

VIBRIOS POTENCIALMENTE PATÓGENOS EN CAMARÓN DE COMERCIO MINORISTA EN MERCADOS DEL CANTÓN MANTA, MANABÍ. ECUADOR

POTENTIALLY PATHOGENIC VIBRIOS IN RETAIL TRADE SHRIMP MARKETS OF MANTA MUNICIPALITY, MANABÍ. ECUADOR

Dariel Intriago-Bermúdez ^{1,2*} , Dennys Zambrano-Velásquez ³ , Luber Quijije-López ⁴ 
José Javier Alió ⁵ 

¹ Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Postgrado en Agroindustria, Dirección de postgrado y educación continua, Calceta, Ecuador.

² La Fabril S.A. Ubicación: Montecristi, Km 5 ½ vía Manta, Manabí – Ecuador

³ Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Calceta, Ecuador.

⁴ Facultad de Ciencias de la Vida y Tecnologías, Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Manta, Ecuador.

⁵ Departamento de Procesos Químicos, Alimentos y Biotecnología. Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador.

* Autor correspondencia: luber.quijije@uleam.edu.ec

Resumen

Las enfermedades transmitidas por alimentos se observan diariamente en el mundo y las bacterias del género *Vibrio* son una de las principales causas asociadas al problema en alimentos de origen marino. El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de bacterias potencialmente patógenas del género *Vibrio* en camarones vendidos al por menor en mercados del municipio de Manta, Manabí, Ecuador, y el cumplimiento de dichos mercados a la norma Ecuatoriana INEN 2687:2013 Mercados Saludables. Paralelo, los mercados Central de Manta, Playita Mia y Parroquial Eloy Alfaro se caracterizaron utilizando listas de verificación. La detección de vibrios potencialmente patógenos, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* se realizó mediante pruebas microbiológicas de PCR cuantitativa en tiempo real, método AOAC RI 050902. La calidad sanitaria general de los mercados (48.8%) se encontró por debajo del mínimo esperado (70.0%) y se reflejó en diferencias significativas ($P < 0.05$) en el nivel de cumplimiento de la norma mencionada. *Vibrio cholerae* registró la prevalencia media más alta (69.7%), seguida de *V. parahaemolyticus* (49.2%), mientras que *V. vulnificus* mostró una baja prevalencia (6.7%). La prevalencia de las tres especies de *Vibrio* evaluadas no difirió significativamente entre mercados ($P > 0.05$), ni reportó correlación significativa con la calidad sanitaria de los mercados. Se concluye que hay una alta prevalencia de *Vibrio* spp. en muestras de camarón marino de los tres mercados minoristas de mariscos en Manta, y las autoridades deben advertir al público sobre la necesidad de consumir camarones cocidos, no crudos o solamente salteados con limón.

Palabras claves: qPCR, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, ceviche.

Abstract

Foodborne diseases are observed daily worldwide, and bacteria of the genus *Vibrio* are a major cause of this problem in food of marine origin. The objective of this study was to determine the prevalence of potentially pathogenic bacteria of the genus *Vibrio* in retail shrimp markets of Manta Municipality, Manabí, Ecuador, and their fulfillment to Ecuadorian norm INEN 2687: 2013 Healthy Markets. For this purpose, Manta's Central Market, Playita Mia, and Eloy Alfaro Street Market were characterized by using checklists. Detection of potentially pathogenic vibrios, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus* was performed by microbiological tests of quantitative PCR in real time, method AOAC RI 050902. Overall sanitary quality of all markets (48.8%) was found below the expected minimum (70.0%) and was reflected in significant differences ($P < 0.05$) in the level of compliance with the standard referred to. Among the three *Vibrio* species detected, *V. cholerae* showed the highest average prevalence (69.7%), followed by *V. parahaemolyticus* (49.2%), while *V. vulnificus* showed a low prevalence (6.7%). The prevalence of the three *Vibrio* species evaluated did not differ significantly among markets ($P > 0.05$), and did not show a significant correlation with market sanitary quality. It is concluded that there was a high prevalence of *Vibrio* spp. in shrimp samples from the three retail seafood markets in Manta municipality, and authorities should warn people about the need to consume cooked shrimp, not raw or just lemon sautéed shrimp.

Keywords: qPCR, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, ceviche.

Recibido: 2024-07-07 Aceptado: 2024-10-14 Publicado: 2024-11-27

1. Introducción

Los brotes de enfermedades transmitidas por consumo de alimentos (ETA) se observan a diario en todo el mundo (Fleckenstein et al., 2010). En la mayoría de los casos las enfermedades intestinales agudas son causadas por patógenos en alimentos (Cremonesi et al., 2014; Havelaar et al., 2015). Según Powell (1999), los vibrios son una causa importante de afecciones transmitidas por alimentos de origen marino, como residente natural del medio ambiente acuático salino, representando una amenaza continua para la seguridad alimentaria de los consumidores.

Entre las bacterias del género *Vibrio*, las especies *V. cholerae* (Pacini, 1854); *V. vulnificus* (Reichelt, Baumann & Baumann, 1979) y *V. parahaemolyticus* (Fujino et al. 1951) son los patógenos más importantes y de estimación de riesgo microbiológico (Daniels & Shafaie, 2000; Tantillo et al., 2004; Hernández et al., 2023). *Vibrio parahaemolyticus* y *V. vulnificus* han sido identificados como causantes de gastroenteritis aguda caracterizada por diarrea, cefalea, vómitos, náuseas, calambres abdominales y hasta septicemia primaria, siendo esta última potencialmente mortal (Powell, 1999; Su & Liu, 2007; Jones & Oliver, 2009; Oliver et al., 2013; Raszl et al., 2016).

En China, se han realizado algunas evaluaciones de la calidad sanitaria de productos marinos, en las cuales no se logró detectar la presencia de *Listeria monocytogenes*; sin embargo, los patógenos *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* evidenciaron valores del Número Más Probable (NMP) \geq a 3 (Chen et al., 2010). En Berlín, se determinó la prevalencia de *Vibrio* spp. en mariscos crudos, camarones y bivalvos expendidos en supermercados y tiendas de productos del mar. De las muestras analizadas, la prevalencia de estas bacterias en camarones fue ligeramente superior a la encontrada en los bivalvos (Vu et al., 2018). A lo antes descrito, se une el reporte de Hanoi, Vietnam, donde la presencia de vibrios fue la más prevalente (Tra et al., 2016).

El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos, informó que las infecciones por vibriosis aumentaron entre 1996 a 2006, y en 2005 se confirmaron 121 casos por *V. vulnificus* (CDC, 2006; 2007). En 2023, el número de casos de vibriosis asociadas a alimentos aumentó con respecto al período 2016-2018 (CDC, 2024). Raszl et al. (2016) reportaron que en América del Sur las infecciones por *V. parahaemolyticus* se han relacionado con el consumo de mariscos. Sin embargo *V. vulnificus* se obtiene por el contacto del agua con heridas abiertas. Perú, Ecuador y Uruguay reportaron casos de muerte en humanos derivados de vibriosis (Raszl et al., 2016). Siendo Manta el principal puerto de desembarque de productos pesqueros de Ecuador (Martínez-Ortiz et al., 2015; Castro-Briones, 2019; Cisneros-Montemayor et al., 2024), es importante conocer la presencia de bacterias potencialmente patógenas en productos pesqueros, especialmente en lugares de expendio, como mercados minoristas. En estos, se debe cumplir la normativa de vigilancia y control sanitario para asegurar la inocuidad de los productos y, por consiguiente, la salud pública.

En el caso de pescados y camarones listos para el consumo (normas INEN 1896:2013; INEN 456:2013) los patógenos *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae*, son requisitos microbiológicos regulados por el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). El método de ensayo recomendado para determinar la presencia o ausencia es el ISO 21872, método horizontal para la determinación de *Vibrio* spp., siendo una técnica tradicional que toma días para identificar y cuantificar patógenos, la cual requiere intenso trabajo y presenta baja sensibilidad (Su & Liu, 2007; Chiluisa Utreras et al., 2014; Palomino-Camargo & González-Muñoz, 2014).

En la actualidad se ha impulsado el uso de técnicas de detección molecular basados en la amplificación de ácidos nucleicos, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa, (PCR, por sus siglas en inglés) que es cuantitativa en tiempo

real y facilita la detección y cuantificación de microorganismos patógenos y su aplicación en la industria de alimentos (Maurer, 2006). La ventaja de usar técnicas de PCR para alimentos es la especificidad y la rapidez de las pruebas, en comparación con las técnicas tradicionales (Palomino-Camargo & González-Muñoz, 2014). Es conveniente indicar que hay estudios para la detección y cuantificación de vibrios utilizando PCR en tiempo real en países como EE. UU. (Liu et al., 2019), España (Garrido-Maestu et al., 2014) y Francia (Robert-Pillot et al., 2010; 2014). No obstante, Aspiazu-Miranda, (2017) implementó un PCR múltiple para el diagnóstico de *V. cholerae*, en el proceso de control de calidad del camarón para exportación, dando como resultado información comprensible acerca de la ocurrencia y distribución de estos genes en *V. cholerae*. En consecuencia, los protocolos resultaron confiables y rápidos para la detección sensible y específica de *V. cholerae*.

Se debe considerar el uso de métodos de detección rápidos, precisos y específicos, como la técnica de PCR en tiempo real, que permite detectar la presencia de segmentos de ADN específicos en muestras (Rodríguez-Lázaro, 2013). Estos ayudaron a determinar, por ejemplo, la especie que compone un producto procesado, y así determinar acciones fraudulentas o adulteraciones accidentales o intencionales de los alimentos producidas por contaminantes biológicos, como puede ocurrir con bacterias patógenas del género *Vibrio* en muestras de camarón. En este último caso, el procedimiento permitiría recopilar datos para identificar, rastrear y, en última instancia, prevenir estas infecciones.

En este sentido, el presente trabajo pretende determinar la presencia de bacterias patógenas del género *Vibrio* spp. en el camarón de comercio minorista en mercados del cantón Manta, y el cumplimiento de estos con la norma INEN 2687 de mercados saludables.

2. Materiales y Métodos

2.1 Área de estudio

La investigación se efectuó en el cantón Manta en los mercados minoristas: Mariscos Playita Mía 0°57'00.7"S 80°42'32.7"W; Central de Manta 0°56'57.3" S 80°43'34.5" W y Parroquial Eloy Alfaro 0°58'53.0" S 80°42'20.2" W, mientras que, la fase analítica se ejecutó en el laboratorio de microbiología, aceites y grasas (A&G) de la empresa La Fabril S.A., Manta, Ecuador, acreditado bajo la norma técnica ecuatoriana - NTE INEN ISO IEC 17025, la cual permite establecer la confiabilidad de los análisis microbiológicos desarrollados en la industria. Los muestreos se realizaron desde noviembre de 2019 hasta abril de 2020 con una duración de 6 meses.

2.2 Caracterización de los mercados

Se calificó a los mercados realizando visitas programadas a los diferentes locales de expendio menor de camarón y con ayuda de una lista de verificación fundamentada en la norma NTE INEN 2387:2013, (INEN 2687, 2013). Esta última orientada al aseguramiento de la calidad e inocuidad de los alimentos que se expenden en los centros de abastecimiento para la población en general.

2.3 Detección de *Vibrio* spp. en camarón de comercio minorista

Las muestras de camarón de expendio menor se recolectaron siguiendo las recomendaciones de la NTE INEN 1529-2:1999), la cual establece los protocolos para recolección, conservación y transporte de muestras de productos cárnicos para análisis biológicos. Las muestras recolectadas estuvieron compuestas de varios ejemplares de camarón hasta alcanzar 100 g. Estas fueron transportadas al laboratorio bajo condiciones de oscuridad con el fin de evitar la incidencia de luz directa, para reducir la posibilidad de cambio de la calidad microbiológica.

El muestreo se realizó de acuerdo con lo establecido por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos (ICMSF, 2011), utilizando el método de muestreo por atributos de dos clases, que evaluó los resultados obtenidos como aceptables o

inaceptables. El plan de muestreo seleccionado fue de riesgo moderado con extensión amplia, el cual incluye microorganismos que presentan riesgos epidemiológicos severos. Como condición de uso se aplicó el caso 11, donde $n=10$ (número de unidades de muestras a analizar) y $c=0$ (número máximo de resultados positivos permitidos).

Durante 10 semanas consecutivas, desde noviembre 2019 a enero 2020, se realizaron muestreos en cada mercado, tomando muestras de la mitad de los puestos de venta (5 en Playita Mía, 3 en el mercado Central de Manta y 2 en el Eloy Alfaro), seleccionados aleatoriamente. En cada puesto de venta se adquirió al menos 250 g de muestra de camarón de distintas tallas. El camarón podía provenir de granjas de cultivo o de la pesca en el mar, pero los vendedores no pudieron proporcionar con seguridad la trazabilidad de origen. Por ello, se decidió considerar a los inóculos como muestras combinadas de ambos orígenes.

En la preparación de las muestras de camarón se utilizaron las recomendaciones de la NTE INEN-ISO 6887-3 (INEN, 2014), que indica quitar el exoesqueleto del crustáceo y cortar la carne en trozos, mezclar en un homogeneizador rotatorio y añadir la cantidad necesaria de agua de peptona alcalina al 0,5% para obtener una dilución 1 en 9.

Para la detección de vibrios potencialmente patógenos (*V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*), se efectuó el ensayo microbiológico molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real cuantitativa (qPCR), según el método 050902 AOAC RI (Hoelzer et al., 2013).

2.3 Análisis de datos

Para comparar las diferencias en los datos porcentuales del nivel de cumplimiento de la norma NTE INEN 2387:2013, (INEN, 2013c) entre mercados, se utilizó un análisis de varianza de una vía en base a los valores alcanzados por cada mercado en las categorías de dicha norma.

En caso de que las varianzas resultaran heterogéneas y no se pudiera corregir con la transformación arcoseno (Zar, 2010), se aplicó una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis con su correspondiente prueba a posteriori (Dunn, 1964).

La prevalencia de cada bacteria se comparó mediante una prueba Chi cuadrado. Los resultados de los análisis microbiológicos de presencia de *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* fueron calculados como porcentajes con el correspondiente intervalo de confianza (IC 95%).

Para el análisis de la significancia de las diferencias encontradas en los mercados de comercio minorista de camarón del cantón Manta y su relación con la prevalencia de *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* se efectuó la prueba regresión logística binaria con un nivel de significancia al 5%, de acuerdo con los grados de libertad (GL) del error. Los cálculos se efectuaron empleando el programa MS Excel® 2016.

2.3.1. Codificación de variables

Para el desarrollo y manejo estadístico se debieron codificar algunas variables para facilitar la ejecución de las pruebas estadísticas. Para la codificación de variables dicotómicas en las pruebas de regresión logística binaria se usó 0 para indicar ausencia de la bacteria y 1 para señalar su presencia.

3. Resultados

3.1. Caracterización de los centros de expendio de camarón con base a la norma NTE INEN 2687:2013

Dentro de la caracterización se aplicó una lista de verificación conforme a la norma para establecer el grado de cumplimiento de los requisitos y prácticas que deben efectuar los mercados para comercializar alimentos aptos para el consumo humano (Tabla 1). El porcentaje global de todos los mercados (48.8%) se encontró por debajo del mínimo esperado (70.0%).

Tabla 1. Valores porcentuales promedio del cumplimiento de requisitos de la norma INEN 2687 de los mercados de comercio minorista de camarón en Manta, Ecuador, entre noviembre 2019 y abril 2020 (N=6).

| Requisitos | Mercado | | |
|---|------------------|-------------|-------------|
| | Central de Manta | Playita Mía | Eloy Alfaro |
| Infraestructura | 93.1 | 55.2 | 6.9 |
| Servicios | 81.8 | 63.6 | 0.0 |
| Equipos y utensilios | 100.0 | 73.3 | 20.0 |
| Puesto de comercialización | 89.5 | 73.6 | 26.3 |
| Higiene del comerciante de alimentos | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Limpieza y desinfección | 100.0 | 33.3 | 0.0 |
| Control de Plagas | 87.5 | 62.5 | 0.0 |
| Capacitación | 54.6 | 63.6 | 0.0 |
| Control y aseguramiento de la inocuidad | 13.0 | 4.4 | 0.0 |
| Calidad sanitaria general | 68.8 | 47.7 | 5.9 |

Se observó una infraestructura eficiente en el mercado Central de Manta, como disponibilidad de espacio, mantenimiento y limpieza, sistema de drenaje, señalética, condiciones higiénico-sanitarias de pisos, paredes, mesones y techos, entre otros. Sin embargo, tanto el mercado de Playita Mía como Eloy Alfaro evidenciaron deficiencias en su infraestructura (Figura 1).

La infraestructura que ofrecía el mercado Central de Manta (93%) y el de Playita Mía (55%) permitió corroborar el cumplimiento total y parcial, respectivamente, de la norma. No obstante, el mercado Eloy Alfaro no disponía de las características establecidas en dicha norma para la operatividad.

En cuanto a los servicios básicos, como electricidad, agua potable y servida, recolección de desechos, el mercado Central de Manta mostró un cumplimiento de la norma, y solo fue parcialmente cumplido por el de Playita Mía. El mercado Eloy Alfaro careció de los servicios básicos. Los mercados Central de Manta y Playita Mía registraron un cumplimiento de la norma en

cuanto a utensilios. Al contrario de lo expuesto, en el mercado Eloy Alfaro persistió el incumplimiento de los requisitos establecidos en la normativa referida en cuanto al uso de equipos y utensilios. Los puestos de venta de los mercados Central de Manta y Playita Mía cumplieron con la norma y tuvieron una puntuación promedio de 81.6%. Sin embargo, en la visita *in situ* se observó que los camarones no estuvieron exhibidos y protegidos en vitrinas refrigeradas o sobre hielo. En contraparte, el mercado Eloy Alfaro registró deficiencias en este requisito.

La norma exige condiciones específicas de salubridad que deben cumplir los trabajadores que expenden alimentos, como disponer del certificado de salud, vestimenta (mandil y cofia), aseo de manos, higiene y prácticas del manipulador de alimentos. En los tres mercados evaluados se identificó el incumplimiento general de estas condiciones. Además, se observó que los mismos expendedores manipulan el dinero del pago de las ventas, sin considerar el riesgo de contaminación cruzada.



Figura 1. Infraestructura de los puntos de venta, vestimenta del expendedor y ausencia del aseguramiento de la cadena de frío, en: **A.** Mercado Central de Manta, se aprecia los lavabos y bandejas individuales en un área protegida. **B.** Playita Mía, se observa un área techada, sin paredes, en mesas planas y separación parcial de los productos expendidos. **C.** Mercado Parroquial Eloy Alfaro, se evidencia el expendio de productos al aire libre, combinando vegetales y productos cárnicos.

El programa de limpieza de los puestos de venta exige el uso de productos químicos y su almacenamiento en lugares que eviten la contaminación cruzada con los productos que se expenden. Este requisito se cumplió en el Mercado Central (100.0%), y solo parcialmente en el de Playita Mía. El mercado Eloy Alfaro incumple con este requisito.

Se observó que el mercado Eloy Alfaro incumple con las disposiciones establecidas en la norma para control de plagas. Sin embargo, los mercados de Central de Manta y Playita Mía evidencian un cumplimiento promedio del 75.0% en los aspectos del programa de control de plagas, uso de plaguicidas, medidas adoptadas por vendedores para control de plagas y disposición de alimentos que hayan sido contaminados por plagas.

Los mercados evaluados registraron un cumplimiento promedio del 39.4% de la capacitación que deben recibir los expendedores de alimentos por parte del ente municipal, valor que no alcanzó el mínimo esperado de 70.0%. El mercado Eloy Alfaro evidencia incumpliendo total en este requisito.

En los mercados de Playita Mía, Eloy Alfaro y Central de Manta, no se evidenció un programa de supervisión responsable, que asegure el control de calidad y la inocuidad de los productos que se expenden.

La comparación entre mercados reflejó diferencias significativas en el nivel de cumplimiento con la norma referida (Prueba Kruskal-Wallis, $H=12.18$; $P<0.05$). La prueba a posteriori separó el mercado de Eloy Alfaro, con

un nivel de cumplimiento significativamente inferior (5.9%) a los otros dos mercados que no difirieron entre si (47.7 y 68.8%, para Playita Mía y Central de Manta, respectivamente).

3.2. Prevalencia de *Vibrio* spp. en muestras de camarón de expendio menor

En el estudio de prevalencia realizado en tres mercados de expendio menor del Cantón Manta,

se recolectaron 84 muestras de camarón fresco. Los resultados de prevalencia de vibrios potencialmente patógenos en los mercados Central de Manta, Playita Mía y Eloy Alfaro no difieren significativamente entre mercados para las tres especies de *Vibrio* (Prueba de Chi cuadrado, *V. cholerae*, P=0,43; *V. parahaemolyticus*, P=0,10; *V. vulnificus*, P=0,21)) (Tabla 2).

Tabla 2. Prevalencia de *Vibrio* spp. en mercados de comercio minorista de camarón en Manta, Ecuador.

| | Central de Manta (n = 30) | | Playita Mía (n = 30) | | Eloy Alfaro (n = 24) | |
|----------------------------|------------------------------|-----------|-------------------------|-----------|-------------------------|-----------|
| | Prevalencia (%) | 95% CI | Prevalencia (%) | 95% CI | Prevalencia (%) | 95% CI |
| <i>V. cholerae</i> | 63.3 | 43.9-80.1 | 66.7 | 47.2-82.7 | 79.2 | 59.3-93.2 |
| <i>V. parahaemolyticus</i> | 33.3 | 17.3-52.8 | 60.0 | 40.6-77.3 | 54.2 | 33.1-73.9 |
| <i>V. vulnificus</i> | 10.0 | 0.0-17.2 | 3.3 | 0.0-11.6 | ND* | |

*ND, no fue detectado

La regresión binaria entre la prevalencia de las tres especies de vibrio y la calidad de los mercados no resultó ser significativa (*V. cholerae*, F=1,66; p=0,201; *V. parahaemolyticus*, F=1,61; p=0,207; *V. vulnificus*, F=2,66; p=0,106) (Figura. 2). Sin embargo, en los casos de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*, se observó una tendencia a la disminución de la prevalencia con la calidad sanitaria de los mercados.

4. Discusión

En general, se observaron diferencias importantes en el cumplimiento de la norma de Mercados saludables entre los tres mercados evaluados en Manta, con un cumplimiento global de 48.8%, lo cual se aleja del mínimo esperado (70.0%) que establece la norma NTE INEN 2687:2013. El Mercado Central de Manta alcanzó un cumplimiento del mínimo esperado en 6 de los 9

aspectos de calidad evaluados, mostrando deficiencias en cuanto a la higiene de los expendedores y a la ausencia de un programa de control de calidad e inocuidad de los alimentos que se expenden. El mercado de Playita Mía evidenció un cumplimiento mínimo en 2 de los aspectos evaluados, con las mayores deficiencias relacionadas con la higiene de los expendedores, la ausencia de un programa de control de calidad e inocuidad de los alimentos, y limpieza-desinfección de los puestos de venta. El mercado informal Eloy Alfaro incumplió en todos los aspectos considerados en el estudio.

Los resultados de la presente investigación coinciden con lo realizado por Sánchez Romo (2015), dónde se diagnosticó las condiciones de higiene en el Mercado Mayorista de Quito, reflejando un 16.7% de deficiencias en la higiene, limpieza y desinfección y control de plagas.

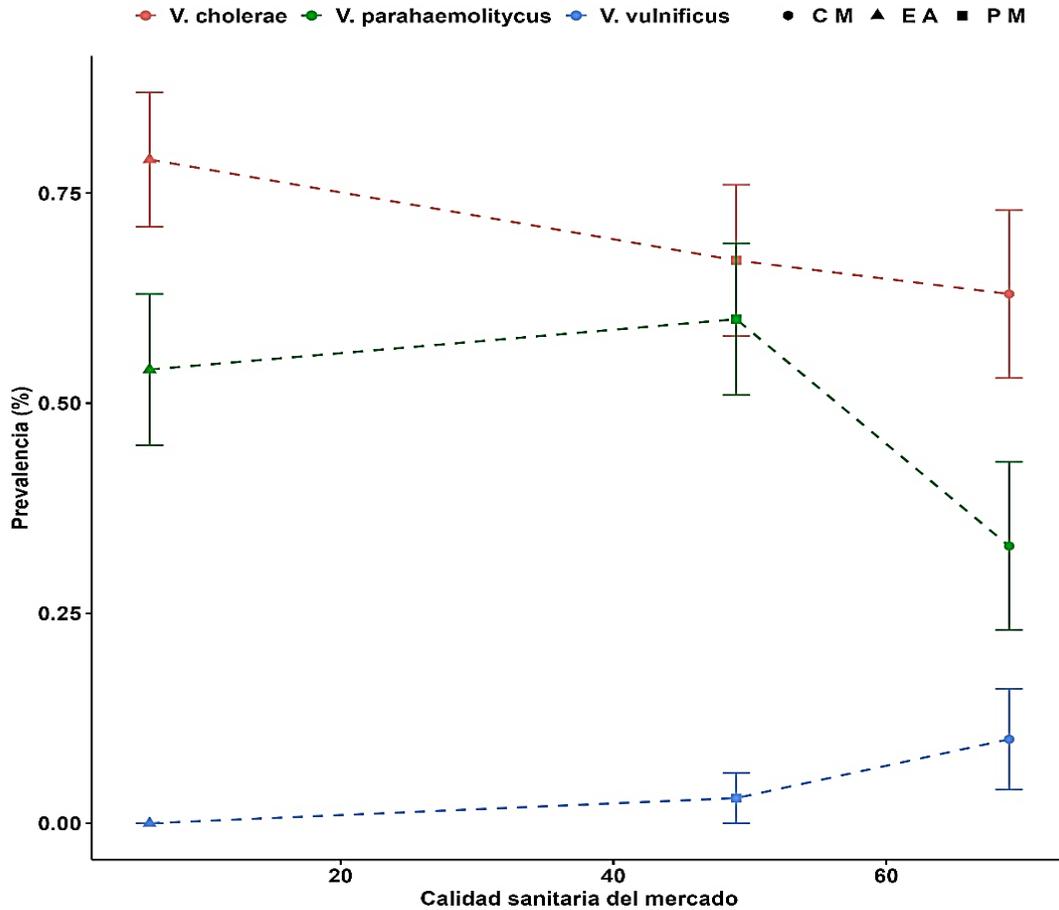


Figura 2. Prevalencia (media \pm EE) de vibrios en camarones expendidos en comercios minoristas de mercados (**CM**: Central de Manta; **EA**: Eloy Alfaro y **PM**: Playita Mía) en Manta, Ecuador, con relación a la calidad sanitaria de los mercados.

Yolanda et al. (2010) en un estudio realizado en mercados de México, observaron que las condiciones para la presencia de organismos patógenos fue la manipulación de dinero, la deficiente limpieza de los utensilios y la escasez de agua potable. De igual forma, Huamán & Zarate (2019) indican que los manipuladores de alimentos no aplican las Buenas Prácticas de Manufactura, por ende, se evidencia una cultura de prevención deficiente en los mercados de abastos de Lima, Perú.

Una de las ventajas del qPCR utilizada en el presente estudio, es el formato de tubo cerrado, análisis rápido y fácil de realizar, el intervalo dinámico de cuantificación es extremadamente amplio, siendo una técnica fiable y sensible

(Kralik & Ricchi, 2017). Por su parte, el sistema BAX Hygiene combina la amplificación y detección en el análisis de ADN con pruebas bioquímicas, lo cual permite ser un instrumento para detección de vibrio potencialmente patógenos por PCR, y cuenta con reactivos como cebadores, enzima polimerasa, nucleótidos, control positivo e intercalador fluorescente, incorporado en una tableta que permite la identificación de la bacteria (Martín de Santos, 2010; Doyle & Buchanan, 2012; Rodríguez-Lázaro, 2013).

La presencia de *V. cholerae* se destaca en las muestras de todos los mercados evaluados en el presente estudio, con prevalencias superiores a 63.0%, y parece ser un fenómeno generalizado entre los países donde ha sido evaluado. Al

respecto, Ndip et al. (2002) en el suroeste de Camerún, registran prevalencia de *V. cholerae* de 26.4% en camarones no procesados, y destaca que las aguas costeras contaminadas con efluentes domésticos son más propensas a la presencia de *V. cholerae*, el cual contaminaría los crustáceos allí presentes. Por otra parte, Sperling et al. (2015) reportan valores de prevalencia de *V. cholerae* de 7.0% en camarones provenientes de mercados de Cuenca, Ecuador, y 13.3% en ejemplares provenientes de granjas de cultivo del sur de Ecuador; no reportan estos autores la presencia del gen toxigénico *ctxA* en las muestras evaluadas de esta especie de *Vibrio* en Ecuador. Por su parte, Koralage et al. (2012) observan un 13.5% de prevalencia en camarones pre cosechados en provincia Noreste, Sri Lanka. En Alemania, estudios de Vu et al. (2018) encuentran prevalencias de *V. cholerae* en orden de 6.8% en camarones de venta menor en la ciudad de Berlín, mientras que Tra et al. (2016) evidencian un 2.0% de prevalencia en camarones minoristas en Hanoi, Vietnam. Sin embargo, Franco Monsreal et al. (2015) no reportan prevalencia de *V. cholerae* en productos marinos en México.

Se observó que las muestras de Manta reflejan los valores más elevados de prevalencia de *V. cholerae*, entre los estudios que pudieron detectarse en el ámbito mundial. A este respecto, la FAO (2001) indica que el camarón de consumo interno en países en vías de desarrollo podría estar contaminado con *V. cholerae* por higiene insuficiente del personal manipulador y al lavado con agua contaminada. Por su parte, Escobar et al. (2015) estudiaron la distribución de *V. cholerae* en los océanos del mundo, encontrando que la concentración de clorofila *a*, el pH y la temperatura superficial del mar explican de mejor manera la distribución de esta especie de patógeno potencial, y que las costas de América Latina, presentan condiciones favorables y semejantes a las de Bangladesh donde el *V. cholerae* es endémico.

La prevalencia promedio de *V. parahaemolyticus* entre los mercados evaluados fue de 49.2%, sin

que las diferencias entre dichos mercados difirieran significativamente. En una revisión de la presencia de *V. parahaemolyticus* en alimentos marinos, Odeyemi (2016) reporta una prevalencia de 48.3% de este vibrio en camarones, aunque la observada en bivalvos, particularmente en ostras, fue mayor (63.4%). Al respecto, Nakaguchi (2013), en estudios realizados en países asiáticos, obtuvo resultados de prevalencia del 72.2% en Vietnam, 54.5% en Malasia, y en ciudades de Indonesia como Padang donde observó prevalencias de 66.7% y 57.9% en Yakarta. Por su parte, en China, Xu et al. (2014) determinaron que en camarones vendidos por minoristas se encontró una prevalencia de 37.7%. Además, estudios de Silva et al. (2018) reportan prevalencias de 75.0% en camarones de venta en mercados de Korea. Así mismo, Robert-Pillot et al. (2014) realizaron estudios en camarones consumidos en Francia donde identificaron un 31.1% de prevalencia de este vibrio.

En Ecuador, Sperling et al. (2015) señalaron valores de 80.8% de prevalencia de *V. parahaemolyticus* en camarón de expendios minoristas y granjas, lo cual puede relacionarse con el reporte de Berry et al. (1994), quienes calcularon la prevalencia de este *Vibrio* alcanzando 36.7% en camarones crudos importados por Estados Unidos procedentes de Ecuador. Entre los estudios que reportan valores menores de prevalencia de esta especie en camarones, están los de Abd-Elghany & Sallam (2013) quienes indicaron una prevalencia de 16.7% en mercados de la ciudad de Mansoura, Egipto; Eja et al. (2008) quienes reportaron la prevalencia de este vibrio en mariscos de Nigeria y observaron 13.6%; y Zarei et al. (2012) quienes estimaron una prevalencia de 7.1% en camarones de expendio en mercados de Irán.

Esta generalidad de la presencia de *V. parahaemolyticus* en muestras de camarones vendidos en muchos países puede estar asociada a su distribución natural en ambientes marinos. Al respecto, Su y Liu (2007) y Jones (2017), indican que la distribución de esta bacteria está asociada

a ambientes marinos y estuarinos, con especial influencia de la temperatura. La bacteria puede estar en fase de latencia en el sedimento durante periodos invernales de países templados y recolonizar la columna de agua cuando la temperatura alcanza 15°C o más.

La presencia de *V. vulnificus* fue observada en dos de los mercados evaluados en el presente estudio con una prevalencia baja (10.0 y 3.3%), sin diferencias significativas entre mercados. Al respecto, Robert-Pillot et al. (2014) también reportaron bajas prevalencias de esta especie de vibrio con valor de 12.6% en camarones consumidos en Francia, mientras que, Vu et al. (2018) encontraron prevalencias de 1.3% en camarones de ventas de minoristas en Berlín, Alemania.

En su estudio, Elhadi et al. (2004) reportaron una prevalencia de *V. vulnificus* de 6.0% en camarones obtenidos en los mercados y supermercados de Malasia. De igual forma, Koralage et al. (2012) observaron un 2.4% de prevalencia en camarones pre cosechados en una provincia al Noreste de Sri Lanka, mientras que, Tra et al. (2016) investigaron la prevalencia de camarones en mercados minoristas en Hanoi, Vietnam, encontrándola en 1.5%.

Sperling et al. (2015) reportaron valores de 3.5% de prevalencia de *V. vulnificus* en camarón de expendios minoristas y granjas de Ecuador. En contraste, Berry et al. (1994) reportan un 10.0% de prevalencia en camarones crudos importados en los Estados Unidos provenientes de Ecuador, aunque los procedentes de México alcanzaron un 40.0% de prevalencia y no se observó presencia de esta bacteria entre los camarones procedentes de China.

Se deduce de los estudios antes citados, que la prevalencia de *V. vulnificus* es menor en crustáceos que otras especies de vibrios. Según Oliver (2015) y Baker-Austin y Oliver (2018), *V. vulnificus* es un patógeno oportunista que habita regularmente en aguas costeras y estuarinas,

particularmente en los meses más cálidos del año. Suele estar presente en alta densidad en moluscos bivalvos y gasterópodos, a través de los cuales puede contaminar al hombre. Se estima que un 95.0% de los fallecimientos de humanos asociados al consumo de alimentos marinos crudos o levemente cocinados en los Estados Unidos, son causados por esta bacteria.

Las prevalencias observadas de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* en las muestras de camarón, discreparon de los límites microbiológicos señalados en la NTE INEN 456:2013 (INEN, 2013a), la cual establece que dichos patógenos no deben ser detectados, tanto en camarones y langostinos crudos como congelados.

Los resultados del presente estudio reflejan la influencia de las aguas costeras del Ecuador sobre la población bacteriana, en particular de *Vibrio* spp. que se observó en los camarones de expendio minorista en Manta, pues tanto los procedentes de granjas de cultivo como de la pesca, están expuestos al agua de mar costera. La falta de asociación significativa entre la calidad sanitaria de los mercados y la prevalencia de las tres especies de vibrios, sugiere que los camarones vienen del sitio de cultivo o captura ya contaminados con el patógeno, siendo los ambientes salinos el medio natural para estas bacterias. La carencia de hielo observada en todos los puestos de expendio de los camarones posiblemente crea un ambiente propicio para la proliferación de las bacterias ya presentes en ellos, y pudiera estar asociado al elevado índice de prevalencia de *Vibrio* spp. registrado en este estudio.

5. Conclusiones

El cumplimiento de la norma NTE INEN 2687 "Mercados Saludables", por los centros de abastecimiento Playita Mía, Eloy Alfaro y Central de Manta, fue menor al mínimo establecido por dicha norma (70.0%). El Mercado Central de Manta es el que más se aproxima a lo indicado por la referida norma, con un cumplimiento general de 68,8% de los requisitos, mientras que, el

mercado informal de Eloy Alfaro registró el menor cumplimiento (5.9%). El mayor incumplimiento a dicha normativa estuvo asociado a la higiene personal de los vendedores y al control y aseguramiento de la inocuidad.

Se encontró una alta prevalencia (95.8%) de especies de *Vibrio* spp. en las muestras de camarón procedentes de los tres mercados minoristas de mariscos evaluados. Entre las tres especies de *Vibrio* detectadas, *V. cholerae* mostró la prevalencia promedio más alta (69.7%), sin diferencias significativas entre los tres mercados. *Vibrio parahaemolyticus* alcanzó una prevalencia promedio de 49.2%, mientras que *V. vulnificus* tuvo una prevalencia baja (10.0% en Manta Central, 3.3% en Playita Mia y no fue detectado en el mercado Eloy Alfaro).

Estudios futuros deberían identificar el tipo de cepa de *V. cholerae* presente en las costas ecuatorianas como medida de prevención de salud pública. Además, deben generarse monitoreos permanentes al cumplimiento de la norma NTE INEN 2687 Mercados saludables, que permitan corregir y alcanzar el umbral exigido. Se requieren estudios de trazabilidad en la cadena de producción y comercialización del camarón, para identificar los puntos críticos de contaminación cruzada de *V. cholerae* y minimizar el riesgo del incremento de bacterias patógenas en la cadena productiva. Las autoridades deben advertir a la población sobre la necesidad de consumir camarones cocidos, no crudos o solo camarones salteados con limón, ya que este último es uno de los platos culinarios (ceviche) más tradicionales en los países de la costa del Pacífico de América Latina.

6. Referencias

- Abd-Elghany, SM, and Sallam, KI (2013). Occurrence and molecular identification of *Vibrio parahaemolyticus* in retail shellfish in Mansoura, Egypt. *Food Control*, 33(2), 399–405.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.03.024>
- Aspiazu-Miranda, E.P., Granda-Barba, Y.M., and Mosquera-Herrera, C.E. (2017). Implementation of a multiplex PCR for the diagnosis of *Vibrio cholerae*, in quality control of export shrimp. *Science Domain*, 3(4), 369–380.
<http://dx.doi.org/10.23857/dom.cien.pocaip.2017.3.4jul.369-380>
- Baker-Austin, C., and Oliver, J.D. (2018). *Vibrio vulnificus*: New insights into a deadly opportunistic pathogen. *Environmental Microbiology*, 20(2), 423–430.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.13955>
- Berry, T.M., Park, D.L., and Lightner, D.V. (1994). Comparison of the Microbial Quality of Raw Shrimp from China, Ecuador, or Mexico at Both Wholesale and Retail Levels. *Journal of Food Protection*, 57(2), 150–153.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-57.2.150>
- Castro-Briones, E. X. (2019). La pesca de pelágicos grandes con palangre de superficie en el Océano Pacífico Oriental: Análisis espacial, caracterización y variabilidad interanual de las capturas extraídas por la flota del Ecuador. [Tesis de Maestría, Universidad de Alicante, España].
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2006. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens commonly transmitted through food—10 states, United States, 2005. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 55, 392–395.
<https://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm514.pdf> [accessed: 05 February 2023].
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2007. Preliminary Food Net data on the incidence of infection with pathogens commonly transmitted through food—10 states, United States, 2006. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 56, 336–339.
<https://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm5614.pdf>
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2024. FoodNet 2023 Preliminary Data.
<https://www.cdc.gov/foodnet/reports/preliminary-data.html>

- Chen, Y., Liu, X.M., Yan, J.W., Li, X.G., Mei, L.L., Ma, Q.F., and Ma, Y. (2010). Foodborne Pathogens in Retail Oysters in South China. *Biomedical and Environmental Sciences*, 23(1), 32-36. [https://doi.org/10.1016/S0895-3988\(10\)60028-1](https://doi.org/10.1016/S0895-3988(10)60028-1).
- Chiluisa Utreras, V., Coba, J., and Echeverría, A. (2014). Real-time PCR determination of *Escherichia coli* in fast food samples. *La Granja*, 19(1), 44. <https://doi.org/10.17163/lgr.n19.2014.03>.
- Cisneros-Montemayor, A., González-Espinosa, P., & Alava, J. J. (2024). Beneficios económicos y multidimensionales de la biodiversidad y gobernanza innovadora para la implementación del Marco Mundial de Biodiversidad de Kunming-Montreal en América Latina y el Caribe. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, New York.
- Cremonesi, P., Pisani, L.F., Lecchi, C., Ceciliani, F., Martino, P., Bonastre, A.S., and Castiglioni, B. (2014). Development of 23 individual TaqMan® real-time PCR assays for identifying common foodborne pathogens using a single set of amplification conditions. *Food Microbiology*, 43, 35-40. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.007>.
- Daniels, N.A., and Shafaie, A. (2000). A Review of Pathogenic *Vibrio* Infections for Clinicians. *Infect. Med.*, 17(10), 665-685. <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=d2d3f72764e496b04cc5cf335adaaea844d5bca6>
- Doyle, M. P. & Buchanan, R. L. (Eds.). (2012). Food microbiology: fundamentals and frontiers. American Society for Microbiology Press.
- Dunn, W. B. (1964). Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics*, 6(3), 241-252.
- Martín de Santos, R. (2010). Métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de los alimentos. En Sanz Pérez, B. (Ed.) Aspectos higiénicos de los alimentos microbiológicamente seguros. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid, España. (p. 67-98).
- Eja, M.E., Abriba, C., Etok, C.A., Ikpeme, E.M., Arikpo, G.E., Enyi-Idoh, K.H., and Ofor, U.A. (2008). Seasonal Occurrence of *Vibrios* in Water and Shellfish Obtained from the Great Kwa River Estuary, Calabar, Nigeria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81(3), 245-248. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9482-x>.
- Elhadi, N., Radu, S., Chen, C.H., and Nishibuchi, M. (2004). Prevalence of Potentially Pathogenic *Vibrio* Species in the Seafood Marketed in Malaysia. *Journal of Food Protection*, 67(7), 1469-1475. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.7.1469>
- Escobar, L.E., Ryan, S.J., Stewart-Ibarra, A.M., Finkelstein, J.L., King, C.A., Qiao, H., and Polhemus, M.E. (2015). A global map of suitability for coastal *Vibrio cholerae* under current and future climate conditions. *Acta Tropica*, 149, 202-211. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.028>
- FAO 2001. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Risk Assessment Associated with Microbiological Hazards in Food: Hazard Identification, Exposure Assessment and Hazard Characterization of *Campylobacter* spp. in broiler chickens and *Vibrio* spp. in shellfish, WHO Headquarters, Geneva, Switzerland, 23-27 July 2001 (No. WHO/SDE/PHE/FOS/01.4). <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67090>.
- Franco Monsreal, J., Serralta-Peralta, L.E., Hernández Gómez, J.R., Sosa-Castilla, F., and Castillo-Cocom, J.A. (2015). Prevalence of clinically important species of the genus *Vibrio* in seafood of animal origin from establishments in the city and port of Progreso de Castro, Yucatán, Mexico. *Medwave*, 15(05), e6147. <https://doi.org/10.5867/medwave.2015.05.6147>
- Fleckenstein, J.M., Bartels, S.R., Drevets, P.D., Bronze, M.S., and Drevets, D.A. (2010). Infectious Agents of Food- and Water-Borne Illnesses. *The American Journal of the Medical Sciences*, 340(3), 238-246.

- <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e3181e99893a>.
- Garrido-Maestu, A., Chapela, M.J., Peñaranda, E., Vieites, J.M., and Cabado, A.G. (2014). In-house validation of novel multiplex real-time PCR gene combination for the simultaneous detection of the main human pathogenic vibrios (*Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*). *Food Control*, 37, 371-379. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.026>
- Guzmán Suárez, E.C., and Urgiles Guaman, A.G. (2020). Study of *Vibrio vulnificus* in oysters sold in a hatchery and in a market in the province of Santa Elena. [Tesis Doctoral, Universidad de Guayaquil, Ecuador]. <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/49266/1/BCIEQ-T-0507%20Guzm%C3%A1n%20Su%C3%A1rez%20Ericka%20Carolina%20B%20Urgiles%20Guaman%20Ana%20Grace.pdf>
- Havelaar, A.H., Kirk, M.D., Torgerson, P.R., Gibb, H.J., Hald, T., Lake, R.J., and Bellinger, D.C. (2015). World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLOS Medicine*, 12(12), e1001923. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001923>
- Hernández, K.M.L., Pardío-Sedas, V.T., Primo, A.F., Herrera, D.I.M., and Serrano, R.U. (2023). Estimation of the microbiological risk associated with the consumption of raw oysters contaminated with *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Biotechnia*, 25(1), 14-23. <https://doi.org/10.18633/biotechnia.v25i1.1701>
- Hidalgo Briones, A.D.C., León Bravo, M.K., and Cevallos, J.M. (2021). Determination of the incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in two species of fish for mass consumption, *Coryphaena hippurus* (dorado) and *Thunnus alalunga* (albacore) sold in high-demand markets in the city of Guayaquil. [Tesis doctoral, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.]. <https://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/52443>
- Hoelzer, S., Wallace, M., Fleck, L., DiCosimo, D., Harris, J., Andaloro, B., Farnum, A., Davis, E., and Rohrbeck, J. (2013). BAX® System Real-Time PCR Assay for *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus*. AOAC® Performance Tested, license number, 050902. Wilmington, USA. <https://www.higiene.com/wp-content/uploads/2020/09/AOAC-BAX-Assay-Vibrio-050902.pdf>
- Huamán Santos, E.E. y Zárata Murillo, W. (2019). Análisis situacional de las condiciones higiénico-sanitarias del manipulador de alimentos en los mercados de abastos de Lima Cercado enero-junio 2017. [Tesis de pregrado. Universidad Norbert Wiener, Lima, Perú]. <https://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/3021>
- ICMSF (2011). Microorganisms in Foods 8: Use of data for assessing Process Control and Product Acceptance. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Springer Science+Business Media LCC, Switzerland.
- INEN (1999). Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1529-2. Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para análisis microbiológicos. Instituto Ecuatoriano de Normalización, Quito. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1529-2.pdf>
- INEN (2013a). Norma Técnica Ecuatoriana INEN 456. Langostinos y camarones congelados. Instituto Ecuatoriano de Normalización, Quito. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/456.pdf>
- INEN (2013b). Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1896. Pescado fresco refrigerado o congelado de producción acuícola. Instituto Ecuatoriano de Normalización, Quito. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1896-1R.pdf>
- INEN (2013c). Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2687. Mercados saludables. Instituto Ecuatoriano de Normalización, Quito. <https://www.salud.gob.ec/wp->

- content/uploads/2021/03/Norma-INEN-mercados-2687-2013-FINAL.pdf
- INEN (2014). Norma Técnica Ecuatoriana INEN-ISO 6887-3. Microbiología de los alimentos para uso animal y humano. Preparación de muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 3: Normas específicas para la preparación de pescado y productos pesqueros (ISO 6887-3:2003, IDT). Instituto Ecuatoriano de Normalización, Quito. https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_iso_6887-3_extracto.pdf
- Jones, M.K., and Oliver, J.D. (2009). *Vibrio vulnificus*: Disease and Pathogenesis. *Infection and Immunity*, 77(5), 1723-1733. <https://doi.org/10.1128/IAI.01046-08>.
- Jones, J.L. (2017). *Vibrio*. In Dodd C.E.R., Aldsworth, T., Stein, R.A., Cliver, D.O., and Riemann, H.P. (Eds.), *Foodborne Diseases* (3rd Edition) (pp. 243-252). London: Academic Press. <https://lib.ugent.be/catalog/ebk01:3710000001014385>
- Koralage, M.S.G., Alter, T., Pichpol, D., Strauch, E., Zessin, K.H., and Huehn, S. (2012). Prevalence and Molecular Characteristics of *Vibrio* spp. Isolated from Preharvest Shrimp of the North Western Province of Sri Lanka. *Journal of Food Protection*, 75(10), 1846–1850. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-115>
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Frontiers in microbiology*, 8, 108.
- Liu, Y., Cao, Y., Wang, T., Dong, Q., Li, J., and Niu, C. (2019). Detection of 12 Common Food-Borne Bacterial Pathogens by TaqMan Real-Time PCR Using a Single Set of Reaction Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 10, 222. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00222>.
- Martínez-Ortiz, J., Aires-da-Silva, A. M., Lennert-Cody, C. E., Maunder, M. N. (2015) The Ecuadorian Artisanal Fishery for Large Pelagics: Species Composition and Spatio-Temporal Dynamics. *PLoS ONE*, 10(8), e0135136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135136>
- Maurer, J. (Ed.). (2006). *PCR methods in foods*. New York, NY: Springer.
- Ndip, R.N., Akoachere, J.F.T.K., Mokosso, D.K., Ndip, L.M., and Anyangwe, I.A.N. (2002). Carriage of *Vibrio* species by shrimps harvested from the coastal waters of southwest Cameroon. *East African Medical Journal*, 79(3), 146-159. <https://doi.org/10.4314/eamj.v79i3.8895>
- Nakaguchi, Y. (2013). Contamination by *Vibrio parahaemolyticus* and Its Virulent Strains in Seafood Marketed in Thailand, Vietnam, Malaysia, and Indonesia. *Tropical Medicine and Health*, 41(3), 95–102. <https://doi.org/10.2149/tmh.2011-06>
- Odeyemi, O.A. (2016). Incidence and prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: A systematic review and meta-analysis. *SpringerPlus*, 5(1), 464. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2115-7>.
- Oliver, J.D., Pruzzo, C., Vezzulli, L., and Kaper, J.B. (2013). *Vibrio* Species. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 4th Edition, (pp. 401-439). Wiley. <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch16>.
- Oliver J.D.. 2015. The biology of *Vibrio vulnificus*, *Microbiol Spectrum* 3(3), VE-0001-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VE-0001-2014>.
- Palomino-Camargo, C., and González-Muñoz, Y. (2014). Molecular techniques for the detection and identification of pathogens in food: advantages and limitations. *Peruvian Journal of Experimental Medicine and Public Health*, 31(3), 535-546. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2014.313.93>.
- Powell, J. L. (1999). *Vibrio* species. *Clinics in Laboratory Medicine*, 19(3), 537-552. [https://doi.org/10.1016/S0272-2712\(18\)30103-3](https://doi.org/10.1016/S0272-2712(18)30103-3).
- Raszl, S.M., Froelich, B.A., Vieira, C.R.W., Blackwood, A.D., y Noble, R.T. (2016). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in

- South America: water, seafood, and human infections. *Journal of Applied Microbiology*, 121(5), 1201-1222. <https://doi.org/10.1111/jam.13246>.
- Rodríguez-Lázaro, D. (Ed.). (2013). Real-time PCR in food science: current technology and applications. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Robert-Pillot, A., Copin, S., Gay, M., Malle, P., and Quilici, M.L. (2010). Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: Fast and reliable quantification by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.016>.
- Robert-Pillot, A., Copin, S., Himber, C., Gay, M., and 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, 75-81. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.014>.
- Sánchez Romo, F.M. (2015). Desarrollo de un sistema de gestión de seguridad alimentaria basado en la norma ISO 22.000: 2005 y en el Reglamento 3253 de buenas prácticas de manufactura en el Mercado Mayorista de Quito (MMQ-EP). [Tesis de maestría, Universidad Central de Ecuador, Quito]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6275/1/T-UCE-0008-P026.pdf>
- Silva, B.C.J.D., Hossain, S., Dahanayake, P.S., Zoysa, M.D., and Heo, G.J. (2018). Comparative prevalence and characterization of *Vibrio* spp. Isolated from live and frozen white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Korean markets. *Journal of Food Safety*, 38(5), e12487. <https://doi.org/10.1111/jfs.12487>
- Sperling, L., Alter, T., and Huehn, S. (2015). Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Vibrio* spp. in Retail and Farm Shrimps in Ecuador. *Journal of Food Protection*, 78(11), 2089-2092. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-160>.
- Su, Y.C., and Liu, C. (2007). *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiology*, 24(6), 549-558. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.01.005>.
- Swanson, K. M. J., Buchanan, R. L., Cole, M. B., Cordier, J. L., Flowers, R. S., Gorris, L. G. M., Taniwaki, M. H., Tompkin, R. B., & Zwietering, M. H. (2011). Microorganisms in Foods 8: Use of Data for Assessing Process Control and Product Acceptance. Springer Science + Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9374-8>
- Tantillo, G.M., Fontanarosa, M., Pinto, A.D., and Musti, M. (2004). Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections. *Letters in Applied Microbiology*, 39(2), 117-126. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01568.x>.
- Tra, V.T., Meng, L., Pichpol, D., Pham, N.H., Baumann, M., Alter, T., and Huehn, S. (2016). Prevalence and antimicrobial resistance of *Vibrio* spp. in retail shrimps in Vietnam. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 129(1-2), 48-51.
- Vezzulli, L., Pezzati, E., Brettar, I., Höfle, M., and Pruzzo, C. (2015). Effects of Global Warming on *Vibrio* Ecology. *Microbiology spectrum*, 3(3), VE-0004-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VE-0004-2014>.
- Vu, T.T.T., Alter, T., and Huehn, S. (2018). Prevalence of *Vibrio* spp. in Retail Seafood in Berlin, Germany. *Journal of Food Protection*, 81(4), 5. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-17-366>
- Xu, X., Wu, Q., Zhang, J., Cheng, J., Zhang, S., and Wu K. (2014). Prevalence, pathogenicity, and serotypes of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp from Chinese retail markets. *Food Control*, 46, 81-85. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.042>.
- Zar, J. H. (2010). Biostatistical analysis. 5th edn. Pearson, New Jersey.
- Zarei, M., Borujeni, M.P., Jamnejad, A., and Khezzadeh, M. (2012). Seasonal prevalence

of *Vibrio* species in retail shrimps with an emphasis on *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Control*, 25(1), 107–109.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.024>

4