



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
ESCUELA DE POSGRADO

**DETECCIÓN DE ESPECIES  
PATOGENICAS DEL GÉNERO *Vibrio*  
EN LANGOSTINO BLANCO  
(*Litopenaeus vannamei*) DE CENTROS  
DE CRIANZA DE LA REGIÓN  
TUMBES, MEDIANTE LA  
APLICACIÓN DE UN PROTOCOLO  
DE PCR MÚLTIPLE**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN SANIDAD ACUÍCOLA

M.V. ARMANDO ANDRÉS  
ROSADO SALAZAR

LIMA - PERÚ

2019



**ASESOR DE TESIS**

Dr. Mg. MV. Marcos Enrique Serrano Martínez

**CO-ASESOR DE TESIS**

Dr. MV. Luis Antonio Llanco Albornoz

## **DEDICATORIA**

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

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

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

A mi sobrina, por ser mi motivo de felicidad.

A mi tío Ronald y a Stalin.

A mi familia, por ser todo para mí.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. M.V. Luis Llanco Albornoz, por su orientación y asesoramiento integral, durante la conceptualización y realización de la Tesis, además de su gran amistad, apoyo y guía.

A la Srta. Mg. MVZ. Muriel Gómez-Sánchez Orezza, por permitirme realizar el muestreo por medio de SANIPES y por la amistad que nos une.

Al Organismo Nacional de Sanidad Pesquera – SANIPES, por financiar parte del proyecto, además de permitirme realizar el muestreo y el primer análisis microbiológico en sus instalaciones de Tumbes.

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

A los miembros del Jurado de Tesis, Mg. M.V. Daphne León Córdova, Mg. M.V. Néstor Falcón Pérez y DMV Carlos Shiva Ramayoni, por las orientaciones en torno a la optimización de las tesis, así como sus consejos profesionales.

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

Al DMV Carlos Shiva Ramayoni, por permitirme usar el laboratorio de Microbiología, así como el laboratorio de Inocuidad Alimentaria, ambos a su cargo, para realizar el aislamiento microbiológico y pruebas bioquímicas.

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

A la Blga. Violeta Flores Dominick, encargada del Laboratorio de Patobiología Acuática del Instituto del Mar del Perú – IMARPE, por la orientación y la ayuda brindada en torno al análisis microbiológico de las cepas presuntivas, además de la amistad que nos representa.

A mis compañeros de Maestría: Fariva Vicuña, Milagros Cabrera, Carmen Hurtado, Tania Rodríguez, Milene Villalobos, Cecilia Huanambal, Andrea Vicente, Karol Quevedo, Carlos Távara, Fernando Mesías y André Sánchez, por su magnífica amistad, orientación profesional y personal, y apoyo incondicional en cada etapa y momento.

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

Al PhD. MSc. M.V. Enrique Serrano, por el apoyo al Programa de Maestría.

## **FUENTE DE FINANCIAMIENTO**

La realización de esta tesis para optar el grado de Magister en Sanidad Acuícola ha sido posible gracias al apoyo financiero brindado al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la Universidad Peruana Cayetano Heredia subvencionado por FONDECYT del CONCYTEC, Convenio de Gestión N° 230-2015-FONDECYT-DE-PROMOCION 2.





## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1:</b> Especies del género <i>Vibrio</i> , identificadas mediante bioquímica .....	31
<b>Cuadro 2:</b> Especies patogénicas del género <i>Vibrio</i> , identificadas mediante PCR Múltiple .....	32
<b>Cuadro 3:</b> Identificación fenotípica y molecular de <i>Vibrio</i> spp .....	33
<b>Cuadro 4:</b> Concordancia entre la identificación presuntiva y detección molecular de las 9 cepas reconocidas como especies del género <i>Vibrio</i> .....	56
<b>Cuadro 5:</b> Diferencia entre la identificación presuntiva y detección molecular de las 20 cepas reconocidas como especies del género <i>Vibrio</i> .....	57

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo de Vida de <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	5
<b>Figura 2:</b> Pools de Hepatopáncreas homogenizados, listos para ser sembrados en agar TCBS .....	22
<b>Figura 3:</b> Colonias presuntivas de <i>Vibrio</i> , en agar TCBS .....	23
<b>Figura 4:</b> Reactivación de aislados, resiembra en agar TCBS y posterior purificación en agar Trypticase Soja .....	24
<b>Figura 5:</b> Pruebas de Oxidasa y Catalasa. Se observa reacción positiva en ambas, lo cual es indicativo de <i>Vibrio</i> spp .....	24
<b>Figura 6:</b> a. Aislado de <i>Vibrio</i> sp. con fermentación de la Sacarosa (Sacarosa <sup>+</sup> ), compatible con las especies <i>V. cholerae</i> , <i>V. harveyi</i> y <i>V. alginolyticus</i> . .....	25
b. Aislado de <i>Vibrio</i> sp. sin fermentación de la Sacarosa (Sacarosa <sup>-</sup> ), compatible con las especies <i>V. mimicus</i> , <i>V. vulnificus</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> . .....	25
<b>Figura 7:</b> Prueba de Halotolerancia, salinidades 2%, 6%, 8% y 10% .....	26
<b>Figura 8:</b> Crecimiento de cepas de <i>Vibrio</i> en BHI, para la extracción de DNA .....	27

<b>Figura 9:</b> PCR Múltiple para cepas control .....	34
<b>Figura 10:</b> PCR Múltiple para cepas control .....	34
<b>Figura 11:</b> PCR Múltiple para cepas control .....	35
<b>Figura 12:</b> PCR Múltiple para cepas <i>Vibrio</i> spp .....	35

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Cebadores del PCR Múltiple para <i>Vibrio</i> .....	29
---	----

## RESUMEN

Las especies del género *Vibrio* actúan como patógenos oportunistas de langostinos, ya que pertenecen a su microbiota residente. Además, son agentes etiológicos de gastroenteritis y septicemias en humanos. En el Perú no se cuenta con información sobre estas especies, que afectan a la industria langostinera, haciéndose necesaria la identificación de éstas mediante pruebas bioquímicas y de biología molecular. El objetivo del estudio fue la detección, tanto fenotípica como molecular de estas especies en la acuicultura langostinera. Se obtuvieron 61 aislados de *Vibrio* de langostinos de crianza de la región Tumbes. Se realizaron dos pruebas bioquímicas para la diferenciación presuntiva a nivel de especie: Fermentación de Sacarosa y Halotolerancia, obteniéndose 8 cepas de *Vibrio cholerae*, 3 cepas de *V. mimicus*, 11 cepas de *V. harveyi*, 9 cepas de *V. vulnificus*, 8 cepas de *V. parahaemolyticus* y 9 cepas de *V. alginolyticus*. Mediante PCR Múltiple, usando cebadores específicos para cada especie, se obtuvieron: 8 cepas de *Vibrio mimicus*, 17 cepas de *V. parahaemolyticus* y 4 cepas de *V. alginolyticus*. Los resultados obtenidos permiten actualizar la información referente a las especies de *Vibrio* presentes en la acuicultura langostinera. Finalmente, la implementación del protocolo de PCR Múltiple permitirá conocer de manera precisa y con mayor rapidez la presencia de especies de *Vibrio* con potencial patogénico para la industria langostinera, realizar estudios de prevalencia y toxicidad de estos microorganismos y tomar adecuadas medidas preventivas.

**Palabras claves:** langostino blanco, *Vibrio*, Tumbes, PCR múltiple, acuicultura

## ABSTRACT

*Vibrio* species act as opportunistic prawns pathogens, since they belong to their resident microbiota. In addition, they are etiological agents of gastroenteritis in humans. In Peru there is no information on these species, which affect the shrimp industry, making it necessary to identify them through biochemical and molecular biology tests. The objective of the study was the detection, both phenotypic and molecular, of these species in shrimp aquaculture. Sixty-one *Vibrio* isolates of prawns from the Tumbes region were obtained. Two biochemical tests were carried out for presumptive differentiation at the species level: Fermentation of Sucrose and Halotolerance, obtaining 8 strains of *Vibrio cholerae*, 3 strains of *V. mimicus*, 11 strains of *V. harveyi*, 9 strains of *V. vulnificus*, 8 strains of *V. parahaemolyticus* and 9 strains of *V. alginolyticus*. Using PCR Multiplex, and specific primers for each species, we obtained: 8 strains of *Vibrio mimicus*, 17 strains of *V. parahaemolyticus* and 4 strains of *V. alginolyticus*. The results obtained allow to update the information regarding the *Vibrio* species present in shrimp aquaculture. Finally, the implementation of the PCR Multiplex protocol will allow to know more accurately and more quickly the presence of *Vibrio* species with pathogenic potential for the shrimp industry, to carry out studies on the prevalence and toxicity of these microorganisms and to take appropriate preventive measures.

**Key words:** white shrimp, *Vibrio*, Tumbes, PCR Multiplex, aquaculture

## I. INTRODUCCIÓN

La producción de langostino blanco, *Litopenaeus vannamei*, es una de las principales actividades acuícolas del país. En el hemisferio occidental, los principales países langostineros son Ecuador, Brasil, Honduras y México, contribuyendo con el 20% del total mundial (Lightner, 2011). En el Perú, la acuicultura langostinera se realiza mayoritariamente en el departamento de Tumbes, el cual ha adquirido notoriedad los últimos años, alcanzando una producción a gran escala (mayor de 50 toneladas al año), aunque en algunos casos se desarrollan cultivos de menor escala (2 a 50 toneladas al año) (PRODUCE, 2015).

Sin embargo, el impulso de esta actividad acuícola ha sufrido problemas debido a la Vibriosis, siendo ésta, una de las enfermedades bacterianas que más afectan a la producción langostinera. Las bacterias del género *Vibrio*, frecuentemente, son encontrados en camarones peneidos silvestres y de cultivo, tanto en fase larvaria, como de engorde, produciendo un impacto económico importante en la industria langostinera, debido a que ocasiona la saca innecesaria de animales por fallos en el diagnóstico, tanto de animales enfermos como de portadores. Las especies que producen las diferentes presentaciones de Vibriosis son patógenos oportunistas, manifestándose los signos clínicos cuando se deprime el sistema inmunitario (Cuellar-Anjel, 2013).

Es de gran relevancia el diagnóstico temprano de Vibriosis ya que la enfermedad es de importancia en Salud Pública, teniendo como una de las vías de transmisión el consumo del recurso langostino, que puede derivar en un cuadro de Gastroenteritis en Humanos (Franco-Monsreal *et al.*, 2010).

En la presente investigación se identificó las principales especies patogénicas del género *Vibrio*, fenotípicamente, mediante pruebas bioquímicas, así como molecularmente, adaptando un protocolo de PCR Múltiple, para detectar simultáneamente varias especies, a partir de muestras de tejidos de langostinos. Se aporta a la identificación más rápida y precisa las especies de *Vibrio* causantes de cuadros clínicos en el langostino, que, por métodos microbiológicos tradicionales, lo que contribuirá a un mejor tratamiento y evitando el uso indiscriminado de antibióticos, así como conocer las especies de *Vibrio* presentes en la región Tumbes.

## II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

### 2.1 Planteamiento del Problema

Es conocido que las especies causadoras de las diferentes presentaciones de Vibriosis actúan como patógenos oportunistas, ya que hacen parte de la microbiota autóctona de los langostinos, ocasionando la manifestación de signos clínicos cuando el sistema inmunitario está deprimido. En nuestro país no se cuenta con información actualizada sobre las especies de *Vibrio* spp, que afectan a la industria langostinera, haciéndose necesaria la identificación de estas especies mediante pruebas bioquímicas convencionales, o empleando herramientas de biología molecular. Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, se hace necesario emplear un método rápido, sensible y de fácil aplicación que ayude a disminuir las pérdidas económicas por saca de animales antes de la presentación clínica de la enfermedad, optimizando la implementación del tratamiento y/o de medidas preventivas, así como generar datos para estudios epidemiológicos.

### III. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Biología del Langostino blanco

*Litopenaeus vannamei* (langostino blanco) es un crustáceo originario de la costa americana del Océano Pacífico, encontrándose desde el norte de México (provincia de Sonora) hasta el norte del Perú (departamento de Tumbes). La taxonomía del *Litopenaeus vannamei*, detallada por **Feijoo (2009)** es la siguiente:

Reino: **Animalia**

Filo: **Arthropoda**

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

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

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

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

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

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

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

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

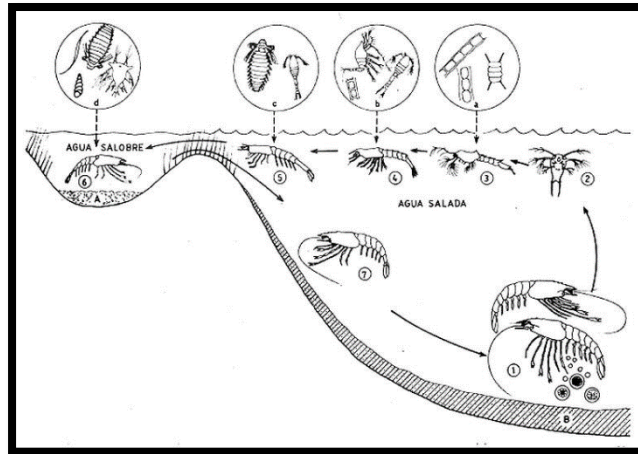
Subfamilia: **Penaeinae** (Dana, 1852)

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

Especie: *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

Los hábitats comunes de este recurso acuícola son las aguas con una temperatura que supera los 20 ° C, preferencialmente las áreas de fondos fangosos y encontrándose en profundidades de hasta 72 m, tanto en estuarios como en aguas

marinas. El desarrollo del langostino blanco se da en tres etapas: primero habitando en aguas oceánicas, refugiándose luego en aguas costeras y/o estuarios, hasta la etapa de juveniles, donde finaliza la etapa de crecimiento, retornando al mar para reproducirse (Feijó, 2009), como se detalla en la **imagen 1**.



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

### 3.2 Acuicultura Langostinera

La FAO (2006), señaló que, en Tumbes - Perú, se utiliza el sistema de crianza semi-intensiva, con una densidad de siembra entre 10 y 30 post larvas/m<sup>2</sup>, teniendo dos cosechas al año. La producción se inicia con postlarvas en estadíos 10 – 12 teniendo como características la rápida adaptación a los piensos comerciales, crecimiento rápido, buena tolerancia a los cambios ambientales y resistencia a estrés y/o enfermedades.

El tamaño comercial es de 18-23 cm, con un peso de 10-25 gramos. El recurso langostino es un producto de exportación a Europa y países como Japón y Estados Unidos. En el año 2015, en el departamento de Piura, se obtuvo una producción total de 4,037.640 toneladas métricas, y en el departamento de Tumbes, la

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

### **3.3 Sistema de Crianza**

#### **3.3.1 Crianza Extensiva**

Este tipo de crianza es muy utilizada en Latinoamérica. Los cultivos se desarrollan en zonas intermareales, donde no hay aireación ni bombeo de agua. Los estanques tienen, por lo general, una superficie de entre 5 y 10 ha (o hasta 30 ha), con una profundidad de entre 0,7 a 1,2 m, de forma irregular. Anteriormente se aprovechaba la marea alta, que traía semilla silvestre que ingresaba a los estanques, cambiándose esa modalidad por la utilización de PL (postlarva) obtenida de las incubadoras. La alimentación consiste en alimentos obtenidos de forma natural mediante fertilización, y administrando piensos con bajo valor proteico una vez al día. Se realizan una o dos cosechas al año, cada 4 o 5 meses, con rendimientos de 150–500 kg/ha/cosecha, obteniéndose langostinos pequeños de entre 11 y 12 g (FAO, 2009).

#### **3.3.2 Crianza Semi-intensiva**

En este tipo de crianza los estanques presentan una superficie de 1–5 ha, con una profundidad de entre 1 y 1,2 m, empleando semillas producidas en incubadoras, obteniéndose una densidad de siembra entre 10 y 30 PL/m<sup>2</sup>. El agua es cambiada mediante bombeo, empleándose un mínimo de aireación artificial. La alimentación consiste en alimentos naturales obtenidos mediante fertilización del estanque, dieta complementada con pienso 2 o 3 veces/día. Se realizan dos

cosechas por año, con rendimientos de producción que oscilan entre 500 y 2 000 kg/ha/cosecha (FAO, 2009).

### **3.3.3 Crianza Intensiva**

Este tipo de crianza se realiza mayoritariamente en Asia y en centros de elevada producción en Latinoamérica. Los centros de cultivo intensivos se encuentran alejados de las zonas intermareales, preparando los estanques, drenándolos en su totalidad, secándolos y alistándolos antes de cada producción. Los estanques generalmente son de tierra, pudiéndose también adaptar membranas de recubrimiento para mejorar la calidad del agua y reducir la erosión. Los estanques son pequeños (0,1–1,0 ha), con una profundidad media de 1,5 m. La densidad de siembra va de 60 a 300 PL/m<sup>2</sup>. Se requiere aireación, para la oxigenación y circulación del agua. La dieta está basada en piensos comerciales suministrándolos 4 a 5 veces al día (FAO, 2009).

Debido a la prevalencia y diseminación de agentes virales, se están usando semillas de reproductores libres de patógenos (SPF) o semillas resistentes a patógenos específicos (SPR). Se logra una producción variada entre 7 y 20 000 kg/ha/cosecha, realizándose alrededor de 2 a 3 cosechas por año, con un máximo de 30 a 35 000 kg/ha/cosecha (FAO, 2009).

### 3.4 Especies del género *Vibrio*

Las especies del género *Vibrio* son bacterias gram negativas, habitantes naturales de la microbiota marina y de langostinos silvestres y de cultivo (Thompson *et al.*, 2004). Los vibrios son comúnmente aislados del sedimento marino, columna de agua, fitoplacton y zooplacton, moluscos bivalvos, cefalópodos y gasterópodos, crustáceos y peces. Asimismo, es frecuente la presencia de vibrios en meses calurosos (Silva *et al.*, 2008).

Las especies que tienen potencial patógeno, y, por lo tanto, causantes de Vibriosis, son: *Vibrio alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. fischeri*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. pelagicus*, *V. penaeicida*, y *V. vulnificus* (Garrity *et al.*, 2005). La clasificación taxonómica del género *Vibrio* es la siguiente, como lo estipula Garrity *et al.* (2005):

Phylum XIV: **Proteobacteria**

Clase III: ***Gammaproteobacteria***

Orden: ***Vibrionales***

Familia: ***Vibrionaceae***

Género: ***Vibrio***

Se conoce que las especies bacterianas del género *Vibrio* se encuentran con frecuencia en langostinos; aunque, no siempre causan patogenicidad, como lo demostraron Rodríguez-Camacho *et al.* (2014), en un estudio realizado en México, donde encontraron, mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa

(PCR), la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en langostinos blancos, pero negativos a los trazadores de toxigenia.

Respecto a lo anterior, Cuellar-Anjel (2013), además refiere que la bioluminiscencia de algunas especies de *Vibrio*, anteriormente asociada con patogenicidad, no es excluyente de estas y que esta característica también puede estar presente en no patógenas.

### **3.5 Vibriosis en Langostinos**

La Vibriosis es una enfermedad bacteriana, que tiene como agentes etiológicos a diferentes especies del género *Vibrio*, produciéndose la enfermedad mediante la multiplicación de cepas patógenas extracelulares y la expresión de factores de virulencia. La Vibriosis ha sido causa de mortalidad en poblaciones de langostinos a escala mundial, afectando durante la fase larvaria como de engorde (Liu *et al.*, 2014). Las fases larvaria y postlarvaria son las etapas más susceptibles a las infecciones por especies patógenas del género *Vibrio* (Gómez-Gil *et al.*, 2017). Las Vibriosis en langostinos pueden denominarse, según el área anatómica donde se presentan los signos clínicos, como Vibriosis Oral, Necrosis de la Cola, Vibriosis Entérica, Enfermedad del Intestino Blanco (WGD), Necrosis Séptica del Hepatopáncreas, Enfermedad Roja, Vibriosis Cuticular y de los Apéndices y Vibriosis Sistémica (Gómez-Gil *et al.*, 2011). El desarrollo de la patogenicidad del género *Vibrio* está influenciado por los cambios fisicoquímicos (temperatura y salinidad) y disponibilidad de nutrientes, siendo el rango de temperatura idónea de la enfermedad entre los 21-37 °C (Franco *et al.*, 2010).

El ingreso de los vibrios al organismo se puede dar por dos vías principales: la primera sucede a través de heridas (soluciones de continuidad), debido a la acción de bacterias quitinolíticas en el exoesqueleto. La segunda vía es por el intestino, considerado como el de mayor ingreso de patógenos, debido a la presencia de vibrios en el sedimento, agua y alimentos consumidos por los langostinos (Cuellar-Anjel, 2013).

Esta enfermedad, durante la etapa larvaria, tiene diferentes nominaciones, como Vibriosis y Vibriosis luminiscente, diferenciándose en la propiedad luminiscente de las cepas causadoras. Se le suele denominar también Enfermedad de las bolitas blancas, teniendo como lesión característica la descamación del epitelio hepato-intestinal, que puede ser de etiología bacteriana por *Vibrio* o de otra índole. En postlarvas, las especies de *Vibrio* ingresan vía oral, formando colonias en el intestino medio y el hepatopáncreas, produciendo septicemia y alta mortalidad en la población (Lightner y McVey, 1993; Bauer, 2018).

La transmisión puede ser del tipo vertical, en producciones de larvicultura y maduración, además del tipo horizontal, en las pozas de engorde. Otra vía de transmisión puede ser por contaminación de los huevos y nauplios, con desechos fecales de los progenitores, durante el desove y la eclosión. (Cuellar-Anjel, 2013).

Generalmente, las especies del género *Vibrio* más prevalentes en la acuicultura langostinera son las siguientes: *Vibrio cholerae*, *V. mimicus*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. furnissii*, cómo lo identificaron Jeyasanta

*et al.* (2017). Además, se tiene el dato que la infección general por *Vibrio* spp., en langostinos blancos de crianza, tiene una prevalencia media de 29 %, como lo detallaron Biju & Gunalan (2016).

### **3.5.1 Signos clínicos**

La Vibriosis, en la etapa de larvicultura, presenta signos clínicos como: coloración rojiza, acompañada de cromatóforos expandidos, arrastre de muda y músculo abdominal opaco. Además, hay colonización por vibrios en la región oral (Hameed *et al.*, 1996; Bauer *et al.*, 2018). En algunos animales se puede observar bioluminiscencia ya que presentan infección por cepas de *Vibrio harveyi* y *V. campbellii* (Baticados *et al.*, 1990; Soto-Rodríguez *et al.*, 2006; Pang *et al.*, 2006). Las larvas o postlarvas moribundas suelen ir al fondo del estanque y se observa una “capa” luminiscente sobre este (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990; Zhou *et al.* 2012). Durante la época de lluvia, son más frecuentes los brotes por cepas luminiscentes (Sunaryanto y Mariam, 1986; Morales y Cuellar-Anjel, 2014) y en presencia de bajas salinidades (Prayitno y Latchford, 1995; Morales y Cuellar-Anjel, 2014).

En la etapa de engorde, la Vibriosis puede presentar diversos signos clínicos, dependiendo de la patogenicidad del agente: nado errático, letargo, edema y coloración rojiza en los urópodos, pérdida del reflejo de huida, presencia en la orilla de la poza, anorexia, opacidad del músculo intestinal, perforaciones del exoesqueleto, melanización de la cutícula o apéndices rojos. Esto puede observarse en juveniles y adultos (Lightner y McVey, 1993).

### **3.5.2 Diagnóstico Diferencial**

Otras enfermedades como el Síndrome de la Mancha Blanca y el Síndrome de Taura se tienen como diagnóstico diferencial de Vibriosis (Cuellar-Anjel, 2013). El Síndrome de Taura es causado por un virus RNA, teniendo mortalidades acumulativas del 40 al 90 % en todos los estadios de *L. vannamei* mientras el agente etiológico del virus de la Mancha Blanca es un virus dsDNA, produciéndose la enfermedad en épocas frías donde, generalmente, el virus puede desenvolverse a temperaturas menores a 25 ° C (Lightner, 2011).

### **3.5.3 Vibriosis ante la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE)**

La Vibriosis, no es de notificación obligatoria ante la Organización Mundial de Salud Animal - OIE. Sin embargo, la Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND), causada por las toxinas Pir<sup>A</sup> y Pir<sup>B</sup> del *Vibrio parahaemolyticus*, es de notificación obligatoria, por lo que el Organismo Nacional de Sanidad Pesquera - SANIPES lo incluye en el Plan de Vigilancia Sanitaria de los Recursos Hidrobiológicos – Capítulo Crustáceos, presentando informe solo de langostinos silvestres (SANIPES, 2018).

### **3.5.4 Medidas de control**

Las principales medidas de control son referidas a la bioseguridad, principalmente en las pozas. Luego de la saca de animales y excreción del agua, se rastrilla y eliminan los sedimentos del fondo, se encala abundantemente y seca al sol por varias semanas. Otra medida a tomar es la desinfección de los equipos utilizados durante todo el ciclo de producción. Se pueden disminuir las pérdidas mediante el

cambio con animales reproductores libres de patógenos específicos (SPF), así también la aplicación de yodo en el agua de lavado de huevos y nauplios, lo cual ayuda a atenuar y destruir los vibrios evitando la siembra de postlarvas infectadas. Por otro lado, cada vez es más común, el uso de probióticos cuya efectividad haya sido comprobada contra Vibriosis. (ej. a base de *Lactobacillus* spp.) (Cuellar-Anjel, 2013).

Minimizar las causas de estrés, mediante el mantenimiento estable de los parámetros fisicoquímicos y biológicos del agua de cultivo, así como el mantenimiento óptimo de la calidad del agua y la salud de los langostinos, son posiblemente las medidas más eficientes de control (Cuellar-Anjel, 2013).

### **3.5.5 Métodos de Diagnóstico de Vibriosis**

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

Las técnicas bacteriológicas se basan en referenciar los valores de conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), utilizando el agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS), medio de cultivo selectivo para vibrios. En larvas sanas, en conteos de bacterias totales de hasta  $10^5$  UFC/g, menos del 10 % de bacterias totales son vibrios. En las larvas y postlarvas enfermas y/o sospechosas de enfermedad, la proporción de vibrios puede superar el 50 %, presentando similares conteos de bacterias totales. En el caso de juveniles, preadultos o

adultos, el conteo de colonias desde  $10^2$  UFC/g has  $10^4$  UFC/g de bacterias luminiscentes en Hepatopáncreas se toma como referencia para individuos sanos, mientras que los individuos enfermos se obtienen conteos de  $10^3$  UFC/mL en hemolinfa y  $10^5$  UFC/g en hepatopáncreas, utilizando el mismo medio de cultivo (Gómez-Gil *et al.*, 1998).

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

También se tiene como prueba molecular la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que cuando utiliza cebadores universales para bacterias, requiere el posterior secuenciamiento del producto amplificado ocasionando una pérdida considerable de tiempo y dinero (Cuellar-Anjel, 2013).

Para facilitar la identificación de especies de *Vibrio* patógenas humanas, Tebbs *et al.* (2011), diseñaron y validaron un PCR múltiple en tiempo real, altamente sensible y específico para identificar *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. cholerae*, detectándolos individualmente o en mezclas de 30 copias genómicas. El ensayo mostró una especificidad del 100 % para todos los objetivos analizados, y cada ensayo presentó una eficacia del  $100 \pm 10\%$ .

En el Perú, Dulanto (2013), realizó una identificación rápida de las especies del género *Vibrio*, (patógenas para langostinos, como de importancia en Salud Pública), mediante el método ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), reportando tres especies con similitud al *Vibrio core group*, siendo éstos: *Vibrio harveyi*, *V. communis* y *V. parahaemolyticus*. Su principal resultado fue la incorporación de este método, junto a los medios de cultivo, como métodos usados para el diagnóstico de especies del género *Vibrio*.

Kim y Bang (2007) también emplearon la técnica de PCR para lograr una detección rápida y precisa de algunas especies de *Vibrio*. Los cebadores diseñados para la región espaciadora intergénica 16S-23S rDNA (IGS) exhibieron una buena especificidad para diferentes especies de *Vibrio* spp siendo más sensible que el método de cultivo convencional. Este PCR Múltiple logró la identificación simultánea de las 5 especies de *Vibrio*: *Vibrio fluvialis*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. proteolyticus* y *V. vulnificus*, además de la detección de *Vibrio* spp desde muestras ambientales.

Caipang y Aguana (2013) hicieron una revisión de los PCR Múltiples utilizados para detectar vibrios patógenos que infectaron langostinos en las Filipinas. Estos PCR utilizaron un conjunto de diferentes cebadores para la amplificación de los genes de hemolisina y *toxR* en las cepas tipo de *Vibrio harveyi* y *V. campbellii*. Los productos de PCR resultantes, cuando se resolvieron en geles de agarosa después de la electroforesis, mostraron clara diferenciación de las cepas de *Vibrio*. Así, los cebadores diseñados por Castroverde *et al* (2006) amplificaron 320 pb del

gen de la hemolisina de aislamientos filipinos de *Vibrio* spp., que eran patogénicos para los langostinos. Los cebadores de Conejero y Hedreyda, (2003), para el gen *toxR* de la cepa tipo de *V. harveyi*, amplificaron un fragmento de 390 pb mientras que los cebadores que amplificaron un fragmento de 245 pb del gen *toxR* en la cepa tipo de *V. campbellii* fueron diseñados por Castroverde *et al* (2006). Todos los conjuntos de cebadores eran específicos de los respectivos genes y amplificaron a una temperatura de hibridación de 65 °C.

Más recientemente, Kim *et al.* (2015), realizaron pruebas de detección de nuevos marcadores genéticos utilizando genómica comparativa y desarrollaron un PCR múltiple para el diagnóstico fiable de las principales especies patógenas del género *Vibrio*: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* y *V. mimicus*.

### **3.6 Importancia de las bacterias del género *Vibrio* en Salud Pública**

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

Franco-Monsreal *et al.* (2010) identificaron especies patógenas del género *Vibrio* en alimentos marinos, en Campeche, México. El estudio determinó que *Vibrio parahaemolyticus*, *V. carchariae*, *V. alginolyticus* y *V. vulnificus* están presentes en cuatro tipos de preparación de alimentos de origen marino (crudos, marinados sin calor, parcialmente cocidos y totalmente cocinados), representando un factor de riesgo para el desarrollo de gastroenteritis aguda y septicemia primaria.

### **3.6.1 Vibriosis como Enfermedad de Transmisión Alimentaria en el Perú**

Gil *et al* (2007), determinaron las características epidemiológicas y clínicas de la gastroenteritis causada por *Vibrio parahaemolyticus* en el Perú, mediante registros de laboratorio e historias clínicas, evaluando la gravedad de la Enfermedad por Transmisión Alimentaria (ETA), relacionándola con la presencia de cepas del grupo pandémico, encontrando como resultado que, las cepas de este grupo causan cuadros clínicos más severos, recomendando que *V. parahaemolyticus* sea incluido como agente etiológico en los diagnósticos para ETA.

Asimismo, Gavilán y Martínez-Urtaza (2011), realizaron un estudio retrospectivo sobre los aspectos ecológicos asociados a las epidemias causadas por *Vibrio parahaemolyticus* y *V. cholerae* en el Perú, investigación que detalla que hay correlación entre las epidemias causadas por vibrios y los cambios ambientales, citando principalmente, el Fenómeno El Niño, como evento para transmisión de enfermedades

#### IV. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Actualmente, se hace necesario el conocimiento de las especies patógenas del género *Vibrio*, ya que producen patologías (Vibriosis) en el langostino blanco, siendo unas especies notificables ante la OIE, además que algunas son zoonóticas y han causado pandemias. Por lo tanto, es necesario contar con un registro de la presencia de especies de *Vibrio* patógenas, mediante un método eficaz y rápido de diagnóstico. Para ello, existen protocolos de PCR que utilizan cebadores universales para bacterias, los cuales son poco prácticos ya que requieren el secuenciamiento del producto para identificar a la especie involucrada. La aplicación de un PCR Múltiple específico para la identificación de las especies patógenas prevalentes del género *Vibrio*, aporta un método de diagnóstico rápido, que permita disminuir las pérdidas económicas, pueda ser usado por la industria langostinera nacional, además de inocuidad de los alimentos y en el tratamiento antimicrobiano temprano, disminuyendo el tiempo de espera de resultados, principalmente para conocer la especie predominante de *Vibrio* en los centros de producción del recurso langostino.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

- Detectar especies patogénicas de *Vibrio* spp, presentes en la acuicultura langostinera de la región Tumbes.

### 5.2 Objetivos específicos

- Aislar e identificar presuntivamente, del hepatopáncreas de langostinos, especies patogénicas del género *Vibrio* por métodos microbiológicos y bioquímicos convencionales.
- Identificar, a nivel molecular, las especies patogénicas del género *Vibrio* previamente aisladas, mediante PCR Múltiple.

## **VI. METODOLOGÍA**

### **6.1 Lugar de Estudio**

El aislamiento inicial se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Análisis del Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES) – Tumbes. El siguiente análisis microbiológico, así como el estudio bioquímico fue realizado en el Laboratorio de Microbiología, mientras que la identificación molecular fue realizada en el Laboratorio de Parasitología, ambas unidades pertenecientes a la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

### **6.2 Tipo de Estudio**

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

### **6.3 Población objetivo**

Langostinos blancos (*Litopenaeus vannamei*) procedentes de centros de crianza de la región Tumbes.

### **6.4 Tamaño de muestra**

El muestreo se llevó a cabo junto con la toma de muestra mensual llevada a cabo por SANIPES, referente al Plan Nacional de Vigilancia Sanitaria de Recursos Hidrobiológicos – Componente Crustáceos. Se colectaron un total de 130 langostinos de 17 centros de producción de la Región Tumbes. Estos centros de producción son Acuiculturas de Mediana y Gran Empresa (AMYGE). En total, se

muestrearon 26 pozas de producción. Las muestras se recolectaron de pozas de los sistemas productivos, tanto intensivos como semi-intensivos, de la etapa productiva de engorde, teniendo los animales como mínimo 3 meses de edad y 10 gramos de peso. La colección fue mediante pesca directa, usando una atarraya, directo de las pozas de producción. El muestreo se hizo por conveniencia tomando 5 individuos de cada poza, esta toma de muestra está estipulada por la autoridad competente en instalaciones langostineras para estudios específicos. La capacidad de detección, de especies patogénicas del género *Vibrio* en langostinos, es de al menos del 2%.

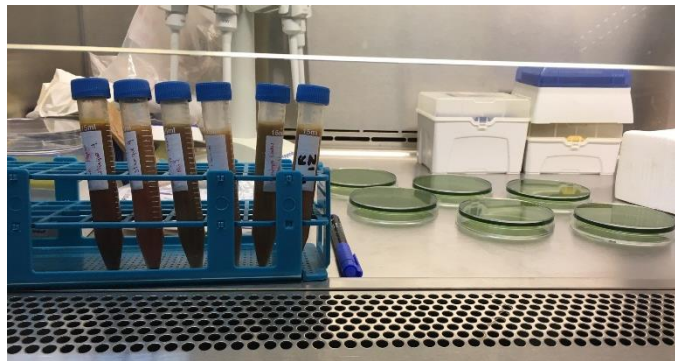
## **6.5 Análisis Microbiológico y Bioquímico**

### **6.5.1 Aislamiento de *Vibrio* spp desde hepatopáncreas.**

La eutanasia se desarrolló siguiendo los lineamientos del método de dos pasos, de las pautas de la AVMA (2013), contemplando lo siguiente: el primer paso; se sumergió a los langostinos durante 5 minutos en una bandeja con un litro de agua, conteniendo eugenol, a una concentración de 0.125 mL/L. Producida la anestesia, el segundo paso para la eutanasia se realizó por método físico, mediante punción directa al ganglio supraesofagal, o “cerebro”. Una vez sacrificado el animal, se extrajo el hepatopáncreas, retirando primero la cutícula del exoesqueleto, bajo condiciones de esterilidad, para luego realizar un corte en dirección latero-ventral, entre el cefalotórax y la base de los pereiópodos, en seguida, se expuso el hepatopáncreas y se diseccionó del intestino, del resto de órganos y tejidos del cefalotórax. Posteriormente, el hepatopáncreas se colocó en una placa Petri estéril.

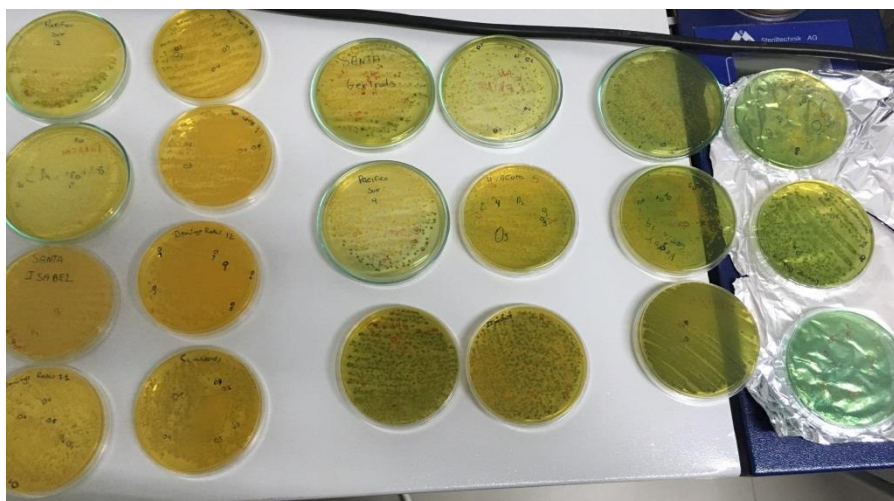
La necropsia y extracción del hepatopáncreas fue realizado según el protocolo realizado por Gómez-Gil *et al.* (2017).

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



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

La siembra se realizó con un hisopo estéril, sumergiéndolo en cada tubo y agitándolo suavemente, para después, extenderlo en forma de estría, por toda la superficie del agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa -TCBS (Liofilchem, Italia), enriquecido al 2 % de Cloruro de Sodio (NaCl). Una vez completada la siembra de los tubos de cada grupo muestral, se procedió a incubarlos a temperatura de 37 °C  $\pm$ 0.9, durante 18 a 24 horas. Luego del tiempo determinado, se observaron las colonias que habían crecido, seleccionándose las representativas de cada forma de aislado (forma, color, tamaño), tomando aislados presuntivos de *Vibrio* spp.



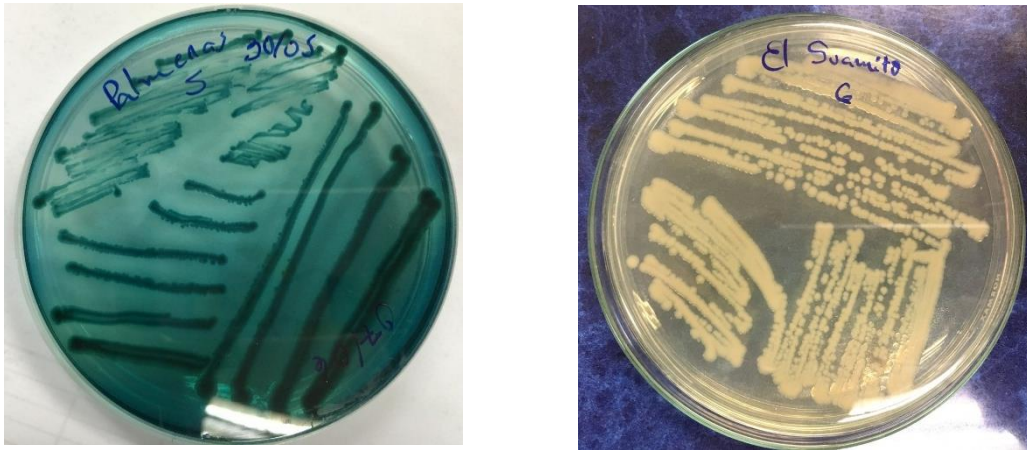
**Figura 3.** Colonias presuntivas de *Vibrio*, en agar TCBS

Los aislados seleccionados fueron resembrados en agar Tripticasa Soja-TSA (Liofilchem, Italia), enriquecido al 2% de NaCl. Luego de la resiembra, se procedió a colocarlos en la incubadora, a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.9$ , durante 12 a 18 horas. Los aislados puros fueron colocados en tubos Eppendorf conteniendo 850  $\mu\text{L}$  de caldo Tripticasa Soja-TSB (Liofilchem, Italia), enriquecido al 2 % de NaCl, incubando a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.9$ , durante 18 horas. Luego, se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de glicerol para su congelamiento y posterior traslado al Laboratorio de Parasitología de FAVEZ, de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

### **6.5.2 Reactivación de Aislados, resiembra y purificación**

Una vez transportados a Lima, los aislados fueron reactivados mediante alícuota en Agua Peptonada Alcalina al 1 % de NaCl, con una escala de pH 8.6, incubándose durante 24 horas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Después de esto, los aislados fueron resembrados en agar TCBS (Liofilchem, Italia), al 2 % de NaCl, durante 18 horas, a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Luego, fueron resembrados en agar no selectivo TSA (Liofilchem, Italia)

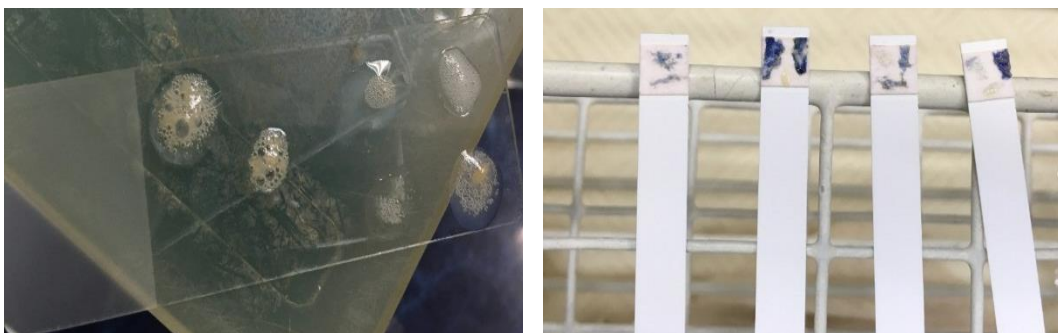
enriquecido al 2 % de NaCl, durante 16 horas, para poder realizar la tinción Gram, así como las pruebas bioquímicas, a fin de reconocer fenotípicamente las especies del género *Vibrio*.



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

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

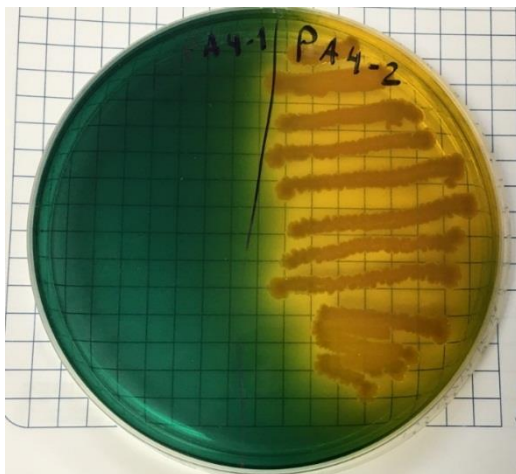
Se realizaron las tinciones Gram para determinar el género *Vibrio* (Gram  $^-$ ).



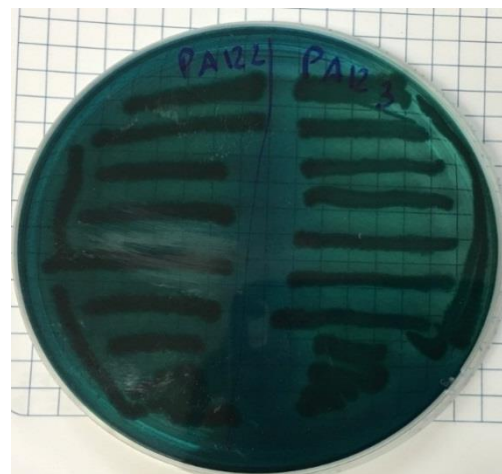
**Figura 5.** Pruebas de Oxidasa y Catalasa. Se observa reacción positiva en ambas, lo cual es indicativo de *Vibrio* spp

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

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



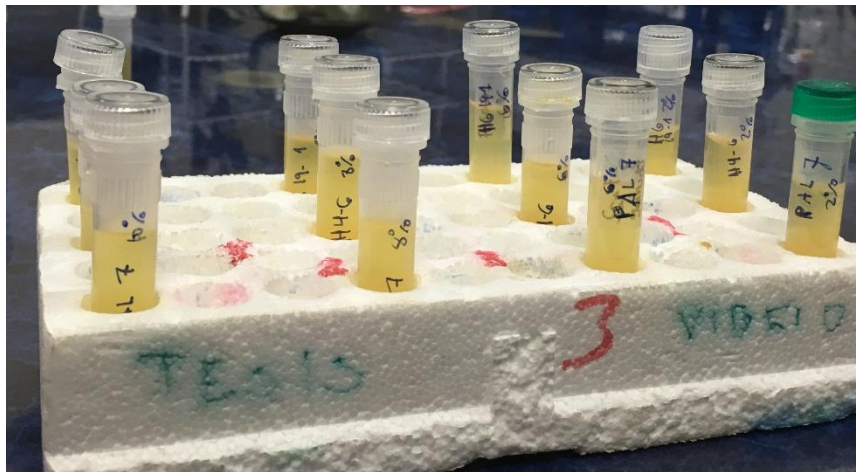
**Figura 6a.** Aislado de *Vibrio* sp. con fermentación de la Sacarosa (Sacarosa<sup>+</sup>), compatible con las especies *V. cholerae*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*.



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

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

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



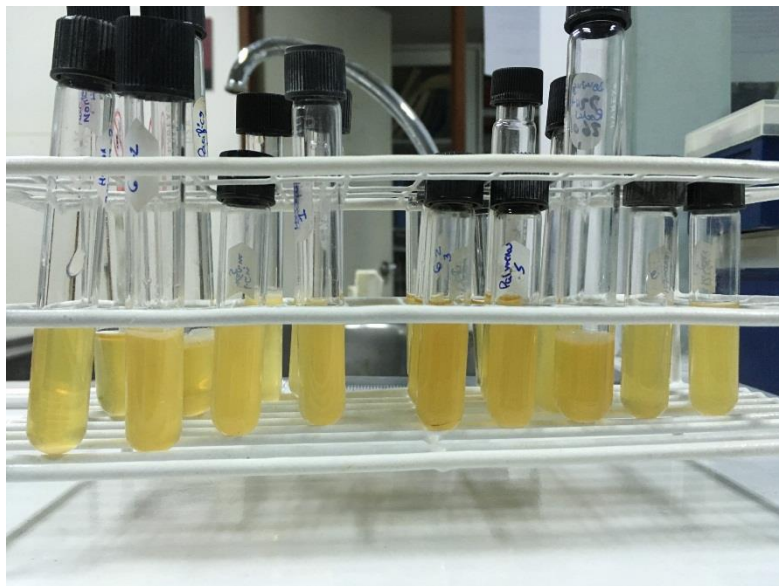
**Figura 7.** Prueba de Halotolerancia, a salinidades 2%, 6%, 8% y 10%.

Luego de las pruebas bioquímicas, reconocidas las cepas positivas al género *Vibrio*, se procedió a realizar la identificación molecular.

## 6.6 Análisis Molecular

### 6.6.1 Extracción de ADN bacteriano

Las cepas identificadas como especies del género *Vibrio* se sembraron en tubos de ensayo conteniendo 3 mL de infusión Cerebro-Corazón-BHI (Liofilchem, Italia), incubándolos durante 18 horas, a 35 °C. Se observó turbidez pasado el tiempo de incubación, y se procedió a conseguir los pellets de cada cepa, mediante centrifuga Spectrafuge 16 min, a 12 000 rpm. Posterior a esto, se conservó cada pellet en congelación para la extracción del DNA.



**Figura 8.** Crecimiento de cepas de *Vibrio* en BHI, para la extracción de DNA.

El DNA microbiano de cada cepa aislada se extrajo con el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **6.6.2 Identificación genotípica de *Vibrio* spp por PCR Múltiple**

La identificación molecular de las cepas reconocidas fenotípicamente como *Vibrio* spp se realizó mediante un PCR Múltiple, según el protocolo estandarizado por Kim *et al.* (2015), utilizando los cebadores detallados en la tabla 1. Los productos de amplificación resultantes del PCR fueron obtenidos en volúmenes finales de 25  $\mu$ L conteniendo: 12.5  $\mu$ L de GoTaq® G2 Green Master Mix, 1  $\mu$ L de cada cebador (10 mM), 3.5  $\mu$ L de agua libre de nucleasa y 1  $\mu$ L de DNA (10 ng/ $\mu$ L). La amplificación fue realizada en el termociclador Eppendorf - Mastercycler (USA), programado de la siguiente manera: 1 ciclo de 95°C (2 min); seguido de 30 ciclos de 95 °C (1 min), 58 °C (30 seg) y 72 °C (1 min), finalizando con 1 ciclo de 72 °C (5 min), y conservando las reacciones de amplificación a 4°C. Los productos finales de PCR fueron llevados y analizados en electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, usando como buffer TAE 1X, y llevando a campo eléctrico mediante voltaje de 80 V/cm durante 90 minutos, usando como marcadores de peso molecular el 100 bp Innustar DNA Ladder y el 1Kb plus Innustar DNA Ladder (Analytik Jena, Alemania). Finalmente, fueron teñidos con bromuro de etidio (0,5 mg/mL), durante 20 minutos y fotografiados en transiluminador de UV DNR Bio-Imaging Systems (USA).

**Tabla 1.** Cebadores del PCR Múltiple para especies del género *Vibrio* usados en este estudio (Kim *et al.*, 2015)

Cebador	Especie	Amplicón	Oligonucleótidos	Proteína del Gen blanco
			5' → 3'	
VP 1155272 F	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	297	AGCTT ATTGG CGGTT TCTGT CGG	Hipotética proteína VPA 1095
VP 1155272 R			CKCAA GACCA AGAAA AGCCG TC	
VV 2055918 F	<i>Vibrio vulnificus</i>	484	CAGCC GGACG TCGTC CATT TG	Hipotética proteína VV 2055
VV 2055918 R			ATGAG TAAGC GTCCG ACGCG T	
VA 1198230 F	<i>Vibrio alginolyticus</i>	199	ACGGC ATTGG AAATT GCGAC TG	Secuencia contig del genoma completo
VA 1198230 R			TACCC GTCTC ACGAG CCCAA G	
VM C727581 F	<i>Vibrio mimicus</i>	249	ATAAA GCGGG CTTGC GTGCA	Contig43, Secuencia del genoma completo
VM C727581 R			GATTT GGRAA AATCC KTCGT GC	

Se usaron como controles positivos las cepas ATCC® 27562™ de *Vibrio vulnificus*, ATCC® 17749™ de *V. mimicus*, ATCC® 17802™ de *V. parahaemolyticus* y ATCC® 33653™ de *V. mimicus* y como control negativo agua libre de nucleasa.

### **6.7 Plan de análisis de datos**

Los resultados obtenidos de los análisis microbiológicos, y bioquímicos (identificación fenotípica), así como del análisis molecular, se ordenaron y fueron almacenados en un libro de Excel y organizados en cuadros.

### **6.8 Consideraciones éticas**

El proyecto fue ejecutado con la aprobación del Comité Institucional de Ética para la Investigación en Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, mediante **Constancia 003-02-19 CEIA**. La eutanasia de langostinos se realizó mediante el método de dos pasos, descritos en las Pautas de AVMA para la Eutanasia en Animales (2013), a fin de producir el mínimo estrés y dolor al animal.

## VII. RESULTADOS

En el aislamiento inicial, se obtuvieron 170 aislados (100 %), procedentes de cada pool de poza muestreada. Lográndose reactivar 72 aislados (42 %), se identificó, mediante bioquímica, que 61 aislados (36%) eran cepas presuntivas del género *Vibrio* (ver cuadro 1).

**Cuadro 1.** Especies patogénicas del género *Vibrio*, identificadas mediante bioquímica en este estudio (n=61).

<b>Halotolerancia</b>	<b>Fermentación Sacarosa</b>	<b>N° de Cepas</b>	<b>%</b>	<b>Especie Identificada</b>
2%	Positivo	9	14.8	<i>V. cholerae</i>
	Negativo	4	6.6	<i>V. mimicus</i>
6%	Positivo	11	18	<i>V. harveyi</i>
	Negativo	9	14.8	<i>V. vulnificus</i>
8%	Positivo	0	-	
	Negativo	12	19.7	<i>V. parahaemolyticus</i>
10%	Positivo	16	26.2	<i>V. alginolyticus</i>
	Negativo	0	-	
<b>TOTAL</b>		<b>61</b>	<b>100</b>	

Del total de cepas reconocidas mediante bioquímica presuntivamente como *Vibrio* spp (n=61), se encontraron 29 cepas positivas (48 %) pertenecientes a las especies *Vibrio mimicus*, *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*, a nivel molecular mediante PCR Múltiple, obteniéndose los resultados que se observan en el cuadro 2:

**Cuadro 2.** Especies patogénicas del género *Vibrio*, identificadas mediante PCR Múltiple

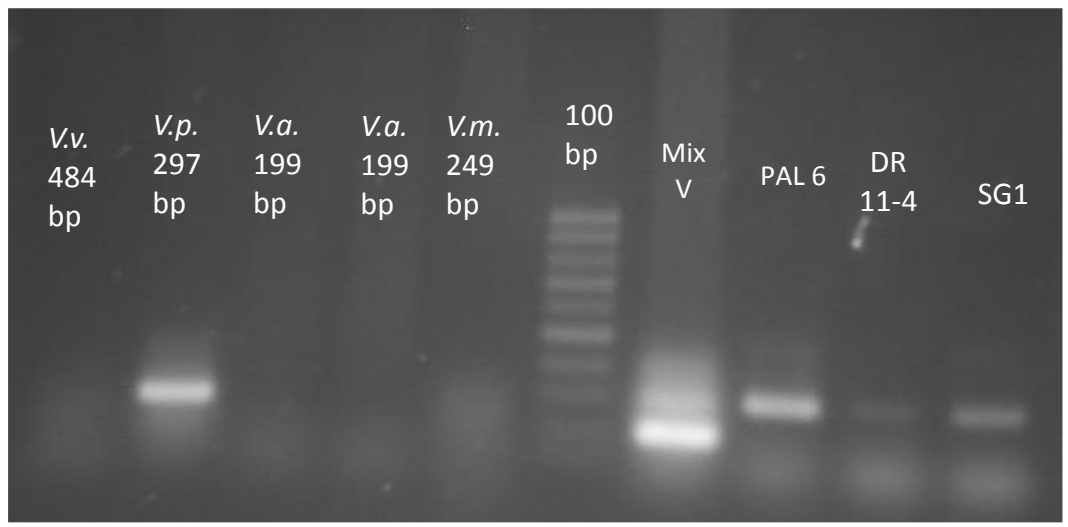
<b>Especie</b>	<b>N° de cepas identificadas</b>	<b>%</b>	<b>Amplicón</b>
<i>Vibrio mimicus</i>	8	27.6	249 bp
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	17	58.6	299 bp
<i>Vibrio alginolyticus</i>	4	13.8	199 bp
<b>TOTAL</b>	<b>29</b>	<b>100</b>	

Del total de cepas presuntivas de *Vibrio* spp (n=61), identificadas mediante bioquímica y molecularmente por PCR Múltiple, distribuidas en tres especies, se resumen los resultados de la investigación en el cuadro 3:

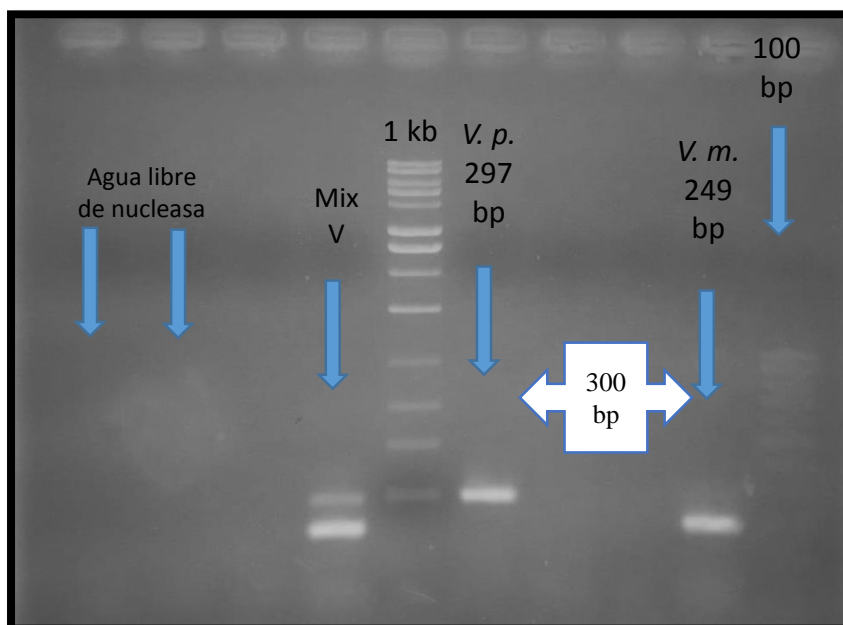
**Cuadro 3.** Identificación fenotípica y molecular de *Vibrio* spp.

Especie	Número de cepas presuntivas por bioquímica	Número de cepas identificadas por PCR
<i>Vibrio mimicus</i>	4	8
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	12	17
<i>Vibrio alginolyticus</i>	16	4
<b>TOTAL</b>	<b>32</b>	<b>29</b>

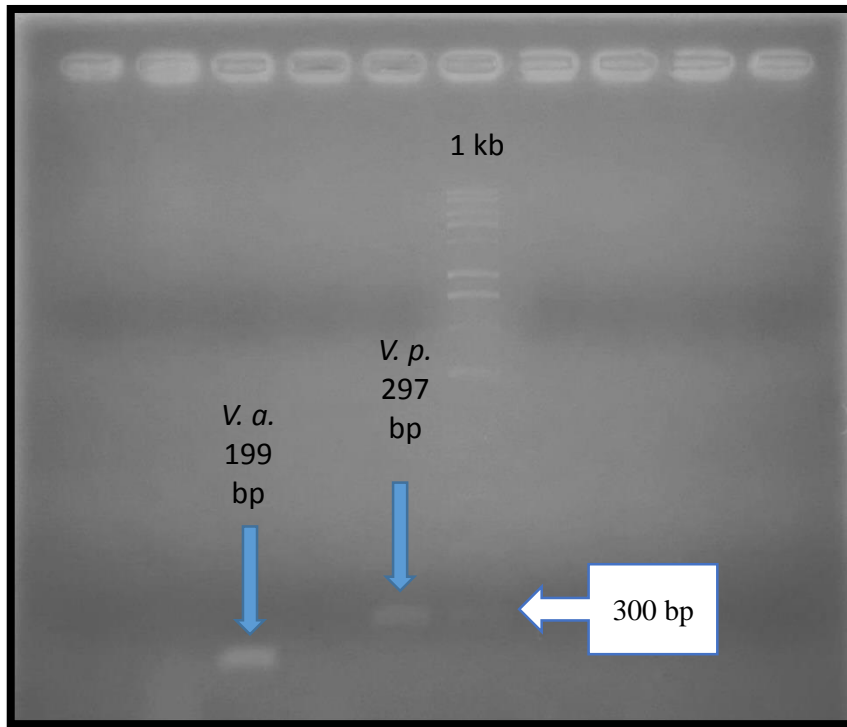
Respecto a las 29 cepas detectadas molecularmente, se observó que 9 cepas concuerdan en la identificación, tanto bioquímica como molecularmente (Anexo 1). Por lo tanto, 20 cepas presentan diferencias en la identificación fenotípica y genotípica (Anexo 2).



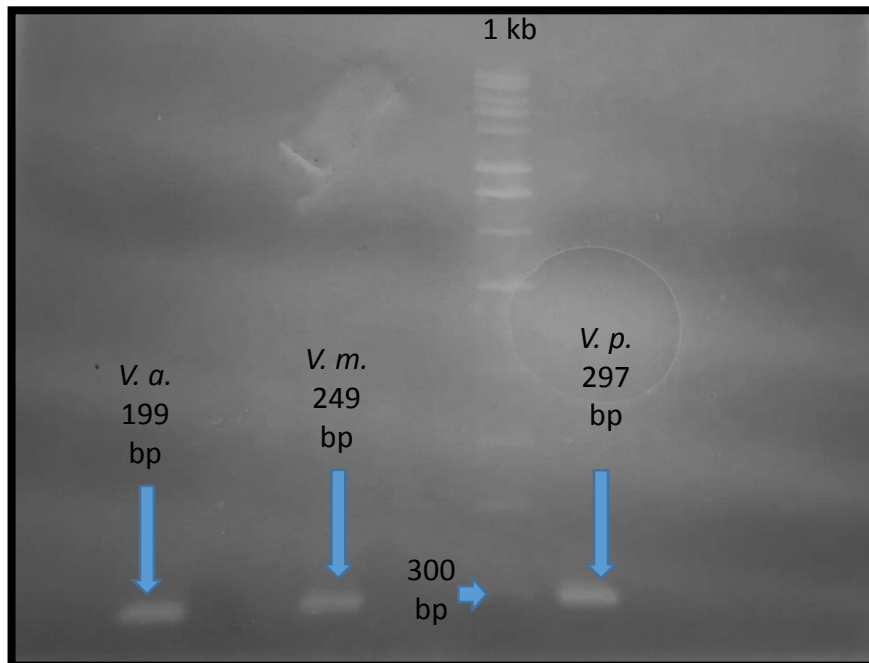
**Figura 9.** PCR Múltiple para cepas control. *V. v.*: *Vibrio vulnificus*, *V. p.*: *V. parahaemolyticus*, *V. a.*: *V. alginolyticus*, *V. m.*: *V. mimicus*, Mix V: mix de controles. PAL 6, DR 11-4, SG 1: cepas presuntivas de *Vibrio* sp. 100 bp: marcador de peso molecular



**Figura 10.** PCR Múltiple para cepas control. *V. p.*: *V. parahaemolyticus*, *V. m.*: *V. mimicus*, Mix V: mix de controles, agua libre de nucleasa: controles negativos, 100 bp - 1 kb: marcadores de peso molecular



**Figura 11.** PCR Múltiple para cepas control. *V. p.*: *V. parahaemolyticus*, *V. a.*: *V. alginolyticus*, 1 kb: marcador de peso molecular



**Figura 12.** PCR Múltiple para cepas presuntivas de *Vibrio* sp.

## VIII. DISCUSIÓN

El tiempo de incubación para la reactivación de las cepas, estipulado por **Silva et al. (2010)**, donde se recomienda realizar la incubación entre 6 a 8 horas, no parece favorecer a estas, por lo tanto, se optó incubar hasta por 24 horas los aislados, obteniéndose la reactivación de las cepas usadas en este estudio.

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

Los resultados que identifican mayor presencia de cepas fermentadoras de sacarosa (y luminiscentes), concuerda con lo manifestado por **Sunaryanto y Mariam (1986)**, quienes enfatizan que la mayor presencia de estas especies se da en épocas o estaciones de lluvias. Como el muestreo del presente estudio se realizó en el verano, usual época de lluvias en la región Tumbes, se justifican los resultados obtenidos por la prueba bioquímica de halotolerancia que identificó una mayor presencia de cepas con este fenotipo: *V. cholerae*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus*.

Para la identificación molecular, se propuso detectar las siguientes especies: *Vibrio mimicus*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*, debido a que son especies que se presentan en aguas marinas y presuntivamente en acuicultura langostinera (aguas salobres). No se identificó la especie *Vibrio cholerae*, debido a que esta ya ha sido descrita anteriormente, y es más frecuente su aislamiento y detección en aguas continentales (ya sean tratadas o servidas), y una mínima proporción en aguas marinas (**Robert-Pillot et al., 2014**). Además, *V. cholerae* no tiene importancia en producción langostinera, ya que no produce patologías en el langostino blanco, por lo tanto, no afecta la producción de este recurso acuícola (**Robert-Pillot et al., 2014**).

Según el estudio realizado por **Dulanto (2013)**, en el cual se identificó por el método ARDRA *Vibrio parahaemolyticus*, entre otras especies del género *Vibrio* (*V. communis* y *V. harveyi*, relacionadas al *Vibrio core group*), a partir de langostino blanco criado en la región Tumbes, se demostró la ventaja de ser de fácil aplicación, rápido y económico, radicando su desventaja en que es necesario realizar el secuenciamiento para concluir la identificación. Comparando ARDRA con el método usado en el presente estudio, se logró identificar también *Vibrio parahaemolyticus* aislado de langostino blanco de la misma procedencia, siendo también un método rápido y fiable.

El PCR Múltiple usado en el estudio, es además un método molecular de fácil aplicación y, en concordancia con **Caipang y Aguana (2011)**, considerado como

método de detección primordial de agentes etiológicos, ya que, en otros estudios, se tiene como detección molecular primaria identificar género o especie mediante gen ARN 16s o uso de cebadores universales, para luego realizar la identificación de la especie blanco mediante el uso de cebadores específicos.

Mediante un PCR Múltiple, se identificó, a partir de muestras marinas (ostras, pulpos, conchas anadaras y agua de mar) especies del género *Vibrio*, siendo *Vibrio parahaemolyticus* la especie más prevalente de este género bacteriano (Kim *et al.*, 2007; Tebbs *et al.*, 2011). De acuerdo con la detección molecular de este estudio, *Vibrio parahaemolyticus* es la especie con más cepas identificadas, aisladas de langostino blanco, por lo que se confirma que también, es una de las especies del género *Vibrio* más prevalente en la acuicultura langostinera.

Las bacterias del género *Vibrio* son frecuentemente asociadas con patologías en especies acuícolas y marinas, así como agentes etiológicos de infecciones médicas de diversa índole, sobre todo de enfermedades de transmisión alimentaria. En ambos casos, la vibriosis se manifiesta por signos clínicos agudos y elevada mortalidad. Las especies más frecuentes y que producen patologías tanto en recursos hidrobiológicos (marinos y continentales), así como en el humano son las siguientes: *Vibrio mimicus*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*, reportado por Kim *et al.* (2015), usando PCR Múltiple, a partir de aislados de agua del mar de diferentes localidades de Corea del Sur. En el Perú, la única especie estudiada y descrita como agente etiológico de Vibriosis en Langostinos y

en Humanos es *Vibrio parahaemolyticus* (Gavilán y Martínez-Urtaza, 2011; Gil *et al.*, 2007), identificando también *Vibrio cholerae* como otra especie causante de ETA, pero sin ocasionar patologías en el langostino blanco. En concordancia a lo señalado, las especies patogénicas del género *Vibrio* son conocidos como agentes etiológicos en enfermedades intestinales y extraintestinales, por citar algunos; otitis y conjuntivitis, infecciones cutáneas localizadas, como la celulitis, e invasivas, como la fascéctis necrotizante, y septicemias (Silva *et al.*, 2008).

En el estudio, se usó el protocolo de PCR Múltiple señalado, detectando mayormente *Vibrio parahaemolyticus*, *V. mimicus* y *V. alginolyticus* (en ese orden), y no *V. vulnificus*, a partir de langostino blanco, por lo que se sugiere que esta técnica molecular, puede aplicarse a otros recursos hidrobiológicos, tantos marinos como continentales, que pueden sufrir infecciones por bacterias del género *Vibrio*.

El PCR Múltiple no detectó la presencia de *Vibrio vulnificus*, lo cual puede deberse a que la temperatura de alineamiento del cebador no es la indicada para esta especie, a diferencias en la secuencia (mutaciones) o por inserciones/delecciones no reportadas, o a que el gen blanco, una proteína hipotética, no sea muy prevalente en esta especie.

Mediante el análisis de las características bioquímicas identificamos en total 61 aislados, presuntivos de ser especies del género *Vibrio*, mientras que por la técnica molecular apenas 29 aislados fueron confirmados a ese nivel. Esta diferencia entre los resultados de la identificación bioquímica respecto a la detección molecular concuerda con los obtenidos por **Bauer et al. (2018)**, quienes realizaron identificación bioquímica, mediante el sistema API20E, luego molecular, mediante PCR y secuenciamiento de los genes 16S y *pyrH*, y finalmente por MALDI-TOFF, indicando que la identificación fenotípica (bioquímica) es útil para clasificar a nivel de género, y sólo de forma presuntiva especie. Esto, explican ellos se debe a la gran variabilidad de los miembros del género *Vibrio* en los tests microbiológicos clásicos.

Con base en lo anterior, para estudios de un número grande de aislados y donde no se cuente con equipamiento sofisticado, se puede recomendar la identificación bioquímica para identificar fácilmente hasta *Vibrio* sp (**Vilcapoma et al., 2014; Bauer et al., 2018**), mientras que para análisis de riesgos y epidemiológicos, así como detección de especies patógenas, se hace necesario un método molecular.

Se encontró una marcada diferencia de los resultados de la identificación fenotípica versus la detección molecular, esto ocurre ya que las especies del género comparten características bioquímicas variables que pueden dar falsos positivos, por lo que se requiere una confirmación por técnicas moleculares.

El PCR Múltiple usado en el estudio, es un método eficaz de detección de especies patogénicas, tanto en el langostino blanco, como de especies del género *Vibrio* de importancia en salud pública. Asimismo, es una herramienta molecular fiable no sólo para la identificación de una especie, sino de otras especies en simultáneo, siendo esta su principal ventaja.

En concordancia con lo expuesto anteriormente, las principales actividades acuícolas y recursos hidrobiológicos de exportación son el langostino blanco (**Comex Perú, 2018<sup>a</sup>**) y la concha de abanico (**Comex Perú, 2018<sup>b</sup>**), recursos que se producen en agua salobre y agua marina, respectivamente. Se sabe que *Vibrio* spp. pertenece a la microbiota común de estas dos especies (**Urakawa y Rivera, 2006**), por lo que en situaciones de inmunodeficiencia o cuando la población bacteriana crece, en épocas de cambio climático o anomalías naturales (como el Fenómeno del Niño) (**Austin y Zhang, 2006; Haldar et al., 2010**), pueden producirse infecciones en humanos por contacto con agua contaminada, o consumo de estos recursos acuícolas contaminados y/o con alta proporción de especies del género *Vibrio*, produciéndose enfermedades de transmisión alimentaria, como lo describe **Buller (2014)**. Es por esto, que el uso de la herramienta molecular en el estudio, puede ser usado en pro de la salud pública, para el diagnóstico de especies patogénicas, así como en seguir identificando las especies en otros recursos hidrobiológicos, para elaborar un mapa epidemiológico, estudio de poblaciones bacterianas, inocuidad de recursos pesqueros y acuícolas, además de reconocer que especie o especies, son las que están causando la enfermedad en determinados brotes epidemiológicos, tanto en langostinos, como

en humanos, a sabiendas que ya se han reconocido tres especies en la acuicultura langostinera: *Vibrio parahaemolyticus*, *V. mimicus* y *V. alginolyticus*.

En nuestro país, se ha descrito con anterioridad que *Vibrio parahaemolyticus* es la especie del género *Vibrio* que más se conoce como agente etiológico en infecciones de humanos y langostinos. Acerca de las otras dos especies, *V. mimicus* y *V. alginolyticus*, se tiene poca certeza de su potencial zoonótico, debido a la poca capacidad diagnóstica sobre estas especies. A partir de este estudio, se espera que estas dos especies, sean incluidas como agentes etiológicos, en concordancia con lo documentado por **Guardiola et al. (2015)**, así como facilitar su diagnóstico mediante el PCR Múltiple usado en la investigación.

La vibriosis puede causar elevadas mortalidades en la población de langostinos (**Chandralaka y Priya, 2017; Bauer et al., 2018**), produciendo una baja cosecha al término del ciclo de producción. Respecto a las especies, se conoce que *V. alginolyticus* es patogénica en el langostino blanco, como señala **Liu et al. (2004)**, además de la ya mencionada *V. parahaemolyticus*, detectadas junto a otras especies de *Vibrio* que causan altas mortalidades, en muchas incidencias (**Chen et al., 2000; Chandralaka y Priya, 2017**). Llevando estas premisas a la realidad langostinera del Perú, no se tiene un detalle exacto de las poblaciones de *Vibrio* en la producción del recurso langostino, por lo que la detección de tres especies patogénicas realizadas en el estudio permite conocer, de forma primaria, las especies de este género bacteriano que están presentes en el sector langostinero, y

que pueden causar patologías, llevando a una mortalidad masiva, y baja en la producción.

Asimismo, últimamente ha aparecido una enfermedad que produce mortalidades de hasta 100% en producciones langostineras, la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND), la cual es producida por las toxinas *Pir<sup>A</sup>* y *Pir<sup>B</sup>*, presentes en el *Vibrio parahaemolyticus*, y notificable ante la OIE (**Han et al., 2015**). Sin embargo, se ha demostrado últimamente que las toxinas pueden estar en otras especies del género *Vibrio*, como lo enunciado por **Dong et al. (2017)**, **Han et al (2017)** y **Dong et al. (2019)**. Para el diagnóstico de la enfermedad se realiza, primero, en detectar las toxinas, para después realizar la identificación de género y luego especie. Debido a esto, el PCR Múltiple puede apoyar en la detección, a fin de reconocer la especie que presenta las toxinas productoras de la enfermedad.

Desde el punto de vista productivo, la detección temprana de Vibriosis, o de alguna especie que pueda ocasionar un problema enzoótico o epizótico, mediante el uso del PCR Múltiple, puede ayudar a prevenir un masivas pérdidas económicas en la producción de langostinos, evitando a tiempo una baja en la producción, alta mortalidad, o cierre parcial del mercado, y posterior exportación del recurso langostino, por no controlar a tiempo la diseminación de la AHPND, debido a dictamen de la OIE. Asimismo, resulta un método fiable, de fácil aplicación, reduciendo tiempo de espera, y de costos, además de ser aplicable a grandes poblaciones.

## IX. CONCLUSIONES

1. El hepatopáncreas de los langostinos contiene diversas especies de *Vibrio* con potencial patogénico para esta especie acuícola, como se pudo aislar e identificar de forma bioquímica y molecular.
2. Algunas de las especies de *Vibrio* identificadas son patógenos de importancia para la salud pública, por ser agentes causadores de enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), principalmente.
3. El PCR Múltiple puede ser usado para la detección de especies del género *Vibrio*, permitiendo identificar *Vibrio parahaemolyticus*, *V. mimicus* y *V. alginolyticus*, en langostino blanco, como también en otros recursos hidrobiológicos.
4. Mediante metodología molecular, *Vibrio parahaemolyticus* es la especie más frecuentemente identificada. Asimismo, por PCR Múltiple se identificaron más aislados de *V. mimicus* y *V. parahaemolyticus* que las pruebas bioquímicas.
5. La técnica molecular permite detectar, en un corto periodo de tiempo, especies patogénicas, reduciendo además costos, presentando facilidades para el operario, productor y autoridades competentes.

## X. RECOMENDACIONES

1. Se debe determinar la presencia, a través de pruebas fenotípicas y genotípicas, de otras especies bacterianas patogénicas que pueden afectar el recurso langostino, como *Proteus* sp., *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter* sp.
2. Se recomienda estudiar los serotipos y factores de virulencia de las especies de *Vibrio* detectadas en esta investigación, a fin de conocer su potencial patogénico, a través de trazadores de toxigenia.
3. El PCR Múltiple usado en el estudio puede aplicarse para la detección de especies patogénicas del género *Vibrio*, a partir de la extracción de DNA directamente de los tejidos.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Veterinary Medical Association. (2013). The AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals. Illinois: AVMA. p 74.
2. Austin, B., Zhang, X.-H. (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. Lett Appl Microbiol 43: 119-214.
3. Baticados, M., Lavilla-Pitogo, C., Cruz-Lacierda, E., De la Pena, L. (1990). Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *Vibrio splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. Dis Aquat Org 9:133-139.
4. Bauer, J., Teitge, F., Neffe, L., Adamek, M., Jung, A., Pepler, C., Steinhagen, D., Jung-Schroers, V. (2018). Recommendations for identifying pathogenic *Vibrio* spp. as part of disease surveillance programmes in recirculating aquaculture systems for Pacific white shrimps (*Litopenaeus vannamei*). J Fish Dis. 41(12):1877-1897.
5. Biju, V., Gunalan, B. (2016). Prevalence of *Vibrio* infection in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* farms. IJSIT 5 (6): 485-493.
6. Buller, N. (2014). Bacteria and Fungi from fish and other aquatic animals: A practical identification manual. Cabi: Oxfordshire/Boston, MA.

7. Caipang, C., Aguana, M. (2011). Conventional PCR assays for the detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shrimp aquaculture in the Philippines. *Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation. Int Jour of the Bioflux Society* 4(3): 339-350.
8. Chandrakala, N., Priya, S. (2017). Vibriosis in Shrimp Aquaculture. *Int Jour of Scient Research in Science, Eng and Tech* 2(2): 27-33.
9. Chen, F., Liu, P., Lee, K. (2000). Lethal attribute strains in kuruma prawn *Penaeus japonicas*. *Zool natureforsch* 55: 94-99.
10. Comex Perú (9 de Febrero del 2018): Exportaciones de langostinos peruanos alcanzan récord. *Diario Gestión*. Disponible en: <https://gestion.pe/economia/comexperu-exportaciones-langostinos-peruanos-alcanzan-record-226989>
11. Comex Perú (15 de Junio del 2018). Un repaso a la acuicultura nacional. *Diario Gestión*. Disponible en: <https://www.comexperu.org.pe/articulo/un-repaso-a-la-acuicultura-nacional>
12. Cuéllar-Anjel, J. (2008). Métodos de Diagnóstico de Enfermedades en Camarones Marinos de Cultivo. En: Morales V, Cuéllar-Anjel J. *Guía Técnica de Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos*. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei; p. 1-19.

13. Cuéllar-Anjel, J. (2013). *Vibriosis en Langostinos*. The Center for Food Security and Public Health, Iowa State University, United States.
14. Dong, X., Wang, H., Xie, G., Zou, P., Guo, C., Liang, Y., Huang, J. (2017). An isolate of *Vibrio campbellii* carrying the PirVp gene causes Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. *Emerging microbes & infections*, 6(1), e2.
15. Dong, X., Chen, J., Song, J., Wang, H., Wang, W., Ren, Y., Guo, C., Wang, X., Tang, K. & Huang, J. (2019). Evidence of the horizontal transfer of pVA1-type plasmid from AHPND-causing *V. campbellii* to non-AHPND *V. owensii*. *Aquaculture* 503: 396-402.
16. Dulanto, J. R. (2013). Identificación rápida de especies del género *Vibrio* asociados con el cultivo de "langostino blanco" *Litopenaeus vannamei* por amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). Tesis para Título Profesional de Biólogo con mención en Hidrobiología y Pesquería. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 109 p.
17. FAO. (2006). Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*. Programa de información de especies acuáticas. Texto de Briggs, M. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 7 April 2006.

18. FAO. (2009). *Penaeus vannamei*. In Cultured aquatic species fact sheets. Text by Briggs M. Edited and compiled by Valerio Crespi and Michael New. CD-ROM (multilingual)
19. Feijó, R. G. (2009). Prospecção de genes relacionados à ocorrência de enfermidades no camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) sob condições de cultivo. Título de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais, Universidade de Federal Do Ceará. Área de concentração Ciências Biológicas, Fortaleza, Brasil.
20. Franco-Monsreal, J., Zarza-García, A., Villa-Ruano, N., Ramón-Canul, L., Galván-Valencia, O., Meza, M., Mota, L. (2010). Especies patógenas del género *Vibrio* en alimentos marinos de establecimientos de Isla del Carmen, Campeche, México. *Ciencia y Mar* 40:31-44.
21. Garrity, G., Brenner, D., Krieg, N., Stanley, J. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology* vol. 2. 2<sup>nd</sup> ed. The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. New York: Springer. p 491-555.
22. Gavilán, R., 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(1): 109-115.

23. Gil, A., Lanata, C., Miranda, H., Prada, A., Seas, C., Hall, E., Meza, R., Barreno, C., Maúrtua, D., Nair, B. (2007). Gravedad de la Gastroenteritis causada por *Vibrio parahaemolyticus* del grupo pandémico en el Perú. Rev Perú Med Exp Salud Pública 24 (4): 350-355.
24. Gómez-Gil, B., Tron-Mayen, L., Roque, A., Turnbull, JF., Inglis, V., Guerra-Flores, A. (1998). Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. Aquaculture 163:1-9.
25. Gómez-Gil, B., Roque, A., Soto-Rodríguez, S. (2017). Vibriosis en Camarones y su Diagnóstico (Vibriosis in Shrimp and its Diagnosis). p 14.
26. Guardiola, I., Noriega, L., Gómez-Gil, B., Acedo, E. (2015). Factores de Virulencia de *Vibrio mimicus*. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud 2: 38-49.
27. Haldar, S., Neogi, S., Kogure, K., Chatterjee, S., Chowdhury, N., Hinenoya, A., Asakura, M., Yamasaki, S. (2010). Development of a haemolysin gene-based multiplex PCR for simultaneous detection of *Vibrio campbellii*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. Lett Appl Microbiol 50: 146-152.

28. Hameed, A., Rao, P., Farmer, J., Brenner, F., Fanning, G. (1996). Characteristics and pathogenicity of a *Vibrio campbellii* like bacterium affecting hatchery reared *Penaeus indicus* larvae. *Aquacult Res* 27:853-863.
29. Han JE, Tang KF, Tran LH, Lightner DV. (2015). Photorhabdus insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) of shrimp. *Dis Aquat Organ* 113: 33–40.
30. Han, J. E., Tang, K. F. J., Aranguren, L. F., & Piamsomboon, P. (2017). Characterization and pathogenicity of Acute Hepatopancreatic Necrosis disease natural mutants, PirABVp (-) *V. parahaemolyticus*, and PirABVp (+) *V. campbellii* strains. *Aquaculture* 470: 84-90.
31. Jeyasanta, K., Lilly, T., Patterson J. (2017). Prevalence of *Vibrio* species in the cultured shrimp and their antibiotic resistant. *AJAST I* 8:100-11.
32. Kaysner, C., DePaola, A. (2004). *Bacteriological Analytical Manual*, Chapter 9: *Vibrio*. Laboratory Methods, FDA.
33. Kim, M. N., Bang, H. J. (2007). Detection of marine pathogenic bacterial *Vibrio* species by multiplex polymerase chain reaction (PCR). Department

of Biology, Sang Myung University, Seoul, Korea. *Journal of Environmental Biology* 543-546.

34. Kim, H.-J., Ryu, J.-O., Lee, S.-Y., Kim, E.-S., Kim, H.-Y. (2015). Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics. *BioMed Central* 15:239
35. Lavilla-Pitogo, C., Baticados, M., Cruz-Lacierda., Pena, L. (1990). Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Phillipines. *Aquaculture* 91:1-13.
36. Lightner, D., McVey, J. (1993). Diseases of cultured penaeid shrimp. *CRC Handbook of Mariculture, Crustacean Aquaculture*. 2nd Ed. Florida: CRC Press. p. 393-486.
37. Lightner, D. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology* 106, 110-130.
38. Liu H, Li Z, Tan B, Lao Y, Duan Z, Sun W, Dong X. (2014). Isolation of a putative probiotic strain S12 and its effect on growth performance, non-specific immunity and disease-resistance of White shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 41: 300-307.

39. Ministerio de la Producción. (2016). Principales Especies Acuícolas cultivadas en el Perú. Dirección General de Acuicultura, Despacho Viceministerial de Pesquería, Ministerio de la Producción. Lima: PRODUCE.
40. Morales, V., Cuéllar-Anjel, J. (2014). Guía Técnica de Patología e Inmunología de Camarones. OIRSA, Panamá, República de Panamá. 382 pp.
41. Pang, L., Zhang, X.-H., Zhong, Y., Chen, J., Li, Y., Austin, B. (2006). Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene. Lett Appl Microbiol 43: 249-255.
42. Prayitno, S., Latchford J. (1995). Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio* - effect of salinity and pH on infectiosity. Aquaculture 132:105-112.
43. [PRODUCE] Ministerio de la Producción. (2015). Catastro Acuícola Nacional. Dirección General de Acuicultura.
44. Robert-Pillot, A., Copin, S., Himber, C., Gay, M., & Quilici, M. L. (2014). Occurrence of the three major *Vibrio* species pathogenic for human in seafood products consumed in France using real-time PCR. International Journal of Food Microbiology, 189 (2014), 75-81.

45. Rodríguez-Camacho, J.C., Méndez, E., Rivas, A.M., Cortés-, J.A. (2014). Evaluación de la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) silvestre estuarino en el sur de Sinaloa y norte de Nayarit, mediante análisis microbiológico y PCR. Revista BioCiencias, 2, 282-292.
46. [SANIPES] Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. (2018). Programa de Vigilancia Sanitaria – Capítulo Crustáceos. Lima: SANIPES. . Informe Técnico N° 010-2018 – SANIPES/DSNPA.
47. Silva, W., Olea, A., Cachicas, V., Fernández, J., Ibáñez, D., Hormazábal, J., García, J., Maldonado, A. (2008). Manual de Procedimientos de Aislamiento, Identificación y Caracterización de *Vibrio parahaemolyticus*. Santiago de Chile: Ministerio de Salud – Instituto de Salud Pública.
48. Soto-Rodríguez, S., Simoes, N., Roque, A., Gómez-Gil, B. (2006). Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. Aquaculture 258:109-115.
49. Sunaryanto, A., Mariam, A. (1986). Occurrence of pathogenic bacteria causing luminescence in penaeid larvae in Indonesian hatcheries. Bull Brackishwater Aquacul Develop Centre 8:64-70.

50. Tebbs, R., Brzoska, P., Furtado, M., Petrauskene, O. (2011). Design and Validation of a Novel Multiplex Real-Time PCR Assay for *Vibrio* Pathogen Detection. *Journal of Food Protection*, 74: 939-948.
51. Thompson, F., Iida, T., Swings, J. (2004). Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68(3): 403-431.
52. Urakawa, H., Rivera, I. (2006). The biology of Vibrios Aquatic Enviroment. Washington D. C.: ASM Prees.
53. Vilcapoma, A., Flores, A., León, J., & Alvarado, D. (2014). Determinación de la frecuencia de *Vibrio parahaemolyticus* y otros vibriones halofílicos en alimentos preparados con productos marinos frescos y procesados. *Revista Peruana De Biología*, 4(1-2), 17 - 20.
54. Zhou, J., Fang, W., Yang, X., Zhou, S., Hu, L., Li, X., Xie, L. (2012). A nonluminescent and highly virulent *Vibrio harveyi* strain is associated with “bacterial white tail disease” of *Litopenaeus vannamei* shrimp. *PLoS One*, e29961.

## XII. ANEXOS

### Anexo 1

**Cuadro 4:** Concordancia entre la identificación presuntiva y detección molecular de 9 cepas reconocidas como especies del género *Vibrio*

Cepa	Especie presuntiva mediante identificación bioquímica	Especie detectada molecularmente por PCR Múltiple
ELZ 4		<i>V. parahaemolyticus</i>
HG 1-2		<i>V. mimicus</i>
HG 19-1		<i>V. parahaemolyticus</i>
H 4-4		<i>V. alginolyticus</i>
PA 4-1		<i>V. alginolyticus</i>
PA 12-1		<i>V. parahaemolyticus</i>
PAL 1		<i>V. parahaemolyticus</i>
PAL 2		<i>V. parahaemolyticus</i>
PAL 8		<i>V. parahaemolyticus</i>

## Anexo 2

**Cuadro 5:** Diferencia entre la identificación presuntiva y detección molecular de 20 cepas reconocidas como especies del género *Vibrio*

Cepa	Especie presuntiva mediante identificación bioquímica	Especie detectada molecularmente por PCR Múltiple
Cc 5	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
DR 5-4	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. mimicus</i>
DR 11-4	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
DR 12-3	<i>V. harveyi</i>	<i>V. mimicus</i>
DR 12-6	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. mimicus</i>
G 2-2	<i>V. cholerae</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
G 2-3	<i>V. cholerae</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
G 3-13	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
G 3-14	<i>V. harveyi</i>	<i>V. mimicus</i>
HG 19-3	<i>V. harveyi</i>	<i>V. alginolyticus</i>
H 5-2	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. mimicus</i>
LK 5	<i>V. harveyi</i>	<i>V. alginolyticus</i>
PA 4-6	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
PA 12-2	<i>V. cholerae</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
PAL 5	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
PAL 6	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulnificus</i>
PAL 12	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
SG 1	<i>V. cholerae</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
SG 3	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. mimicus</i>
U 11	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. mimicus</i>