemical characterization. By biochemical characterization, it was determined that 89.5% (43/48) of isolates were compatible with *Vibrio* spp, all those sensitive to the vibronatics agent O / 129. It was found that 88.4% (38/43) was compatible for *V. alginolyticus*, and 11.6% (5/43) for *V. fluvialis*. There are no isolates compatible with *Salmonella* spp. In addition, the Kirby-Bauer method was used to determine the profile of susceptibility to the main antibiotics used in human health for cases of vibriosis. Thus, 39.5% (17/43) of strains of *V. alginolyticus* resistant to Ampicillin were identified.

**KEY WORDS:** Bivalve molluscs, antibiotic resistance, gastroenteritis, vibriosis, salmonellosis

## I. INTRODUCCIÓN

En el Perú, la acuicultura representa el sector de producción que tiene mayor crecimiento, con respecto a la producción de alimento de origen animal, incluso superando la producción mundial de carne de vacuno en el 2013. (Vela *et al.*, 2013). Esta actividad se ha incrementado notablemente, siendo la maricultura la que genera los mayores volúmenes de producción (72%) y divisas (Baltazar y Palacios, 2015). Por otro lado, para el año 2012 la pesca artesanal contribuía con el 0,38% del Producto Bruto Interno (PBI), esto a pesar de ser mínimo comparado con la pesca industrial, significa para el pescador artesanal ingresos, reducción a la pobreza y acceso a productos hidrobiológicos para su alimentación. (Guevara-Carrasco *et al.*, 2017).

Uno de los pilares en la industria alimentaria es la inocuidad del producto, siendo este un requisito indispensable de calidad de los entes reguladores. Además, garantiza al consumidor, cada vez más exigente, que el producto está sanitariamente aprobado. Lamentablemente, la acción antropogénica ha provocado cierto deterioro ambiental en zonas de cultivo de especies marinas (principalmente) y lacustres, llevando a un producto final deficiente, representando un riesgo para la salud pública como una fuente de contaminación. A raíz de esto, a nivel mundial se vienen estableciendo

controles de vigilancia para evitar el progreso de la contaminación de ecosistemas acuáticos, y garantizar la inocuidad del producto hidrobiológico.

La importancia de evaluar microbiológicamente el tejido de moluscos radica en que estos son animales filtradores y por ende, indicadores indiscutibles de presencia de contaminantes en el medio, sumado a la acumulación de estos tiende a ser más selectiva y dependerá de la concentración de dichos contaminantes (Barqueiro - Cárdenas. *et al*, 2007). Además de que cada organismo es diferente, por lo que la bioacumulación de agentes contaminantes puede llegar a variar entre ejemplares. El principal problema de la contaminación del producto hidrobiológico, es en su mayoría la transmisión de enfermedades gastrointestinales, produciendo diarreas con severidad media a alta, llegando al peor de los casos a la muerte del consumidor. Tal es el caso del riesgo de contraer enfermedades víricas, principalmente Hepatitis A, norovirus, y en el caso de enterobacterias, *Salmonella* y *Vibrio* spp.

En el Perú existen zonas de cultivo y bancos naturales de moluscos, principalmente en el norte del país, donde se encuentran áreas disponibles para el desarrollo de este cultivo marino y de otras especies potenciales (algas marinas, peces y otros recursos bentónicos) para el desarrollo de la maricultura, siendo la recolección de la especie *Donax* spp. “palabritas” (Carbajal W.*et al.*,

2005), una de las principales actividades extractiva para los pobladores del norte del país.

Hasta la presente, son constantes las prohibiciones que se establecen para la extracción de “palabritas” *Donax* spp en la mayoría de playas del norte del país por riesgo de contraer enfermedades como hepatitis, ya que presenta una fuente de contaminación a causa de la actividad industrial y citadina de la región, lo cual representa una foco de contaminación para cualquier cultivo marino poniendo en riesgo el producto hidrobiológico y la salud pública, por lo que urge tener un conocimiento de la situación sanitaria de la zona.

## II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

### 1. Planteamiento del problema

Teniendo en cuenta la importancia de la maricultura en el Perú (Baltazar y Palacios, 2015) y el potencial del molusco *Donax* spp. “palabrita” para su cultivo (IMARPE, 2010), es necesario que este recurso recobre la importancia económica si se llegara a cultivar en un ambiente controlado o extraído de bancos naturales sanitariamente aprobados. Actualmente, representa un posible causante de ETAs o cuadros gastrointestinales para el consumidor directo ya que este recurso se extrae de manera libre en zonas con alto índice de contaminación.

En países como Italia y México, se ha evidenciado la presencia de patógenos como *Vibrio* spp. y *Salmonella* spp. en moluscos bivalvos. Por otro lado, se evidencia una constante contaminación tanto de ambientes marinos como fluviales en territorio peruano; por lo que es necesario saber la situación sanitaria actual del recurso con un plan de contingencia destinado a la extracción para el mercado local.

## 2. Marco teórico

Una de las principales regiones destinada y con miras a mejorar su desarrollo acuícola, se encuentra en el norte del país, cuyo litoral representa un frente costero de aproximadamente 615 km, en el cual presenta una gran biodiversidad de peces (126 especies), moluscos (75 especies), crustáceos (43 especies), entre otros. De esta última, las principales especies de *Donax spp.* son *D. asper*, *D. dentifer*, *D. mancorensis*, *D. marincovich* y *D. peruvianus* o *D. obesulus* (Paredes C. y Cardoso F., 2001; IMARPE, 2010)

La zona costera de Lambayeque, se caracteriza por la pesca con revoleo, con cortina, atarraya y extracción de *Donax spp* (Carbajal *et.al*, 2005). Aunque no se cuenta con un registro detallado de extracción de este recurso en la pesca artesanal, se ha determinado la población estimada comprendida por 31,67 millones de individuos  $\pm$  31,43 % y biomasa, de 106,13 t  $\pm$  36,34%. Se registró mayor abundancia en las zonas de El Palo y El Gigante, con 11,45 y 9,87 millones de individuos, respectivamente (Llanos J. *et al.*, 2009); sin embargo, los bancos ubicados entre Etén y La Casa, corresponden a los principales lugares elegidos por los pobladores para la extracción de palabritas debido a su fácil acceso.

## **2.1 *Donax* spp.**

De la familia Donacidae, es comúnmente llamado “palabrita”, “conchita mariposa” o “señorita” en Perú; pero identificado como *D. peruvianus* o *D. obesulus* (Estrella *et al.*, 2000). En general, posee una concha convexa y ovalada con umbos pocos salidos pero redondeados, que se levantan sobre la línea articular; y de coloración externa blanquecina con tonalidades violáceas e interior púrpura (Gonzales *et al.*, 2009).

Este molusco bivalvo habita en las zonas intermareal, submareal y arenoso, salvo en la etapa larval que es pelágica. De características suspensívoras y de capacidad filtradora, a nivel mundial se han reportado 45 especies (Coan *et al.*, 2000), de las cuales el 74% se encuentran en aguas tropicales y el 21% en aguas frías. En el Perú, se encuentra a lo largo de toda la costa peruana, principalmente en Piura, Lambayeque, Lima e Ica. En estas zonas, se cuenta con ejemplares como *D. asper*, *D. dentifer*, *D. mancorensis*, *D. marincovichi*.

## **2.2 Agentes causales de enfermedades transmisibles por alimentos**

### **2.2.1 *Vibrio* spp.**

De la familia Vibrionaceae, son bacterias Gram negativas, bacilos rectos o curvos de 0.5-0.3 $\mu$ m x 1.4-2.6 $\mu$ m, anaerobios facultativos y oxidasa positiva.

Habita naturalmente en los ecosistemas marinos y fluviales. En este último, poseen la capacidad de mantenerse virulentos y sin multiplicarse. Es una bacteria dependiente del ion sodio, el cual estimula su crecimiento y favorece la rapidez de este. No obstante, se ha demostrado que en algunos casos es posible la sustitución de NaCl por KCl. Se ha registrado 65 especies, de las cuales 12 resultan patógenas para el ser humano. Entre las principales del género se tienen: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. vulnificus*.

La mayoría de especies de este género están relacionadas a infecciones del tracto gastrointestinal, existiendo de tipo colérico y no colérico. Para la primera situación, causada por *V. cholerae* (serogrupos 0:1 y 0:139) generando la forma epidémica de cólera; mientras que la no colérica, por diferentes serogrupos de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. hollisae*, *V. fluvalis* (Vila *et al.*, 2009). Además, se ha descrito su relación en patologías extraintestinales, causando bacteremias como otitis, conjuntivitis e infecciones de tejidos blandos; principalmente en pescadores y bañistas.

#### **2.2.1.1 *Vibrio alginolyticus***

*V. alginolyticus* es una especie que fue identificada al principio como *V. parahaemolyticus* biotipo 2, para luego ser identificado como una especie totalmente diferente, con flagelos peritricos y polares (Zanetti *et al.*, 2000; Zavala *et al.*, 2005). Es un patógeno emergente en enfermedades transmitida

por alimentos. Desde 1979, fue asociado por Schmidt a infecciones de piel, oídos y ojos; incluso siendo aislado junto a *Salmonella* spp. En el caso de esta cepa, es considerada parte de la microbiota de ciertas especies marinas. Para su cultivo, es capaz de crecer en concentraciones de 3, 6, 8 y hasta 10% de NaCl, y en aguas con temperatura superior a 17°C (Zavala et al., 2005). Fermenta la sacarosa, por lo cual su crecimiento en agar T.C.B.S. representa colonias amarillas.

#### **2.1.1.2 *Vibrio parahaemolyticus***

*V. parahaemolyticus* es otra especie que fue identificada por primera vez en Japón asociada a una enfermedad transmitida por alimentos (sardinias), en 1959. Es causante de numerosos casos de gastroenteritis y epidemias, siendo catalogado como riesgo moderado de extensión limitada (ICMSF, 2002). También se han descrito casos asociados a infecciones y sepsis en ciertos pacientes (Carpenter, 2005). La mayoría de las cepas de esta especie (95%) posee como factor de virulencia la hemolisina o toxina termoestable directa (TDH), causante de una alteración del flujo iónico de células intestinales, desencadenando una diarrea. En altas dosis es conocida como fenómeno de Kanagawa. Además, existe la toxina hemolisina relacionada (TRH), hemaglutininas, pili y otros factores de colonización y capacidad de invasión celular (Dabanch et al, 2008)

### **2.1.1.3 *Vibrio fluvialis***

Así también, *V. fluvialis* fue identificado por primera vez en aislados en 1975 y descrito en 1977. Es una bacteria Gram negativa, halófila con un flagelo polar que le permite su movilidad. Ocasiona diarreas tipo cólera, infecciones de piel asociadas a exposición en ambientes acuáticos (Igbinsa y Okoh, 2010)

### **2.1.1.4 Aislamiento e identificación de *Vibrio* spp.**

Al ser una bacteria halófila, se precisa de medios enriquecidos con cloruro de sodio (NaCl) en su mayoría. Para la fase de enriquecimiento, esta se realiza utilizando agua peptonada alcalina, a 35° a 42°C durante 6 a 8 h (Vila *et al.*, 2009). A pesar de que se pueden usar medios no selectivos como el agar nutritivo alcalino; existen aquellos selectivos como el Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS), con los cuales se pueden realizar cultivos a partir de heces, agua y alimentos.

Este agar permite el crecimiento de la mayoría de especies patógenas de *Vibrio* spp. para el hombre, con excepción de *V. hollisae*. La alta concentración de sodio favorece el crecimiento; el citrato y tiosulfato sódico, la bilis de buey y colato son agentes selectivos que al alcalinizar el pH(8.6 ±0.2), logran inhibir organismos grampositivos y suprimir coliformes. Se puede realizar siembra por

estría, agotando el inóculo; y tras incubación aerobia a 35°-37°C durante 24 h, las colonias obtenidas son de color amarilla a verde azuladas, dependiendo de las cepas con las que se esté trabajando (FDA, 2004).

Por otro lado, el fosfato de 2,4-diamino-6,7-diisopropil-pteridina, denominado agente vibriostático O/129, es usado como método primario para confirmación de cepas compatibles a *Vibrio* spp, teniendo las presentaciones de 10 y 150 µg, ya que se reconoce su grado de sensibilidad antes su exposición dependiendo de la cepa utilizada (Shewan y Hodgkiss, 1954). Es usado para la diferenciación de esta especie con otras bacterias gram negativas, principalmente *Aeromonas* spp. Sin embargo, existen estudios que demuestran resistencia a este método de ciertas cepas, como el *Vibrio cholerae* no-O1.

#### **2.2.1.5 Tratamiento para *Vibrio* spp.**

El tratamiento a elección para *Vibrio* spp. es una dosis única de doxiciclina, la cual reduce principalmente la excreción de vibriones por las heces y la duración de los síntomas; y la de segunda línea, ciprofloxacina. Sin embargo, esto solo funciona si es acompañado de una rehidratación eficiente, siendo por lo general solo necesaria la oral, e intravenoso en casos graves. Por otro lado, tras brotes de cólera en Haití, se determinaron aislados sensibles a tetraciclina (por tal, a doxiciclina), sensibilidad intermedia a cloranfenicol y ampicilina; y resistencia a sulfatrimetropim (Fernández *et al.*, 2016)

### **2.2.2 *Salmonella* spp.**

De la familia *Enterobacteriaceae*, es un género de bacilos Gram negativos. Es posible encontrarla en varias partes, ya que es ubicua del tracto gastrointestinal de personas y animales sanos; y pudiendo diseminarse por medio de heces, contaminando alimento y agua. La Organización Mundial de la Salud (OMS) menciona que este patógeno posee una gran capacidad de sobrevivencia y resistencia por varias semanas en ambientes secos, por lo cual se puede encontrar en varios lugares y capaz de multiplicarse muy rápido, pudiendo duplicar su número cada 15 a 20 minutos, a una temperatura superior a 20°C.

Es considerada el mayor causante de brotes de toxiinfecciones alimentarias y cuadros en España y la Unión Europea, como los ocurridos a final del siglo XIX y principios del siglo XX. Causante de la fiebre tifoidea y paratifoidea, *Salmonella* spp. llega a los moluscos a través de aguas contaminadas por heces humanas, principalmente. Pertenece a un riesgo moderado de extensión potencialmente amplia (ICMSF, 2002)

#### **2.2.2.1 Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp.**

Para casos de baja carga de *Salmonella*, como el de un portador

asintomático, la etapa de enriquecimiento es muy importante. Aunque el caldo de Selenito aún se usa, este ha sido reemplazado por caldo de Rappaport, debido a la toxicidad del primero como medio enriquecedor. Existen medios selectivos como el agar Salmonella Shigella (SS), agar Hektoen Enteric o agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD), en vez de aquellos no selectivos como el agar MacConkey. La incubación se realiza en medio aeróbico a 37°C durante 24 h. Posterior a esto, se recomienda el uso de pruebas bioquímicas para la identificación (FDA, 2016)

### **2.3 Resistencia antibiótica**

Es un proceso que aparece de forma natural con el tiempo, generalmente por modificaciones genéticas. Sin embargo, la resistencia a los antibióticos se acelera con el uso indebido y abusivo de los fármacos, ya que se pueden adquirir con facilidad, que conlleva a que las bacterias desarrollen diversos mecanismos de resistencia frente a ellos. (OMS, 2018). Esto origina que muchas enfermedades de origen bacteriano signifiquen un reto terapéutico que dificulta el tratamiento de las infecciones (Tafur *et al.*, 2011)

#### **2.3.1 Perfil de susceptibilidad antibiótica**

Este es un método estandarizado y aprobado por el Laboratorio Internacional de Referencia: National Committee for Clinical Laboratory

Standars (NCCLS) en el cual se mide el diámetro del halo de inhibición producido sobre un inóculo bacteriano puro y sobre el cual se ha aplicado discos de antibióticos. Esta medida se correlaciona con la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) con cepas conocidas susceptibles y resistentes a varios antibióticos. Se realiza por medio del método de difusión en agar, utilizado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a algún antibiótico (INEI, 2010).

### **2.3.2 Antibióticos usados en humanos para gastroenteritis**

#### **2.3.2.1 Ampicilina**

Es una penicilina semisintética, sensible a la penicilinasas, derivada del núcleo 6-aminopenicilánico; bactericida de amplio espectro frente a gram positivos y negativos. Inhibe la síntesis y reparación de la pared bacteriana, produciendo lisis de bacterias sensibles. Es estable en presencia de ácido gástrico y se absorbe bien en el tracto gastrointestinal. Representativa también para amoxicilina (INEI, 2010)

#### **2.3.2.2 Ciprofloxacina**

Es una fluoroquinolona que presenta mayor acción ante bacterias gram negativas, ideal para patógenos entéricos comunes. Eficaz contra *Vibrio* spp. y

*Shigella* spp., acortando la duración de la diarrea; sin embargo, disminuye frente a *Salmonella* (Morejón et al., 2005) Para el caso de *Vibrio*, este fármaco no cuenta con punto de corte según el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), por lo que se usa la “Guía de Lectura para el Método de Difusión de discos para la prueba de susceptibilidad de antimicrobianos” para enterobacterias (EUCAST, 2017).

### **2.3.2.3 Cloranfenicol**

Es un bacteriostático de amplio espectro, originalmente aislado del *Streptomyces venezuelae* y en la actualidad, producido de manera sintética. Penetra por difusión e interfiere en la síntesis proteica bacteriana a nivel del 50S del ribosoma bacteriano, con lo cual impide la transpeptidación entre aminoácidos de la cadena peptídica, así impide la elongación de la cadena en crecimiento. A pesar de ser de amplio espectro, su uso queda limitado a tratamientos de aquellas infecciones sensibles como el de *Salmonella*, en las que no exista otra alternativa terapéutica. No se recomienda usarlo como primera línea para evitar la aparición de cepas resistentes. Además, se han encontrado alto porcentaje de errores menores por lo que su uso es con precaución si se realiza el método de difusión en agar. (INEI, 2010)

#### **2.3.2.4 Sulfatrimetropim**

Es conocido también como cotrimoxazol o TMP-SMX. Es una asociación en una proporción fija de 1:5 de timetroprim y de sulfametoxazol; ambos antibióticos eficaces de la familia de los antagonistas del folato (Smith y Reynard, 1995). Este fármaco inhibe enzimas secuenciales que intervienen en la síntesis del ácido fólico bacteriano. Eficaz para enfermedades gastrointestinales, debido a su rápida y extensa absorción a nivel del tracto gastrointestinal (Lanz *et al*, 2012)

#### **2.3.2.5 Tetraciclina**

Es un antibiótico bacteriostático, derivado semisintético, caracterizado por su hidrosolubilidad. Inhibe la síntesis proteica bacteriana y es eficaz frente a infecciones ocasionadas por Gram positivos. Es usado como terapéutica en cuadros clínicos de cólera. El resultado en el antibiograma se puede extrapolar de la doxiciclina ya que no es de uso común. (INEI, 2010)

### III. ANTECEDENTES

La extracción de “palabritas” representa una de las principales actividades pesqueras para los pobladores costeños del norte del país. Esta se realiza de manera artesanal, generalmente ayudado con redes alargadas con fondo; y con una boquilla redonda con dientes de metal en el borde, que ayuda el entierro en la arena. Además, también los pobladores extraen manualmente durante la marea baja. Mediante R.M.N° 298-2006-PRODUCE en el 2006 se establece la talla comercial mínima como 22 mm de longitud valvar, para asegurar el repoblamiento de la población, en base a la talla de madurez, la cual es de 13.96 mm (Ramírez *et al.*, 2016). En el 2000 existió una alta demanda por parte de los consumidores de España y EEUU, lo cual conllevó a una extracción indiscriminada de este recurso. La playa de Mórrope fue uno de los principales bancos naturales del norte del país donde se extraían estos ejemplares, llegando a 5 toneladas diarias; las cuales eran acopiadas por una cámara frigorífica para ser trasladada a Paita, puerto de donde se exportaba. (IMARPE, 2016).

Sin embargo, casos de Hepatitis A en España durante 1999 y el 2008, fueron relacionados a *Donax* spp. “palabritas” provenientes de la zona norte del Perú, lo cual conllevó a una alerta sanitaria en la Unión Europea en el 2008 (Romalde *et al.*, 2002; Polo *et al.*, 2010; CEPAL, 2014) y la prohibición de

exportación de este recurso. Actualmente, PRODUCE no tiene cifras publicadas con respecto a su extracción, por lo cual se presume que ha disminuido y está destinada solo al mercado local.

Un estudio sobre aislamiento en moluscos de terminales pesqueros de Lima y Callao, reveló que el 100% de las muestras estaban contaminadas por *E. coli*; y en un solo caso, de *Salmonella enteritidis* serotipo Derby (Taboada *et al.*,1974). En el 2001, el porcentaje de diarreas causadas por *E. coli* correspondió al 32.2% del total causadas por bacterias en la región de Lambayeque(MINSA, 2001). Por otro lado, un estudio en el aislamiento e identificación de *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 en productos hidrobiológicos de Lima, determinó 6 muestras de moluscos y 9 de pescado, positivas, de las cuales una de ellas positiva al serotipo O3:K6, positivo a *tdh*, capaz de producir pandemias. (Aliaga *et al*, 2010). Entre las principales causantes del deterioro y degradación ambiental del litoral costero de esta zona se considera: arrojamiento de desechos domésticos e industriales, crecimiento urbano sin control, mantenimiento de embarcaciones pesqueras en playa, arrojamiento de basura y desmontes, tránsito vehicular y el sobrepastoreo (Carbajal W. *et al.* 2005).

Pero este no es el único caso de contaminación fecal en el norte del país, la investigación realizada por Marcos A. *et al.* (2014) detectó dos muestras de agua contaminada con el virus de Hepatitis A en el río Sechura (Piura), río que

a su vez desemboca en el litoral peruano y zona de cultivo de moluscos, además de poner en riesgo a la población en los aspectos sanitaria, social y económica

#### IV. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Hasta el año 2008, *Donax* spp. fue un producto de comercio internacional, pero que por los casos de Hepatitis A que generó en España se cerró su exportación. Sin embargo, este posee un futuro prometedor, ya que IMARPE (2010) lo considera un recurso con potencial económico, buscando así el repoblamiento de sus playas con este recurso (Bances y Ramírez, 2010; 2016). Además, en otros países como España, buscan realizar cultivos controlados para la obtención de semillas.

A pesar de esto, en los últimos años se ha visto una constante contaminación y deterioro de playas donde se ubican los bancos naturales (lugares de extracción de este recurso), fenómenos naturales que afectaron el norte del país (El Niño y La Niña) y actividad antropogénica (zonas recreativas, actividad industrial, poco mantenimiento de red de drenaje regional, aumento de poblaciones, etc). A esto se le suma la capacidad filtradora que tienen los moluscos bivalvos como *Donax* spp., que en su caso, posee un sistema de doble filtración, convirtiéndose en marcadores biológicos de contaminación marina. En la actualidad, se desconoce el grado de contaminación de estos ambientes marinos como el de la situación sanitaria de este producto hidrobiológico.

Por tal motivo, si una persona consume uno de estos ejemplares, puede estar ante un riesgo potencial de contraer alguna enfermedad, principalmente de origen bacteriano. Esto, dependiendo del patógeno,, podría significar incluso el inicio de una epidemia como la del Cólera, ocurrida en el año 1991 y 1993, causada por *Vibrio cholerae* (del género *Vibrio*, ubicuo del medio marino) y relacionada al consumo de productos hidrobiológicos de origen marino, principalmente. En esta epidemia se presentaron diarreas sanguinolentas y deshidratación severa que podían conllevar a la muerte del paciente. Por otro lado, esta bacteria afecta también a nivel productivo el cultivo de algunos otros moluscos bivalvos como es el caso de *Argopecten purpuratus* (concha de abanico)-se desconoce en *Donax* spp.-, ocasionando mortalidad de la larva por asociaciones entre especies de *Vibrio*.

*Salmonella* spp., es otra bacteria que se puede aislar de productos marinos y es capaz de producir enfermedades gastrointestinales como sistémicas, calificada por la OMS como el principal causante de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) y de mayor distribución, ocasionando aproximadamente 550 millones de casos al año.

Además es sabido la facilidad con la que se consiguen los fármacos antimicrobianos sin prescripción médica en el país, que contribuye a la

resistencia a antibióticos (que suele ocurrir de forma natural, ya que las bacterias suelen modificarse genéticamente con el tiempo), dejando cepas cada vez más resistentes y dificultando futuros tratamientos, teniendo la necesidad de usar antibióticos cada vez más caros.

Es así como la resistencia antibiótica de ciertas bacterias, en este caso *Vibrio* spp. y *Salmonella* spp., se suma a la problemática de salud pública. Por tal motivo, es importante conocer el perfil de susceptibilidad de las cepas aisladas e identificadas del recurso marino *Donax* spp. frente a los principales antibióticos usados en la salud humana.

## V. OBJETIVOS

### 1. Hipótesis

Existe presencia de *Vibrio* spp., así como de *Salmonella* spp. en un 8% (Wafaa, 2011) de aislados de *Donax* spp. (palabritas) provenientes de bancos naturales de Lambayeque; resistentes a al menos un antibiótico usado en la salud humana.

### 2. Objetivos

#### 2.1 General

Aislar y caracterizar fenotípicamente cepas de *Vibrio* spp. y *Salmonella* spp. presentes en *Donax* spp. (palabritas) de tres bancos naturales de la región Lambayeque, Perú.

#### 2.2 Específicos

1. Identificar cepas de *Vibrio* spp y *Salmonella* spp. en *Donax* spp mediante pruebas bioquímicas.
2. Determinar la frecuencia de los aislados de *Vibrio* spp y *Salmonella* spp. de acuerdo al lugar de procedencia de las muestras.
3. Determinar el perfil de susceptibilidad de las cepas identificadas frente a los principales antibióticos usados en humanos.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Diseño del estudio

El diseño del estudio fue descriptivo longitudinal.

### 2. Lugar de Estudio

El estudio se llevó a cabo en el departamento de Lambayeque (Perú) de mayo a agosto del 2017, en bancos naturales de playas arenosas de la región. Los lugares de muestreo se determinaron por ser las playas de extracción más utilizadas por los pescadores artesanales según información que se pudo recoger de los trabajadores de mercados que comercializaban *Donax* spp. Estas playas seleccionadas fueron: Los Lobos (Etén) (6°57'36.9"S 79°51'02.0"W), Santa Rosa (Santa Rosa) (6°52'52.5"S 79°55'28.1"W) y San Pedro (Mórrope) (6°36'52.2"S 80°09'51.6"W), cada una con diferente actividad antropogénica (Anexo 1).

La playa Los Lobos se encuentra ubicada a 30 minutos de la población del Puerto Etén. Una sucursal de PetroPerú se encuentra a unos metros de la orilla, con tuberías aparentemente clausuradas pero con filtraciones de agua, notándose crecimiento vegetal alrededor. Por otro lado, en la playa Santa Rosa se encuentra el puerto y el terminal pesquero, que a su vez limitan con las viviendas de los habitantes. Por el distrito de Santa Rosa pasan drenes primarios de la Red de Drenaje de Lambayeque. La playa San Pedro es utilizada como balneario para los

playistas y asiduos visitantes. Estas áreas en mención presentan un clima templado con temperaturas máximas de 28°C y mínimas de 20°C, con una humedad relativa cercana al 95%, según el Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología.

### **3. Muestras**

La muestra correspondió a aproximadamente 25 g de triturado de la parte blanda de *Donax* spp. “palabritas” colectadas a partir de aproximadamente un kilo y medio de ejemplares, siguiendo lo establecido por el Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES) en el Procedimiento “Control Oficial de Zonas y Áreas de Producción Clasificadas de Moluscos Bivalvos Vivos” (P06-SANIPES). La recolección se realizó de manera manual de aquellos ejemplares que se ubicaban en la superficie, en un solo punto por playa seleccionada, durante el descenso de la marea (Anexo 2), para lo cual se consultó los reportes diarios de la Dirección de Hidrografía y Navegación de la Marina de Guerra del Perú.

Los ejemplares fueron transportados en cajas térmicas limpias, hielo suficiente para mantener una cadena de frío entre 4 a 10°C; siendo procesados en un máximo de 48 h. Se usó ejemplares con la valva cerrada que medían más de la talla mínima comercial de 22 mm de longitud valvar con la ayuda de un vernier (Anexo 3). Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Nutrición e

Inocuidad Alimentaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú.

#### **4. Tamaño de muestra**

Se trabajó con un total de 24 muestras, cada una de 25g de parte blanda de *Donax* spp., tomado a partir del kilo y medio de ejemplares recolectados en las playas durante todo el muestreo cada quince días. Durante la visita a campo se observó que la población de palabritas había disminuido en la mayoría de playas, quedando los bancos naturales de Santa Rosa, San Pedro y Los Lobos a disposición para la extracción y que eran los utilizados por los pescadores locales como lugares de captura.

Los muestreos fueron quincenales, siguiendo lo estipulado por SANIPES para la determinación de *Salmonella* spp. en moluscos bivalvos; durante los meses de mayo y agosto. El tiempo de muestreo se determinó a raíz de la ocurrencia del Fenómeno El Niño (2017), el cual afectó la zona norte del país; concluyendo en agosto por antecedentes de vedas iniciadas en su mayoría en el mes de setiembre. Para el caso de *Vibrio* spp., por cada muestra se tuvo dos aislados, ya que según el Manual de Análisis Bacteriológico de la Food & Drugs Administration (FDA), la toma del inóculo para el sembrado en agar a partir del agua peptonada alcalina con las muestras, es tomada a 1 cm de la superficie; a excepción de *V. cholerae*, que es tomada de la película superficial (la cual es un biofilm que se rompe al agitar) que contiene DNA, tres proteínas (RbmA, Bap1 y RbmC) y un polisacárido denominado polisacárido de *Vibrio*, aumentando la

capacidad de supervivencia e infectividad de la bacteria (Hollenbeck et al, 2014). Por tal motivo, al final del muestreo se tuvo 48 aislados para la identificación de *Vibrio* spp. y 24, para *Salmonella* spp.

## **5. Procesamiento de muestras**

Se procedió a evaluar las muestras recolectadas mediante el Manual de Análisis Bacteriológico para *Vibrio* spp. y *Salmonella* spp. en alimento, establecido por la Food & Drugs Administration (FDA), utilizando aproximadamente 25 g de la parte blanda de los ejemplares . Posterior a esto, se realizó la caracterización bioquímica con el kit comercial API 20 E (BioMérieux, Francia) a las cepas compatibles.

### **5.1 Identificación de *Vibrio* spp.**

#### *5.1.1 Enriquecimiento de la muestra*

Los moluscos bivalvos se aperturaron con un bisturí estéril y se retiró la parte blanda y el licor. Se pesó aproximadamente 25 g y se procedió a homogenizar y se añadió en 250 ml de Agua Peptonada Alcalina estéril. Se dejó incubar la solución a temperatura ambiente por 1 hora para su posterior incubación a 35°C durante 18 h. (FDA, 2004)

### 5.1.2 Aislamiento

El agar utilizado fue el TCBS, selectivo para *Vibrio* spp. El sembrado se realizó de dos maneras:

- Para el caso de *V. cholerae*, se tomó 10 µl de la superficie de la solución incubada y se realizó la siembra por agotamiento.
- Para el caso de las otras especies de *Vibrio* spp., se agitó la solución y se tomó 3µl de la solución con el asa de siembra redonda por debajo de 1 cm de la superficie de la solución incubada y se realizó la siembra por agotamiento (FDA, 2004).

Las placas sembradas se incubaron a 37°C por 8 horas. Se tomó una colonia representativa a las sospechosas a *Vibrio* spp., aquellas de aspecto húmedo, amarillas y verdes (Anexo 4); que luego fueron resembradas en Agar Tripton de Soya (TSA)

### 5.1.3 Sensibilidad al agente vibriostático 0/129

A partir del crecimiento en agar TSA suplementado al 0.85% de NaCl de una colonia aislada la noche anterior, se preparó una suspensión en una solución salina al 0.85% a una turbidez equivalente al estándar 0.5 de la escala de Mc Farland. Se sumergió un hisopo estéril en la suspensión y se realizó un sembrado en agar Müeller-Hinton en tres direcciones, para asegurar la distribución uniforme del inóculo. Se dejó secar y se aplicó los discos de sensibilidad para el

agente O/129, luego se incubó a 37°C en aerobiosis. (FDA, 2004) La lectura de los resultados se realizó 24 h después, teniendo como aislados sensibles compatibles con *Vibrio spp* aquellos en los que se había formado un halo de inhibición alrededor del disco.

#### 5.1.4 *Caracterización bioquímica*

A partir de una colonia aislada, se preparó una suspensión en 5 ml de solución salina al 0.85% estéril. Se llenó cada pocillo de la batería de bioquímica del kit API 20E® (BioMérieux, Francia) con la solución preparada según las especificaciones del fabricante, para luego ser incubado a 37°C durante 24 h. Los resultados inmediatos se anotaron tras la lectura y fueron introducidos en el programa APIWEB® (BioMérieux, Francia), para identificar al microorganismo aislado según las especificaciones del programa.

## **5.2 Identificación de *Salmonella spp.***

### 5.2.1 *Pre-enriquecimiento*

Los moluscos bivalvos se abrieron con un bisturí estéril y se retiró la parte blanda y el licor. Se pesó aproximadamente 25 g, se homogenizó y se añadió en 250 ml de Agua Peptonada estéril. Se dejó incubar la solución a

temperatura ambiente por 1 hora para su posterior incubación a 35°C durante 18 horas. (FDA, 2016)

### 5.2.2 Aislamiento

Una vez terminado el período de incubación, se transfirió 0.1 ml de la solución en 10 ml de medio Rappaport- Vassiliadis y 1 ml en 10 ml de Caldo Tetrathionato. Los tubos se incubaron de la siguiente manera:

- Medios Rappaport- Vassiliadis a 42°C por 24 h.
- Caldo Tetrathionato en baño maría a 35 °C y su duplicado a 42°C por 24 h.

Para la siembra se tomó 10 µl de la solución incubada y se realizó la siembra por agotamiento en agar Hektoen Enteric, Bismuto Sulfito y Xilosa Lisina Desoxicolato a 35°C por 24h. (FDA, 2016)

Se determinó como muestras sospechosas a aquellas cuyo crecimiento fue, según el agar selectivo:

Hektoen Enteric: Colonias azul verdosas con o sin centro negro.

Bismuto Sulfito: Colonias marrón grisáceas con o sin brillo metálico.

Xilosa Lisina Desoxicolato: Colonias rosadas con o sin centro negro.

### 5.2.3 Caracterización bioquímica

A partir de una colonia representativa a las sospechosas a *Salmonella* spp., se inocularon los medios Agar Lisina Hierro (LIA), Kligler Hierro Agar, Sulfuro

Indol Motilidad (SIM), Simmons Citrato Agar y Agar Úrea de Christensen. Se incubaron los tubos a 35°C por 24h.

Los resultados fueron interpretados positivos si el medio presentó (FDA, 2016):

LIA: Coloración púrpura (Alcalinización del medio).

Kligler: Coloración (Pico/Fondo) Rojo/Amarillo con presencia de H<sub>2</sub>S<sup>++</sup> y producción de gas.

SIM: Presencia de motilidad y producción de H<sub>2</sub>S<sup>++</sup>.

Citrato: Coloración azul con presencia de crecimiento.

Úrea: No hay variación.

### **5.3 Almacenamiento de cepas**

A partir de las colonias aisladas e identificadas con el perfil bioquímico de *Vibrio* spp. y *Salmonella* spp. , se inoculó en 800 µl de BHI y se incubó a 37°C por 24 h. Luego, se agregó 200 µl de Glicerol y se homogenizó con un vórtex. Finalmente, se criopreservó a -80°C.

### **6. Perfil de susceptibilidad antibiótica**

Se determinó el perfil de susceptibilidad a partir del método Kirby-Bauer (Hudzicki, 2009). A partir de una colonia aislada y cultivada en TSA de una noche anterior, se preparó una suspensión en una solución salina al 0.85% y fue medida en un espectrofotómetro (Unico® S1100, USA) hasta alcanzar una absorbancia entre 0.08 y 0.1 (longitud de onda 625 nanómetros), lo cual equivalente al estándar 0.5 de la escala de Mc Farland ó 1.5 x 10<sup>8</sup> UFC/ml (Cona,

2002). Se sumergió un hisopo estéril en la suspensión y se realizó un sembrado estriado en tres direcciones para asegurar la distribución uniforme del inóculo sobre el agar Mueller-Hinton (Oxoid, Inglaterra). Con ayuda de una aguja estéril, se colocó los discos de antibióticos seleccionados sobre el agar Mueller- Hinton (Oxoid, Inglaterra). Los antibióticos utilizados y evaluados fueron:

- Ampicilina (10µg)
- Ciprofloxacina (5µg)
- Cloranfenicol (30µg)
- Sulfatrimetopim (25 µg)
- Tetraciclina (30µg)

Se incubó a 35°C por 24h en condiciones de aerobiosis. Se midió luego el diámetro (expresado en milímetros) de los halos formados por inhibición alrededor de cada disco. Se tomó como referencia la “Guía de Lectura para el Método de Difusión de discos para la prueba de susceptibilidad de antimicrobianos” de EUCAST. (EUCAST, 2017)

## **7. Análisis estadístico**

Los resultados fueron presentados en tablas de frecuencias absolutas y relativas elaboradas en Microsoft Excel, usando las variables según lugar de extracción, mes de muestreo, especie de la bacteria y perfil de susceptibilidad.

## VII. RESULTADOS

Se realizó el análisis microbiológico de ejemplares de *Donax* spp. de 48 muestras para la identificación de *Vibrio* spp. y *Salmonella* spp. Se determinó que un 89,5% (43/48) de las cepas aisladas de *Vibrio* spp., fueron positivas según la caracterización bioquímica del kit comercial API 20 E (identificación mayor a 90% según la base de datos del programa) y mediante la sensibilidad al agente vibriostático. El 10,5% (5/48) de aislados restantes, fueron identificados como Gram positivos con la observación a microscopio previa tinción Gram. En el presente estudio, la mayoría de aislados no fueron compatibles al crecimiento de *Salmonella* spp. en los agares selectivos; sin embargo, un aislado proveniente de la playa Santa Rosa, fue compatible al crecimiento de esta bacteria en agar XLD pero identificada mediante el kit comercial API 20E como *Acinetobacter baumannii*.

En relación con el tipo de bacteria encontrada y muestreo (Tabla 1), el 89,5% (43/48) correspondió a aislados positivos a *Vibrio* spp. Además, se realizó una tabla de frecuencias para determinar el número de muestras positivas por cada playa evaluada, encontrándose al menos una muestra positiva a *Vibrio* spp. en cada mes (Tabla 2).

**Tabla 1.-** Aislamientos positivos a *Vibrio* spp. según procedencia de *Donax* spp.

Procedencia	N	N	<i>Vibrio</i> spp.	
			n*	%
Los Lobos	8	16	16	33,3
Santa Rosa	8	16	15	31,3
San Pedro	8	16	12	25
Total	24	48	43	89,5

Total de muestras evaluadas (N=24)

n = número de aislados

n\* = número de aislados positivos

**Tabla 2.-** Distribución proporcional de los aislados positivos a *Vibrio* spp.

durante los meses de muestreo según lugar de procedencia

Mes	Aislados según lugar de muestreo			<i>Vibrio</i> spp.	
	Los Lobos	Santa Rosa	San Pedro	n*	%
mayo	4	3	4	11	25.6
junio	4	4	3	11	25.6
julio	4	4	4	12	27.9
agosto	4	4	1	9	20.9
Total	16	15	12	43	100

Total de aislados sospechosos (n=43)

n\* = número de aislados positivos

Según la variable especie de *Vibrio* spp. identificada mediante el kit comercial API 20E (BioMérieux, Francia) y playa evaluada (Tabla 3), se determinó que el 100% (15/15) de muestras positivas a *Vibrio* spp. correspondían a *V. alginolyticus* muestreados en la playa Santa Rosa. Del total de muestras positivas a *Vibrio* spp. , el 100% (43/43) fueron sensibles al agente vibriostático O/129 (Anexo 5).

**Tabla 3.-** Identificación de especies de *Vibrio* spp. y sensibilidad al agente vibriostático O/129 por playa muestreada.

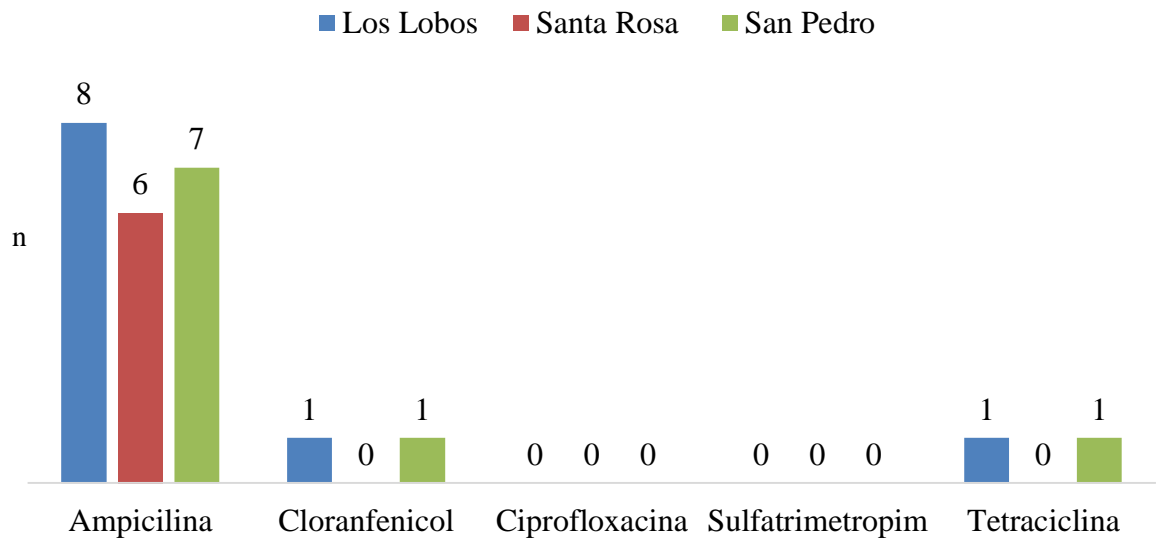
Playa	Aislados	Sensibilidad O/129		<i>V. alginloyticus</i>		<i>V. fluvialis</i>	
		N	%	n*	%	n*	%
Los Lobos	16	16	100	12	75	4	25
Santa Rosa	15	15	100	15	100	0	0
San Pedro	12	12	100	11	91,7	1	8,3
Total	43	43	100	38	88,4	5	11,6

Total de aislados sospechosos (n=43)

n\*=número de aislados positivos

Además, se realizó el perfil de susceptibilidad antibiótica a las cepas de *Vibrio* spp. aisladas (Gráfico 1); encontrando que el 48,9% (21/43) fue resistente a Ampicilina (Anexo 6). De las cepas resistentes a ampicilina, el 44,7 % (17/38) correspondió a la especie *V. alginlyticus* y el 80,0% (4/5), a *V. fluvialis*.(Tabla 4)

**Gráfico 1.-** Perfil de susceptibilidad antibiótica de las muestras aisladas positivas a *Vibrio* spp. según playa muestreada.



Total de aislados positivos (n=43)

**Tabla 4.-** Proporción de aislados de especies de *Vibrio* spp. resistentes a ampicilina

Cepa identificada	n	Ampicilina	
		n*	%
<i>V. alginolyticus</i>	38	17	44,7
<i>V. fluvialis</i>	5	4	80,0
Total	43	21	48,8

Total de aislados positivos (n=43)

n\*= número de aislados resistentes a ampicilina

## VIII. DISCUSIÓN

Diversos estudios han confirmado la presencia de *Vibrio* sp. en productos de origen marino, encontrándose entre las principales especies *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. alginolyticus*. En Cuba, Leyva *et al.* (2013) identificaron nueve especies de *Vibrio spp.* entre los principales productos hidrobiológicos, encontrando un 34% (426/1251) de muestras positivas a *V. alginolyticus*. Asimismo, otro estudio en ese país identificó una frecuencia alta de *V. alginolyticus* en el agua costera de La Habana, esto a pesar de que no existen reportes de casos de enfermedad gastrointestinal o extraintestinal en ese país, que se le pueda atribuir a dicha bacteria. (González; 2006). En un estudio realizado en moluscos procedentes de Marruecos, se determinó un porcentaje predominante de aislados positivos a *V. alginolyticus* equivalente al 90,4% (47/52) (Mannas, 2014). Los resultados de estos estudios coinciden con el registrado por la presente investigación, la cual determinó un 88,4%(38/43) de aislados identificados como *V. alginolyticus* mediante el kit comercial API 20E, evidenciando que esta cepa de *Vibrio* posee amplia distribución en el ambiente marino. Asimismo, en el Perú se ha reportado presencia de *V. alginolyticus* en un 85,7%(12/14) en muestras del tracto digestivo de lenguado *Etropus ectenes* (Ruíz, 2012). El grado de virulencia va a depender de la presencia de genes de patogenicidad de *Vibrio spp.* siendo

los más patógenos para el ser humano la hemolisina directa termoestable (gen *tdh*), la hemolisina relacionada al *tdh* (gen *trh*) y la hemolisina termolábil (*tlh*); pudiendo ser así *V. alginolyticus* patógeno al poseer dichos genes. Además, muchos estudios han reportado que *V. alginolyticus* puede ser reservorio de genes de patogenicidad de otras especies de *Vibrio* spp. (Gargouti *et al.*, 2015). Esto justifica aún más el presente estudio, ya que la presencia de *V. alginolyticus* puede dar a sospechar no solo el acompañamiento con sus propios genes de virulencia, sino también la de otras especies de *Vibrio* spp. (Henriquez *et al.*, 2016)

Los resultados de la presente investigación determinan una elevada frecuencia de muestras positivas a *V. alginolyticus*, debido a la naturaleza de esta bacteria ubicua de ambientes marinos, que puede soportar diversas concentraciones de NaCl (Graü *et al.*, 2000; 2006). También se observó, presencia de *V. fluvialis* en menor proporción, siendo un hallazgo importante porque se ha relacionado a diarreas tipo cólera, infecciones de piel e incluso pocas veces aislados en coprocultivos de pacientes con enfermedades inmunosupresivas como el SIDA (Usó *et al.*, 2010). Aún no se cuenta con la epidemiología definida de esta especie como patógeno, ya que en algunos casos sí se relaciona al consumo de productos hidrobiológicos (Allton *et al.*, 2006) y en otros no se conocen del todo los factores de riesgo (Lai *et al.*, 2006); a pesar de ello representa un potencial problema en la salud pública al

igual que los otros vibrios. Además, se sabe que los aislados de esta especie presentan resistencia a ampicilina, penicilina G principalmente. (Rammamurthy *et al.* , 2014)

Otras especies de Vibrios (no aislados en el presente estudio) como *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*, son altamente patógenas, siendo *V. vulnificus* considerada la más virulenta y causante de una tasa de mortalidad del 50% en cuadros sépticos para el hombre. Aunque se ha relacionado a enfermedades gastrointestinales tras el consumo de moluscos bivalvos (contaminados con este patógeno) por su capacidad de adhesión al mucus del huésped; otros estudios confirman su importancia en enfermedades extragastrointestinales, como los reportes registrados en personas ante exposición de agua marina, causando problemas de piel y otitis (Feingold y Kumar, 2004). Por tanto, la presencia de esta bacteria en moluscos bivalvos no solo representa un riesgo para el consumidor, sino también para los visitantes de dichas playas, ya que existe también riesgo de contraer enfermedades dérmicos causados por este patógeno como por asociaciones a bacterias oportunistas (Thompson y Austin, 2006). Asimismo, diversos estudios sugieren que los cultivos de *V. alginolyticus* pueden ser reservorio de genes de virulencia presentes en el ambiente, debido a una transducción entre otras bacterias marinas (Lafisca *et al.*,2008), por lo que, al evidenciarse la presencia de una cepa tdh-positiva aislada de una muestra positiva a *V.*

*parahaemolyticus* serotipo O3:K6 (considerado como cepa pandémica) proveniente de un mercado pesquero de Lima (Aliaga et al., 2010), deja en evidencia la posibilidad de que *V. alginolyticus* pueda servir como reservorio del gen *tdh* del *V. parahaemolyticus*. En ese sentido en nuestro país, un brote causado por un serotipo O3:K6, podría afectar a la salud de la población de la zona costera del Perú, quienes son los consumidores más frecuentes de productos marinos, especialmente en los meses de verano.

Diversos estudios se basan en una identificación fenotípica mediante el kit bioquímico API 20 E, debido a que es fiable dependiendo del porcentaje de identificación; el cual se sugiere que sea mayor a 90% para tener un resultado confiable. En un estudio realizado en esturión siberiano de Rumanía en el 2010, los autores mencionan que el kit comercial API 20E puede ser utilizado para identificar diversas bacterias Gram negativas causantes de patologías bacterianas en peces, identificando *V. alginolyticus* con un 93.9% y *Pasteurella spp.* con 92.5% de identificación (Costinar et al., 2010). Otra investigación determinó la presencia de *V. alginolyticus* a un 99.1% de identificación en *Hippocampus reidi*, relacionándola como causante de altas mortalidades en una infección experimental (Martins et al., 2010). Además, API 20E ha sido utilizado para la diferenciación de aislados compatibles a *V. alginolyticus*, *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* en un estudio realizado en moluscos bivalvos procedentes de Italia y Brasil (Lafisca et al., 2008). La

caracterización bioquímica por el sistema en mención muestra buenos resultados y puede ser usado para la identificación de *V. fluvialis* para una infección experimental (Flores, 2017). Sin embargo, la prueba “gold standard” para la identificación de bacterias será el PCR.

Con respecto al perfil de susceptibilidad antibiótica, se menciona que más del 90% de cepas de *V. alginolyticus* obtenidas de ambientes marinos presentan resistencia a antibióticos beta-lactámicos (Hernández, 2016). El presente estudio coincidió con investigaciones anteriores que demuestran prevalencia alta de resistencia a ampicilina en cepas de *Vibrio* spp. aisladas de ambientes marinos (Yadón y Schmunis, 2000; Ferrini, 2008; Han *et al.*, 2007). En una investigación realizada en 6 cepas de *Vibrio* aisladas de productos marinos (entre ellas *V. alginolyticus*), se observó que el 97.2% (70/72) eran resistentes a ampicilina (Raissy *et al.*, 2012). De acuerdo con el mayor número de resistentes a ampicilina, se observó que estos pertenecían en su mayoría a *V. alginolyticus*; en concordancia con el estudio realizado por Eun-Gyoung *et al.* (2010), en el cual se determinó una alta resistencia a ampicilina en 75.2% (115/153) de cepas aisladas de *V. alginolyticus* y 57.8% (126/218) a *V. parahaemolyticus*, aislados de peces de piscigranjas en Corea; además, se menciona una multiresistencia de los aislados resistentes a esta droga. Asimismo, se obtuvo cepas compatibles a *V. fluvialis* resistentes a ampicilina, coincidiendo con estudios en los aislados de esta especie que

muestran resistencia al fármaco en cuestión (Rammamurthy *et al.*, 2014).

Para el caso de *Salmonella*, estudios anteriores revelan bajas tasas de aislamiento provenientes de muestras marinas a pesar de que soporta hasta un 5% de NaCl, sobreviviendo mejor en medios tropicales de agua dulce; multiplicándose en estuarios durante semanas. En nuestro país, se suma el hecho de tener desagües y drenes que desembocan en el mar sin tratamiento previo; y la falta de identificación de portadores de la enfermedad que constantemente se encuentran liberando la bacteria por medio de las heces. Para el caso particular de *Donax* spp., estas son extraídas de manera libre para su consumo directo y sin control sanitario, aumentando el riesgo a contraer una gastroenteritis por *Salmonella* spp.. Además, los moluscos están más expuestos a diversas bacterias y contaminantes debido a la forma de vivir enterrados en sedimentos y a orillas del mar.

Estudios en otros países como Italia, reportaron 1,1% (1/87) de prevalencia de *Salmonella* spp. en muestras de moluscos bivalvos (Macaluso *et al.*, 2004). Un estudio en Marruecos, reveló un 10%(80/801) de muestras positivas a esta bacteria procedentes de moluscos bivalvos (Setti *et al.*, 2009). Mientras que, en Brasil, se determinó un 30%(3/10) de muestras de agua y 10% (1/10) de ostras de un estuario cercano a Sao Paulo, positivas a *Salmonella* spp. (Ristori *et al.*, 2007). Esto nos demostraría que presencia de

*Salmonella* spp. estaría relacionada con factores como la temperatura del mar y actividad antropogénica de la zona de donde se extrae el producto evaluado. Además, estudios reportan que su presencia coincidiría también con la concentración de coliformes fecales (Polo *et al.*, 1998; Catalao *et al.*, 2000). En un reporte de IMARPE en el 2015 (De la Cruz *et al.*, 2015), demostró presencia de coliformes fecales mayor a 2000 NMP/100ml en el Dren 4000 (Santa Rosa); sin embargo, en dicha playa no se evidenció presencia de *Salmonella* spp. en las muestras evaluadas. Cabe resaltar, que durante el procesamiento de muestras y realización de protocolos de identificación de *Salmonella* spp., se identificó mediante el kit comercial API 20E un aislado compatible a *Acinetobacter baumannii*, la cual es una bacteria de importancia en el ambiente hospitalario (Memish *et al.*, 2012) y capaz de producir una gran variedad de cuadros clínicos, desarrollando resistencia a diferentes grupos de antibióticos (Gaynes y Edwards, 2005), significando un posible riesgo para la salud pública si se llega a confirmar su presencia mediante pruebas moleculares, haciendo sospechar de una posible contaminación proveniente directamente de centros de salud.

Anteriormente en el Perú, el estudio de Taboada *et al.* (1974) determinó una muestra de *Salmonella* spp en moluscos bivalvos procedentes de mercados de Lima en un periodo de un año (muestreos quincenales). En Piura, SANIPES realizó un análisis microbiológico de los principales productos

hidrobiológicos, entre ellos *Donax* spp.; no encontrando muestras compatibles con esta bacteria. Se sugiere, que *Salmonella* spp. puede estar en niveles muy bajos o presente en estado viable no cultivable como respuesta de sobrevivencia ante factores externos (Márquez,2017; Polo *et al.*,1998), lo cual coincide con la ausencia de muestras positivas a *Salmonella* spp. en el presente estudio.

Se debe tener en cuenta que los casos de salmonelosis en Estados Unidos y Europa causados por el consumo de moluscos bivalvos contaminados por la bacteria *Salmonella typhi*; conllevaron como medida preventiva a la depuración de moluscos en tanques de agua limpia para maximizar la actividad de filtración y eliminar de forma efectiva muchas bacterias fecales contaminantes. Sin embargo, esta técnica resulta poco efectiva para el caso de *Vibrio* spp. (FAO, 2010). En nuestro país, es posible que no se cuente reporten muchos casos de salmonelosis no porque dicha bacteria esté ausente en los alimentos, sino porque el sistema de salud actual no valora mucho la identificación del agente causal de las enfermedades gastrointestinales.

La presencia de especies como *V. alginolyticus* y *V. fluvialis*, representan un posible riesgo para el consumidor de productos hidrobiológicos por las enfermedades gastrointestinales que podrían ocasionar. Al realizar los muestreos, se evidenció además la modalidad de comercialización de las *Donax*

spp. en los mercados locales, siendo más vendido en modalidad de salado y sin respetar la cadena de frío, a pesar de que el clima de la zona costera de Lambayeque favorece la rápida descomposición de los productos hidrobiológicos, perjudicando aún más la inocuidad del producto. Cabe resaltar, que en los mercados aledaños al mar, el lavado de los productos hidrobiológicos a comercializar, se suelen lavar con agua proveniente del mar, aumentando así la posibilidad de contaminación cruzada. A esto se suma la forma de preparación que tienen los moluscos bivalvos en la gastronomía peruana, los cuales se suelen servir crudos o semicrudos, evitando la inactivación térmica de *Vibrio* spp.

Se tiene que considerar que Lambayeque además de tener zonas pesqueras, posee playas para fines recreativos, siendo visitadas por miles de personas principalmente en los meses de verano, estación que favorece el crecimiento de *Vibrio* spp. por aumento de la temperatura del agua y su salinidad, por lo que los visitantes de las zonas afectadas con la presencia de esta bacteria (playas de muestreo) se suman a la población en riesgo, ya que se ha demostrado que son agentes causales de infecciones de piel, otitis y conjuntivitis en personas que previamente han tenido algún tipo de contacto con agua de mar con la presencia de esta bacteria. En este sentido, los trabajadores que manipulen agua de mar (principalmente aquellos que laboren en mercados de puertos pesqueros) también se verían afectados, ya que suelen realizar los lavados, tanto de las

instalaciones como de los productos hidrobiológicos a vender, con agua de mar sin algún tipo de tratamiento previo. Asimismo, se suma la población en riesgo para la mayoría de enfermedades: niños, ancianos y pacientes inmunosuprimidos.

Cabe mencionar que existen escasas investigaciones relacionadas a la presencia de estas bacterias en bancos naturales de moluscos bivalvos en América Latina, persistiendo así el desconocimiento acerca de la situación sanitaria de estas zonas, principalmente las de extracción. Por tal motivo, se sugiere continuar con pruebas moleculares para determinar si existe presencia de genes de patogenicidad en las cepas aisladas del presente estudio, para llegar a evidencias concluyentes y saber el verdadero peligro al que se estaría en riesgo.

A pesar de la importancia de esta bacteria en la salud humana, su aislamiento constante en ambientes marinos y el notable deterioro ambiental, en el país no suelen realizarse estudios de esta índole, por lo que se sugiere que organismos reguladores como SANIPES, Ministerios y Gobierno regional, realicen medidas de control sanitario, tanto para ambientes marinos como para productos hidrobiológicos, y así mitigar el posible brote de alguna enfermedad causada por *Vibrio* spp. Además, las autoridades sanitarias deberían fomentar la identificación del agente causal de enfermedades diarreicas en centros de salud;

y la selección del tratamiento a realizar por medio de perfiles de resistencia específicos para cada paciente. Muchas veces el bajo control médico e informalidad de vendedores de fármacos, ocasiona la selección de cepas resistentes multiresistentes, dificultando la recuperación del paciente y la permanencia de la bacteria, en este caso *Vibrio* spp., como agente causal de diarreas.

Además, la cepa identificada por medio del kit comercial API 20 E, *V. alginolyticus*, está asociada a otros vibrios patógenos para moluscos bivalvos, como lo son *V. tubiashii* y *V. anguillarum*, causantes de mortalidad en larvas de moluscos bivalvos. Por este motivo, representaría un peligro para cultivos como el de la concha de abanico, principal producto hidrobiológico peruano exportado.

En la actualidad, *Donax* spp. es considerado como producto hidrobiológico potencial en la maricultura peruana por el IMARPE, por lo que el control sanitario de los bancos naturales (lugar de donde se obtendrían los reproductores) debe ser un ambiente lo menos contaminado posible, ya que contribuiría al ingreso de *Vibrio* spp. a cultivos controlados y hatcheries por medio de estos reproductores. Además, se debe tener control en el alimento suministrado (fitoplancton) y agua filtrada para estanques. A pesar de que en las últimas décadas los organismos reguladores no llevan registros acerca de la

extracción de *Donax* spp., esta actividad es de importancia socio-económica, ya que genera ingresos y ayuda a reducir la pobreza para los pescadores locales.

Se debe de tener en cuenta que se ha exportado hasta 64 toneladas al año de *Donax* spp. a Europa hasta el año 2008 (opuesto a los aproximadamente 300 kg que se extraen al día por playa), por lo que promover su sanidad, producción e inocuidad puede significar la re inserción en el mercado internacional.

El resultado negativo a *Salmonella* spp., no es determinante para afirmar la ausencia de esta bacteria en el medio marino, ya que estudios anteriores mencionan baja prevalencia de esta bacteria en ambientes marinos peruanos. Su presencia guarda relación con el grado de contaminación de coliformes, principalmente fecales (Cortés-Lara, 2003; Vega, 2010). Por ende, ante el aumento del deterioro ambiental, la contaminación de origen antropogénica y presencia de posibles animales portadores de *Salmonella* spp. como de coliformes en zonas aledañas, favorecería el aumento de esta prevalencia.

Para futuras investigaciones relacionadas a este estudio, se sugiere la utilización de un lector multiparámetro, para tener un control más específico y encontrar relación entre la presencia de las bacterias con las características de la calidad del agua, ya que factores como la temperatura, salinidad, concentración de oxígeno disuelto, pH, entre otras; condicionarían a la presencia de bacterias

en el ambiente acuático y en el molusco. Además, complementar la identificación bioquímica con pruebas moleculares, ya que son consideradas las pruebas “*gold standard*” en la tipificación de bacterias por su mayor sensibilidad frente al kit comercial API 20E. Con estas pruebas, se puede determinar la presencia de genes de patogenicidad e identificar posibles amenazas para la salud pública.

Con estos hallazgos se busca dar a conocer la situación sanitaria de *Donax* spp. para fomentar trabajos de investigación, tanto sobre este recurso como del lugar de extracción; y para la toma de acciones correctivas por parte de los órganos reguladores, realizando así programas de control y vigilancia sanitaria de productos hidrobiológicos y medioambiente.

## IX. CONCLUSIONES

- Se aisló *Vibrio spp.* en el 89,5%(43/48) de *Donax spp.* “palabritas” provenientes de bancos naturales de la Región Lambayeque.
- Las palabritas extraídas de la playa Los Lobos (Etén) fueron consideradas las más contaminadas por *Vibrio spp.*, identificándose el 100% (16/16) compatibles a esta bacteria.
- Se encontró una frecuencia del 88,4% de muestras compatibles a *Vibrio alginolyticus* y 11.6% para *V. fluvialis*.
- No se aislaron cepas compatibles a *Vibrio vulnificus*, *parahaemolyticus* ni *cholerae*.
- Se encontró que el 39,5% de aislados compatibles a *Vibrio spp.* fueron resistentes a Ampicilina.
- El crecimiento de bacterias Gram positivas en agar TCBS demuestra que el medio no es del todo selectivo para *Vibrio spp.*
- No se aislaron muestras positivas a *Salmonella spp.*
- Se identificó mediante el kit comercial API 20E *Acinetobacter baumannii* procedente de la playa Santa Rosa

## X. RECOMENDACIONES

- Confirmar mediante pruebas moleculares los aislados identificados mediante el kit comercial API 20E como *V. alginolyticus* y *V. fluvialis*.
- Continuar con el monitoreo de *Vibrio* spp. y *Salmonella* spp. en los puntos evaluados por parte de las autoridades pertinentes e incluyendo el agua de mar.
- Evaluar la presencia de *Vibrio* spp en otros moluscos bivalvos para consumo.
- Evaluar la presencia de los patógenos evaluados en otras playas con bancos naturales o con presencia de maricultura.
- Evaluar otros agentes patógenos de importancia en la salud pública y producción de moluscos bivalvos.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allton D., Forgione M., Gros S. 2006. Cholera-like presentation in *Vibrio fluviales* enteritis. *South Med J*.99 pp 765-767. Disponible en [<http://dx.doi.org/10.1097/01.smj.0000223657.22296.e6> Medline]

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. *Rev Med Hered* [online]. vol.21, n.3 [citado 2017-05-08], pp. 139-145

Baltazar P., Palacios J.2015. La acuicultura en el Perú:producción, comercialización, exportación y potencialidades. *Rec. Mar. Acui.* VII (2015): 293-305.

Bances S., Castañeda J. 2010. Evaluación ambiental en la zona marino costera de Lambayeque-Perú 2010. *Inf. Instituto del Mar del Perú(IMARPE)*.Vol. 42, N°3 Julio-Setiembre 2015.

Bances S., Ramirez P. 2016. Evaluación ambiental en la zona marino costera de Lambayeque- Perú. Instituto del Mar del Perú (IMARPE) Mayo-Junio 2016. Disponible en [[http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/reportes/imarpe\\_cal16\\_cal1\\_amb1\\_junio\\_2016.pdf](http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/reportes/imarpe_cal16_cal1_amb1_junio_2016.pdf)]

Barqueiro-Cárdenas E., Borabe L.,Goldaracena-Islas C., Rodríguez-Navarro J. 2007. Los moluscos y la contaminación. Una revisión. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 78: 1S-7S.

Cortazas A., Silva P. 2004. Métodos físico-químicos en biotecnología. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Cortés-Lara M. 2003. Importancia de los coliformes fecales como indicadores de contaminación en la Franja Litoral de Bahía de Banderas, Jalisco-Nayarit. *Rev Biomed* 14(2):121-123.

Costinar L., Herman V., Pascu C., Marcu A., Marcu A., Faur B. 2010. Isolation and characterization of *Vibrio alginolyticus* and *Pasteurella* spp. from Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*). *Lucrari Stiintifice Medicina Veterinara Vol XLIII* (1).

De la Cruz J., Ramírez P., Llanos J. 2015. Evaluación de bancos naturales de “Palabritas” (*Donax spp.*) en el litoral de Lambayeque, 2010. Informe Instituto del Mar del Perú. 42(3): 321-327

EUCAST. 2017 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Reading guide EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing. Version 5.0. [Internet]. [Access february 13th 2017] Disponible en: [http://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/disk\\_diffusion\\_methodology/](http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/)

Eun-Gyoung O., Kwang-Tae S., Hongsik Y., Tae-Seek L., Soonbum S., Ji-Young K., Kunbawui P., Jihoe K. 2010. Antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* Strains isolated from Farmed Fish in Korea during 2005-2007. *Journal of food protection*. 74 (3):380-6

Feingold M., Kumar M. 2004. Otitis Media Associated with *Vibrio alginolyticus* in a Child with Pressure-equalizing tubes. *The Pediatrics Infectious Disease Journal*. Vol 23.Issue 5. P 475-476

Fernández A., Bravo L., Águila A., Cruz Y., Illnait M., Llop A., Hernández J., Blanco S., Bebelagua D. 2016. Susceptibilidad antimicrobiana en aislamientos cubanos de *Vibrio cholerae* O1 procedentes de muestras clínicas. *Rev Cubana Med Trop* 68(1)

Ferrini A., Mannoni V., Suffredini E., Cozzi L., Croci L. 2008. Evaluation of antibacterial resistance in *Vibrio* strains isolated from imported seafood and Italian Aquaculture stings. *Food Anal. Methods* 1:164-170

Flores V. 2017. Aislamiento y caracterización de un bacteriófago con actividad lítica para *Vibrio fluvialis*. Tesis para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 73 p.

Food and Drugs Administration [base de datos en Internet]. Bacteriological Analytical Manual Chapter 5. Salmonella : 2016

Food and Drugs Administration [base de datos en Internet]. Bacteriological Analytical Manual Chapter 9. Vibrio : 2004

Food and Agriculture Organization. 2010. Depuración de bivalvos: aspectos fundamentales y prácticos. Documento Técnico de Pesca. ISSN 1014-1138

Gaynes R., Edwards J. 2005. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis.* 41(6):1701-5

Gargouti A., Ab-Rashid M, Ghazali M., Mitsuaki N., Haresh K, Radu S. 2015. Detection of tdh and trh Toxic Genes in *Vibrio alginolyticus* Strain from Mantis shrimp (*Oratosquilla oratoria*). *Journal of Nutrition & Food Sciences.* 5;5

González MI. 2006. Identificación De especies del género *Vibrio* aisladas de aguas costeras. Disponible en : [www.bvsde.paho.org/bvsaidis/puertorico/xx.pdf](http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/puertorico/xx.pdf)

Gonzales I., Sanjinez M., Beltrán L., Macalupú J., Caccha L., Rodríguez A., Quispe J. 2009. Delimitación y caracterización de los bancos naturales de invertebrados marinos, zonas de pesca artesanal y áreas propuestas para maricultura, entre Punta Foca y Bocana de Colán, en el litoral de la región Piura. Informe del Instituto del Mar del Perú.

Graü C., La Barbera A., Zerpa A., Silva S., Gallardo O.. 2006. Aislamiento de *Vibrio spp.* y evaluación de la condición sanitaria de los moluscos bivalvos *Arca zebra* y *Perna perna* procedentes de la costa nororiental del Estado de Sucre, Venezuela. Red Rev Cien. A.Latina y el Caribe, Esp y Por. Pag 1-17

Graü de M. C., Zerpa A., Berti O., 2000. Patógenos emergentes transmitidos por moluscos bivalvos del estado de Sucre. Acta Científ. Venez. 51. Suplemento N°2:147

Guevara-Carrasco R., Bertrand A. (Eds.).2017. Atlas de la pesca artesanal del mar del Perú. Edición IMARPE-IRP, Lima, Perú, 183 pp.

Han F., Walker R., Janes M., Prinyawiwatkul W., Ge B.. 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Gulf and Retail Raw Oysters. Appl Environ Microbiol. 2007 Nov; 73(21): 7096-7098.

Henriquez M., Álvarez A., Juárez P., Natividad I., Curiel E., Vázquez C., Quiñones E. 2016. Virulence factors and antimicrobial resistance in environmental strains of *Vibrio alginolyticus*. Int Microbiol. 19(4):191-198

Hudzicki J. 2009. Kirby-bauer disk diffusion susceptibility test protocol. American Society for Microbiology Disponible en [ <http://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3189>]

Hollenbeck E., Fong J., Youn Lim J., Yildiz F., Fuller G., Cegelski L. 2014. Molecular Determinants of Mechanical Properties of *V. cholera* Biofilms at the Air-Liquid Interface. Biophys J. 107 (10).

Igbinosa E., Okoh A. 2010. *Vibrio fluvialis*: un patógeno entérico inusual de creciente preocupación de salud pública. Int J Environ Res Public Health. Oct 7(10): 3628-3643

Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI). 2010. Manual de Procedimientos: Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en *Vibrio cholerae*. INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” Argentina.

Lafisca A., Pereira C., Giaccone V., Rodrigues D. 2008. Enzymatic Characterization of *Vibrio alginolyticus* Strains Isolated from Bivalves Harvested at Venice Lagoon (Italy) and Guanabara Bay (Brazil). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 50(4):199-202

Lanz K., Ortiz K., Pérez E., Santizo A. 2012. Inhibición de microorganismos causales de infecciones subdérmicas por plantas nativas de uso medicinal. Tesis. Universidad de San Carlos de Guatemala

Lai C., Hwang C., Chin C., Lin H., Wong C., Liu Y. 2006. Severe watery diarrhoea and bacteraemia caused by *Vibrio fluvialis*. *J Infect*. 52 pp 95-98

Leyva V., Puig Y., Espino M., Pereda G., Portela N., Luis P., Roble O. 2013. Especies patógenas de *Vibrio* aisladas en alimentos de origen marino. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*. Vol 23 N° 1: 31-43

Llanos J., Galán J., Castañeda J., Castro J., De la Cruz J., Ramírez P., Bances S., Torres D. 2009. Investigaciones de Imarpe- Sede Lambayeque, durante 2009. Instituto del Mar del Perú. Disponible en <http://www.imarpe.gob.pe/chiclayo/informes/Inf%20Anual%202009.pdf>

Macaluso A., Gabrieli R., Lanni L., Saccares S., Pana A., Divizia M. 2004. Enteric viruses and bacteriological parameters in molluscs. *Annali di Igiene* 16, 237-245.

Mannas H., Mimouni R., Chaouqy N., Hamadi F., Martínez-Urtaza J. 2014. Occurrence of *Vibrio* and *Salmonella* species in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected along the Moroccan Atlantic coast. *Us National*

Library of Medicine. Disponible en  
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4057555/>]

Marcos A., Gómez M., Hung A. 2014. Detección del virus de la Hepatitis A en dos muestras de agua del río Sechura, usando transcriptase-reversa PCR en tiempo real. *Salud y Tecnología Veterinaria* 2.1: 1-6

Márquez J. 2017. Determinación de la calidad microbiológica en moluscos bivalvos y agua de mar en la Bahía de Sechura-Piura. Tesis. Universidad Nacional Agraria La Molina

Martins M., Mouriño J., Fezer G., Buglione Neto C., Garcia P., Silva B., Jatobá A., Vieira F. 2010. Isolation and experimental infection with *Vibrio alginolyticus* in the sea horse, *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Osteichthyes: Syngnathidae) in Brazil. *Braz. J. Biol.* Vol. 70 no. 1 Sao Carlos

Memish Z., Shibl A., Kambal A., Ohaly Y., Ishaq A. 2012 Antimicrobial resistance among no-fermenting Gram-negative bacteria in Saudi Arabia. *J Antimicrob Chemother.* 67(7):1701-5.

Organización Mundial de la Salud. 2018. Centro de prensa. Notas descriptivas Disponible en [<http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>]

Paredes C., Cardoso F. 2001. El Género *Donax* en la costa peruana (Bivalvia: Tellinoidea). *Rev. Per. Biol.* 8(2)

Polo D., Vilariño M., Manso C., Romalde J. 2010. Imported Mollusks and Dissemination of Human Enteric Viruses. *Emerg Infect Dis.* Jun; 16(6): 1036-1038.

Polo F., Figuera M., Inza I., Sala J., Fleisher J., Guano J. 1998 Relationship between the presence of *Salmonella* and indicators of faecal pollution in aquatic habitats. *FEMS Microbiol. Lett.* 160:253-256

Raissy M., Moumeni M., Ansari M., Rahimi E. 2012. Antibiotic resistance pattern of some *Vibrio* strains isolated from seafood. Iranian Journal of Fisheries Sciences 11(3) 618-626

Rammamurthy T., Chowdhury G., Pazhani G., Shinoda S. 2014. *Vibrio fluvialis*: an emerging human pathogen. Front Microbiol 5:91

Ristori C., Iaria S., Gelli D., Rivera L. 2007. Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliana*) and estuarine water along the south coast of Brazil. International Journal of Environmental Health Research 17, 259-269

Romalde J., Torrado I., Ribao C., Barja J. 2002. Global market: shellfish imports as a source of reemerging food-borne hepatitis A virus infections in Spain. International Microbiology 4(4):223-6

Ruíz C. 2012. Identificación de bacterias del género *Vibrio*, aislados del tracto digestivo del lenguado *Etropus ectenes*. Desarrollo Local Sostenible. Vol 5,Nº14 (Junio 2012)

Setti I., Rodríguez-Castro A., Martínez-Urtaza J. 2009. Characteristics and dynamics of *Salmonella* contamination along the coast of Agadir, Morocco. Appl Environ Microbiol. 75(24):7700-7709.

Smith C., Reynard A. 1995. Farmacología. Médico Panamericano Buenos Aires, Argentina.

Taboada D, Russac H, Ramos de Ormachea C. 1974. Aislamiento de enterobacterias en algunos moluscos del mar peruano. Rev Per Biol 1(2):123-127. Vega J. 2010. Incidencia de bacterias del género *Vibrio* sp. como indicadores de contaminación fecal presentes en moluscos bivalvos en La Ensenada de La Paz, B. C. S y áreas adyacentes. Tesis de Biólogo Marino. La Paz, Baja California Sur: Universidad Autónoma de Baja California Sur. 45 p.

Tafur J., Torres J., Villergas M. 2011. Mecanismos de Resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. Asociación Colombiana de Infectología. Vol 12 N°3

Thompson E., Austin B., 2006. The biology of vibrios. Wallingford DC. Pp 357-411.

Usó J., Tirado M., Moreno R., Campos A. 2010. Diarrea por *Vibrio fluvialis* en un paciente infectado por el VIH. Carta científica. Enferm IN FCC Microbiol Clin . 28:748-9

Vela L., Gálvez K., García A. 2013. Planteamiento estratégico para el desarrollo. Caso de la Acuicultura en Lambayeque-Perú 2014-2018. Un enfoque ecosistémico y de desarrollo sostenible. Instituto de Economía y Desarrollo (INEDES)

Vila J., Álvarez-Martínez M., Buesa J., Castillo J. 2009. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. Enferm Infecc Microbiol. 27(7): 406-411

Wafaa B., Walaa H., Amani A. 2011. Detection of Salmonella and Vibrio species in some seafood in Alexandria. Journal of American Science 2011;7 (9):663-668

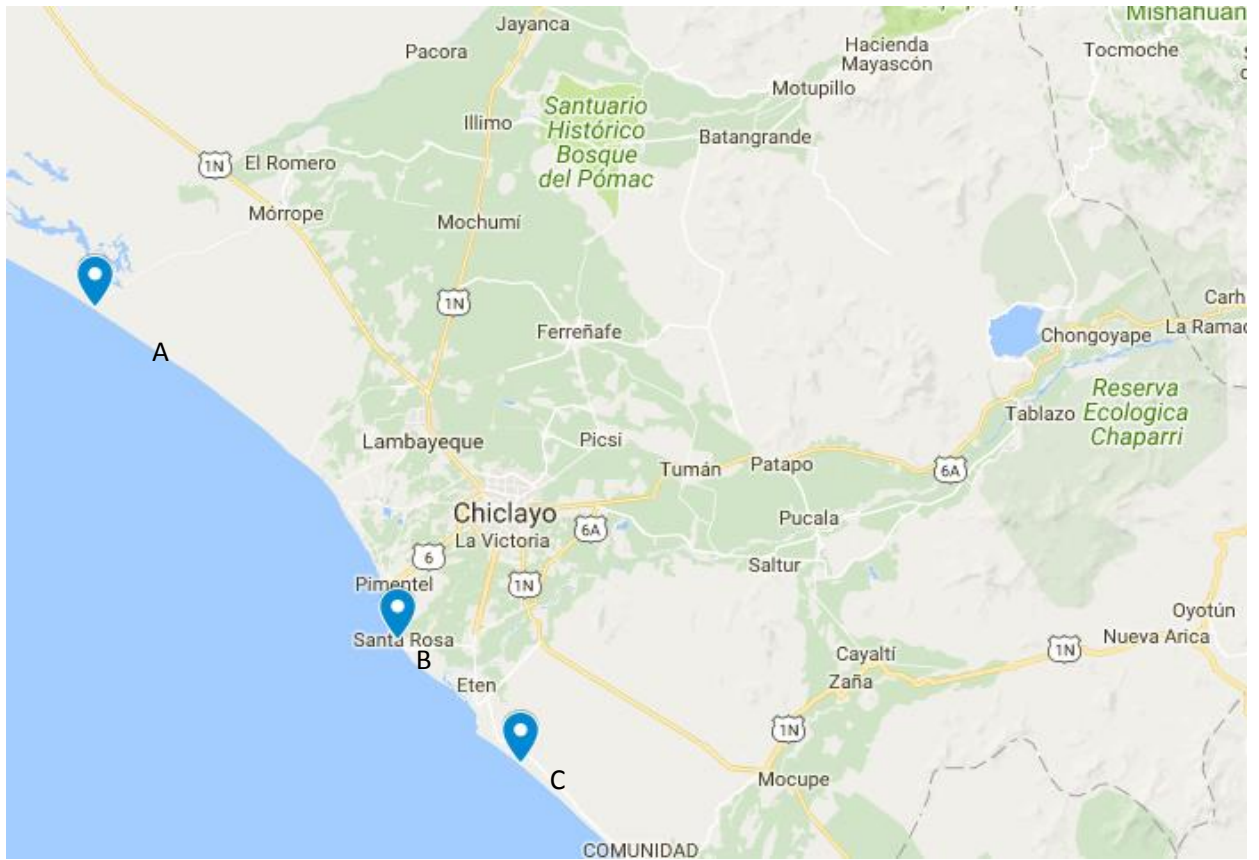
Yadón Z, Schmunis G. 2000. Sensibilidad de *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio cholerae* a los antimicrobianos en las Américas 1940-1997. En: Salvatierra González R, Benguini Y, editores. Resistencia Antimicrobiana en las Américas: magnitud del problema y su contención. Washington: Organización Panamericana de la Salud.

Zanetti S., Deriu A., Volterra L., Falchi M., Molicotti P., Fadda G., Sechi L.

2000. Virulence factors in *Vibrio alginolyticus* strains isolated from aquatic environments. Ann Ig. Nov- Dec: 12(6):487-91

## XII. ANEXOS

**Anexo 1.-** Ubicación de los lugares de muestreo: Playa Los Lobos (A), Playa Santa Rosa (B) y Playa San Pedro (C). Lambayeque, Perú.



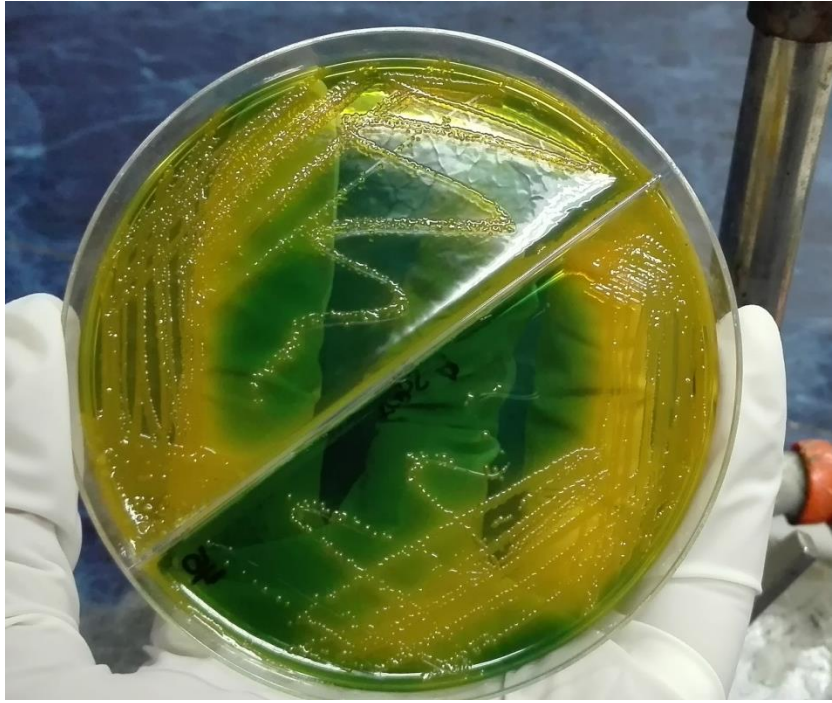
**Anexo 2.-** Muestreo realizado de manera manual para la colección de *Donax* spp..  
Lugar: Playa Santa Rosa.



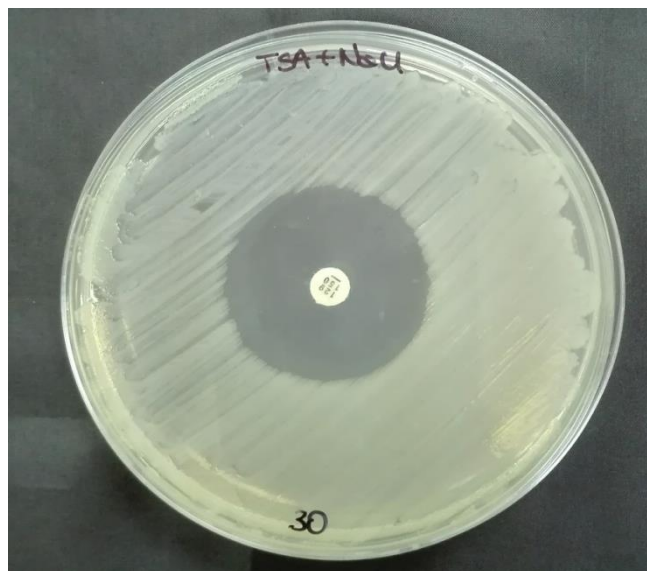
**Anexo 3.-** Medición de longitud valvar de ejemplar de *Donax* spp. con vernier acorde a la talla comercial.



**Anexo 4.-** Aislado compatible a *Vibrio* spp. en agar TCBS.



**Anexo 5. –** Aislado sensible al agente vibriostático O/129



**Anexo 6.-** Antibiograma realizado en aislado compatible a *Vibrio* spp. [resistencia a Ampicilina en la placa 73 (izquierda) y sensibilidad a todos los antibióticos usados en la placa 42 (derecha).]

