



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

DIRECCIÓN DE POSGRADO Y FORMACIÓN CONTINUA

**INFORME DE INVESTIGACIÓN
PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MAGISTER
EN AGROINDUSTRIA**

MODALIDAD:

Trabajo de Titulación

TEMA:

**PREVALENCIA DE *Vibrios* PATÓGENOS EN CAMARÓN DE
COMERCIO MINORISTA EN MERCADOS DEL CANTÓN MANTA**

AUTOR:

BLGO. DARIEL INTRIAGO BERMÚDEZ

TUTOR:

ING. DENNYS LENIN ZAMBRANO VELÁSQUEZ, Mg.

COTUTOR:

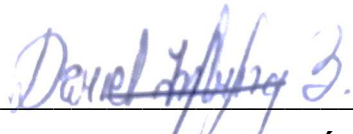
BLGO. LUBER JAVIER QUIJIJE LÓPEZ, Msc.

CALCETA, AGOSTO 2020

DERECHOS DE AUTORÍA.

DARIEL INTRIAGO BERMÚDEZ, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, que se han respetado los derechos de autor de terceros, por lo que asumo la responsabilidad sobre el contenido del mismo, así como ante la reclamación de terceros, conforme a los artículos 4, 5 y 6 de la Ley de Propiedad Intelectual.

A través de la presente declaración cedo los derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido en el artículo 46 de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.



DARIEL INTRIAGO BERMÚDEZ

CERTIFICACIÓN DE TUTOR

Mg. DENNYS LENIN ZAMBRANO VELÁSQUEZ, certifica haber tutelado el trabajo de titulación Prevalencia de *Vibrios* patógenos en camarón de comercio minoristas en mercados del cantón Manta, que ha sido desarrollado por el **BLGO. DARIEL INTRIAGO BERMÚDEZ**, previo la obtención del título de Magister en Agroindustria, de acuerdo al Reglamento de unidad de titulación de los programas de Posgrado de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



ING. DENNYS LENIN ZAMBRANO VELÁSQUEZ, Mg.

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el trabajo de titulación **PREVALENCIA DE *Vibrios* PATÓGENOS EN CAMARÓN DE COMERCIO MINORISTA EN MERCADOS DEL CANTÓN MANTA**, que ha sido propuesto, desarrollado y sustentado por el **BLGO. DARIEL INTRIAGO BERMÚDEZ**, previa la obtención del título de Magister en Agroindustria, de acuerdo al Reglamento de la unidad de titulación de los programas de Posgrado de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



Ing. Julio Salto Solórzano, PhD

MIEMBRO



Ing. Sofía Del Rocío Velásquez Cedeño, Mg

MIEMBRO



Ing. Ely Fernando Sacón Vera, PhD

PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

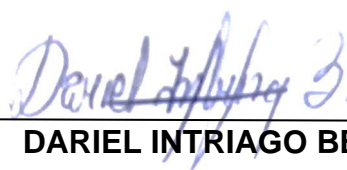
Deseo expresar mi agradecimiento, en primer lugar a Dios por brindarme salud, fortaleza y tenacidad. A mi esposa Gabriela, mis hijos Gabriel y Diego y mi querida madre Mary por toda la paciencia y confianza depositada, fue muy grato contar con su apoyo, amor y colaboración durante mis años de estudio.

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López que me dio la oportunidad de crecer como ser humano a través de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día; e intercambiado ideas y propuestas.

A las empresas La Fabril S. A. por facilitarme las instalaciones del Laboratorio Microbiología A&G, a Inocasal por el préstamo del Equipo PCR Bax Hygiene Q7; al GAD Municipal del cantón Manta y Asociación Playita Mía por permitirme visitar sus mercados y puestos de ventas de mariscos.

A Reina Hasing y Ma. Isabel Bolaños, Líderes del Departamento Control de Calidad. A mi Equipo de Laboratorio Microbiología A&G Juana, Anggie, Héctor, Carlos, Francisco su soporte fue magnífico. A Víctor, Viviana, Percy y Smaya por respaldar y animar la ejecución del trabajo de investigación.

A Lenin Zambrano, Javier Quijije y José Alió docentes, tutores y amigos a los cuales expreso de manera especial mi gratitud, gracias por los comentarios, opiniones y sugerencias al trabajo de investigación. Además quiero dar un reconocimiento a todo el cuerpo docente y administrativo que forman el Programa de Maestría Agroindustria.



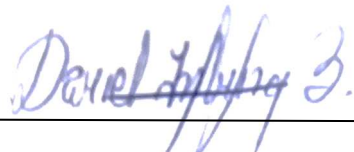
DARIEL INTRIAGO BERMÚDEZ

DEDICATORIA

“No os dejéis corromper por un escepticismo estéril y deprimente; nos os desalentéis ante la tristeza de ciertas horas que pasan sobre las naciones. Vivid en la serena paz de los laboratorios y la bibliotecas. Preguntaos primero: ¿Qué he hecho por instruirme? y, después, al ir progresando. ¿Qué he hecho por mi patria?. Hasta que llegue el día en que podáis sentir la íntima satisfacción de pensar en que de alguna manera habéis contribuido al progreso y bienestar de la humanidad”.

Louis Pasteur.

Este trabajo de investigación esta dedicado a Gabriela, Gabriel, Diego y Mary.



DARIEL INTRIAGO BERMÚDEZ

CONTENIDO GENERAL

DERECHOS DE AUTORÍA.....	ii
CERTIFICACIÓN DE TUTOR.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	iv
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA	vi
CONTENIDO GENERAL	vii
CONTENIDO DE TABLAS, FIGURAS Y ANEXOS.....	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT.....	xi
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	1
1.1.- PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2.-JUSTIFICACIÓN	4
1.3.- OBJETIVOS	5
1.3.1.- OBJETIVO GENERAL	5
1.3.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
1.4.- PREMISA.....	6
CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1.- <i>Vibrio</i>	7
2.1.1. <i>Vibrio cholerae</i>	8
2.1.2. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	8
2.1.3. <i>Vibrio vulnificus</i>	9
2.2.- INOCUIDAD EN MERCADOS DE EXPENDIO MINORISTA	9
2.3.- PREVALENCIA DE <i>Vibrio</i> spp. EN CAMARÓN	10
2.4.- HERRAMIENTAS DE DIAGNÓSTICO Y ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE q PCR	11
2.4.1.-DETERMINACIÓN DE <i>Vibrio</i> POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL O CUANTITATIVA (qPCR).....	11
2.4.2.- TIPOS DE CAMARÓN QUE SE EXPENDEN EN LOS MERCADOS DE MANTA.	13
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO	14
3.1.- UBICACIÓN	14
3.2.- DURACIÓN	14
3.3.- MÉTODOS, TÉCNICAS	14
3.3.1.- MÉTODOS.....	14
3.3.2.- TÉCNICAS.....	15
3.4.- VARIABLES EN ESTUDIO	15
3.4.1.- VARIABLE INDEPENDIENTE.....	15
3.4.2.-VARIABLE DEPENDIENTE	16
3.5.- PROCEDIMIENTO.....	16

3.5.1. CARACTERIZACIÓN DEL CENTRO DE EXPENDIO MENOR DE CAMARÓN MEDIANTE LA NORMA NTE INEN 2687:2013 MERCADOS SALUDABLES.	16
3.5.2.- DETECCIÓN DE <i>Vibrio cholerae</i> ; <i>V. vulnificus</i> ; <i>V. parahaemolyticus</i> EN CAMARÓN DE COMERCIO MINORISTA DEL GAD MUNICIPAL DEL CANTON MANTA.	16
3.6.-TÉCNICAS ESTADÍSTICAS.	17
3.6.1.- CODIFICACIÓN DE VARIABLES.	18
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1.- CARACTERIZACIÓN DE LOS CENTROS DE EXPENDIO DE CAMARÓN MEDIANTE LA NORMA NTE INEN 2687:2013 MERCADOS SALUDABLES.	19
4.1.1.- REQUISITOS RELATIVOS A LA INFRAESTRUCTURA.	20
4.1.2.- REQUISITOS RELATIVOS A LOS SERVICIOS.	20
4.1.3.- REQUISITOS RELATIVOS A LOS EQUIPOS Y UTENSILIOS.....	20
4.1.4.- REQUISITOS RELATIVOS AL PUESTO DE COMERCIALIZACIÓN ...	20
4.1.5.- REQUISITOS DE HIGIENE DEL COMERCIANTE DE ALIMENTOS ...	21
4.1.6.- REQUISITOS RELATIVOS A LA LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN.....	21
4.1.7.- REQUISITOS RELATIVOS AL CONTROL DE PLAGAS.	21
4.1.8.- REQUISITOS RELATIVOS A CAPACITACIÓN.	22
4.1.9.- REQUISITOS RELATIVOS AL CONTROL Y ASEGURAMIENTO DE LA INOCUIDAD.....	22
4.2.- PREVALENCIA DE <i>V. cholerae</i> ; <i>V. parahaemolyticus</i> ; <i>V. vulnificus</i> EN MUESTRAS DE CAMARÓN DE EXPENDIO MENOR.	23
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	27
5.1.- CONCLUSIONES.....	27
5.2.- RECOMENDACIONES.	28
BIBLIOGRAFÍA	29
ANEXOS	39

CONTENIDO DE TABLAS, FIGURAS Y ANEXOS

CONTENIDO DE TABLAS:

Tabla 1 Detalle de la cantidad de muestras.....	17
Tabla 2 Cumplimiento de requisitos de INEN 2687 en mercados de comercio minorista de camarón en Manta, Ecuador, establecidos en porcentaje (%).	19
Tabla 3 Prevalencia de <i>Vibrio</i> spp. en mercados de comercio minorista de camarón en Manta, Ecuador	23

CONTENIDO DE ANEXOS:

Anexo 1: 4.1 Aplicación de una lista de verificación conforme a la norma NTE INEN 2687:2013	19
Anexo 2: 4.1.1 Requisitos relativos a la infraestructura	20
Anexo 3: 4.1.2 Requisitos relativos a los servicios.....	20
Anexo 4: 4.1.3 Requisitos relativos a los equipos y utensilios.....	20
Anexo 5: 4.1.4 Requisitos relativos al puesto de comercialización	21
Anexo 6: 4.1.5 Requisitos de higiene del comerciante de alimenos.....	21
Anexo 7: 4.1.6 Requisitos relativos a la limpieza y desinfección.....	21
Anexo 8: 4.2 Prueba Chi cuadrado.	23

RESUMEN

Los brotes de enfermedades por consumo de alimentos se transmiten a diario en todo el mundo y las bacterias del género *Vibrio* son una causa importante de afecciones transmitidas por alimentos de origen marino. Esto representa una amenaza continua para la seguridad alimentaria de los consumidores. El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de bacterias potencialmente patógenas del género *Vibrio* en el camarón de comercio minorista en mercados del cantón Manta, Manabí, Ecuador. Para ello, se caracterizó los mercados Central de Manta, Playita Mía y Eloy Alfaro utilizando una lista de verificación según la norma INEN 2687: 2013 mercados saludables, y la detección de *vibrios* potencialmente patógenos, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, se realizaron pruebas microbiológicas de PCR cuantitativa en tiempo real, método AOAC RI 050902. El porcentaje global de calidad en todos los mercados (48.8%) se encontró por debajo de lo mínimo esperado (70.0%) y se reflejó en diferencias significativas ($p < 0.05$) en el nivel de cumplimiento con la norma referida. Entre las tres especies de *Vibrio* detectadas, *V. cholerae* mostró la prevalencia promedio más alta (69.7%), *V. parahaemolyticus* alcanzó una prevalencia promedio de 49.2%, mientras que *V. vulnificus* una prevalencia baja (10.0 y 3.3%). La prevalencia de *Vibrios* potencialmente patógenos no difirió significativamente entre mercados para las tres especies de *Vibrio* evaluadas ($p > 0,05$). Se concluye que existe una alta prevalencia de *Vibrio* spp. en las muestras de camarón procedentes de los tres mercados minoristas de mariscos del cantón Manta.

Palabras claves: *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, qPCR, mercados saludables.

ABSTRACT

Outbreaks of foodborne diseases are transmitted daily worldwide, and bacteria of the genus *Vibrio* are a major cause of conditions transmitted by marine food. This represents an ongoing threat for consumers' food security. The objective of this work was to determine the prevalence of potentially pathogenic bacteria of the genus *Vibrio* in retails of shrimp in markets in the city of Manta, Manabí, Ecuador. For this, the Central Market of Manta, Playita Mia and Eloy Alfaro were characterized using a checklist according to norm INEN 2687: 2013 healthy markets, and the detection of potentially pathogenic *Vibrio* was performed by real-time quantitative PCR microbiological tests, AOAC RI method 050902. The overall percentage of quality in all markets (48.8%) was below the expected minimum (70.0%), and was reflected in significant differences ($p < 0.05$) in the level of compliance with the norm referred to. Among the three *Vibrio* species evaluated, *V. cholerae* showed the highest average prevalence (69.7%), *V. parahaemolyticus* achieved an average prevalence of 49.2%, while *V. vulnificus* had a low prevalence (10.0 and 3.3%). The prevalence of potentially pathogenic *Vibrios* did not differ significantly among markets for the three *Vibrio* species evaluated ($p > 0.05$). It is concluded that there was a high prevalence of *Vibrio* species in the shrimp samples from the three seafood retail markets of the Manta municipality.

Key words: *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, qPCR, healthy markets.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1.- PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Los brotes de enfermedades por consumo de alimentos (ETAs) se transmiten a diario en todo el mundo (Fleckenstein, Bartels, Drevets, Bronze & Drevets, 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*; *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* son los patógenos más importantes (Daniels & Shafaie, 2000; Tantillo, Fontanarosa, Pinto & Musti, 2004). *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, Pruzzo, Vezzulli & Kaper, 2013; Raszl, Froelich, Vieira, Blackwood & Noble, 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) ≥ 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 *Vibrio* spp. en camarones fue ligeramente superior a la encontrada en los bivalvos (Vu, Alter & Huehn, 2018).

A lo antes descrito, se une el reporte de Hanoi, Vietnam donde se evidencia a *V. parahaemolyticus*; *V. alginolyticus*; *V. cholerae* y *V. vulnificus* como los más prevalentes (Tra et al., 2016).

El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC por su sigla en inglés) informó que las infecciones por *Vibrio* spp. aumentaron entre 1996 y 2006, y en 2005 se confirmaron 121 casos por *V. vulnificus* (CDC, 2006; CDC, 2007). Raszl et al. (2016), explican que en América del Sur las infecciones por *V. parahaemolyticus* se han relacionado con la alimentación 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 *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Raszl et al., 2016).

En Ecuador, se identificaron resultados positivos para *Vibrio* spp. (Sperling, Alter, & Huehn, 2015); es así, que el portal Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF por sus siglas en inglés) publica alertas de presencia de *V. parahaemolyticus*; *V. vulnificus* y *V. alginolyticus* en camarones crudos congelados en países de la Comunidad Europea provenientes del Ecuador durante el periodo 1999 al 2019.

En el caso de pescados y camarones listos para el consumo (INEN 1896, 2013; INEN 456, 2013) los patógenos *V. parahaemolyticus*; *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 un método clásico que toma días para identificar y cuantificar patógenos, además de requerir intenso trabajo, y presenta baja sensibilidad (Su & Liu, 2007; Chiluisa Utreras, Coba & Echeverría, 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 *Vibrio* utilizando PCR en tiempo real en países como EEUU (Liu et al., 2019), España (Garrido-Maestu, Chapela, Peñaranda, Vieites & Cabado, 2014) y Francia (Robert-Pillot, Copin, Gay, Malle & Quilici, 2010; 2014). No obstante, Aspiazu-Miranda, (2017) implementa 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 ayudan 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 ayudar a identificar, rastrear y, en última instancia, prevenir estas infecciones.

Con estos antecedentes se plantea la siguiente pregunta científica: ¿Cuál es la prevalencia de bacterias patógenas del género *Vibrio* spp. en el camarón que se expende en comercios minoristas de mercados en el cantón Manta?

1.2.-JUSTIFICACIÓN

Cada vez más, los métodos moleculares son utilizados para detectar, cuantificar y estudiar microorganismos patógenos (Palomino-Camargo & González-Muñoz, 2014). Entre estos métodos, las técnicas basadas en Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) han ganado aceptación siendo objeto de considerable atención (Maurer, 2006). Particularmente la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real tiene como ventaja ser más rápida, específica y sensible, cuantificando el ADN objetivo con mayor reproducibilidad (Postollec, Falentin, Pavan, Combrisson & Sohier, 2011; Rodríguez-Lázaro, 2013).

Entre los sistemas automatizados de PCR que han encontrado aplicación en la industria de alimentos están el BAX Hygiene Co., (Maurer, 2006; Martin de Santos, 2010) el cual ha sido aprobado por agencias gubernamentales de Estados Unidos, Brasil, China, Canadá, Japón, Suiza y Rusia. Dicho sistema permite detectar la presencia de genes específicos de microorganismos patógenos como los del género *Vibrio*, cubriendo la necesidad existente de implementar métodos de análisis rápidos, de alta sensibilidad, alta especificidad, de costo razonable y de fácil manejo.

Las costumbres cambiantes de la población humana son responsables de las variaciones en la diversidad y cantidad de alimentos consumidos, a lo cual se une la globalización y el crecimiento de la población. Por lo tanto, surge la necesidad cada vez más importante de analizar los alimentos, cualitativa y cuantitativamente desde las perspectivas de estandarización, autenticación y certificación de la inocuidad de los alimentos (Salihah, Hossain, Lubis & Ahmed, 2016).

Ante esto, los programas de seguridad alimentaria y control de calidad microbiológica son cada vez más aplicados en toda la cadena de suministro de alimentos. Esto garantiza productos inocuos con valor agregado, incrementándose su importancia en la agricultura y en la industria procesadora de alimentos (Rodríguez-Lázaro, 2013).

En Ecuador, la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA) promueve con los diferentes Gobiernos Autónomos Descentralizados (GAD) Municipales, los mercados saludables empleando los requisitos de la norma INEN 2687. En esta última se establece el control y aseguramiento de la inocuidad (INEN 2687, 2013) debido a que la pérdida de calidad de los alimentos expendidos puede ocasionar infecciones, intoxicaciones y alteraciones de los alimentos por origen microbiano (Frazier & Westhoff, 2003).

Por lo antes expuesto, la presente investigación permitirá conocer en menor tiempo de análisis la prevalencia de patógenos del género *Vibrio* en productos pesqueros de origen marino. Con los resultados obtenidos, se podría levantar una línea base, conteniendo la incidencia y el espectro de estas infecciones. Esto es especialmente importante para crear conciencia entre los responsables políticos de implementar programas de prevención efectivos, incluyendo saneamiento y optimización de la seguridad alimentaria. Esto contribuiría a la optimización del uso de los recursos, lo cual permitirían crear cultura y coadyuvar a consolidar el derecho de los pueblos de alimentarse de forma saludable. Esta es una política estatal consagrada en la normativa sobre soberanía alimentaria en el Ecuador con el fin de garantizar la seguridad, calidad nutricional y la inocuidad de los alimentos que expenden en el país.

1.3.- OBJETIVOS

1.3.1.- OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia de bacterias patógenas del género *Vibrio* spp. en el camarón de comercio minorista en mercados del cantón Manta, mediante PCR a tiempo real.

1.3.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar los centros de expendio de camarón mediante la norma NTE INEN 2687:2013 Mercados saludables.
- Identificar mediante la técnica PCR a tiempo real, la prevalencia de bacterias potencialmente patógenas *Vibrio cholerae*; *V. vulnificus*; *V. parahaemolyticus* en camarón de comercio minorista del cantón Manta.

1.4.- PREMISA

Considerando datos históricos, registrados en muestras de camarón expendido en mercados minoristas de Ecuador, es probable que exista la presencia de bacterias patógenas *Vibrio cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* en muestras de camarón expendido en comercios minoristas de mercados en el cantón Manta.

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.-VIBRIO

Los *Vibrios* son bacterias gramnegativas, en forma de varillas pequeñas, rectas, como un bastón curvilíneo o en forma de coma, con un único flagelo polar que permite que la mayoría sean motrices. Son anaerobios facultativos capaces de realizar un metabolismo respiratorio fermentativo. Todos son quimioorganotrofos; en su mayoría pueden crecer en un medio mineral que contenga D-glucosa como única fuente de carbono y NH^+ como única fuente de nitrógeno. Fermentan y utilizan D-fructosa, maltosa y glicerol; son oxidasa y catalasa positivos, y reducen el nitrito a nitrato (Farmer, Janda, Brenner, Cameron & Birkhead, 2015; Jones, 2017).

En su mayoría, los *Vibrio* spp. son halófilos, principalmente acuáticos, presentes de forma natural en mares, estuarios y ambientes de agua dulce, siendo considerados como uno de los grupos de bacterias cultivables más abundantes en los océanos. La presencia y distribución de *Vibrio* spp. depende de una variedad de factores ambientales como la temperatura, concentración de sal, pH y nutrientes (Doyle & Buchanan, 2012 ; Farmer, 2015; Jones, 2017).

De hecho, las densidades de *Vibrio* spp. tienden a desarrollarse en aguas más cálidas, según lo indicado por Vezzulli, Pezzati, Brettar, Höfle & Pruzzo (2015). Además, especies de este género a menudo se aíslan de las aguas costeras, los sedimentos marinos, en el contenido intestinal de animales marinos y los productos pesqueros (Doyle & Buchanan, 2012 ; Jones, 2014).

Se indica que en el género *Vibrio* se identifican casi 100 especies (Janda, Newton & Bopp, 2015), y al menos una docena son reconocidos como patógenos humanos. Estos últimos, incluyen *V. parahaemolyticus*; *V. vulnificus*; *V. alginolyticus*; *V. cholerae*; *V. mimicus*; *V. cincinnatiensis*; *V. fluviales*; *V. harveyi*

y *V. metschnikovii*. Ocasionalmente, se han asociado con enfermedades transmitidas por alimentos en humanos, específicamente *V. cholerae*; *V. vulnificus*; *V. parahaemolyticus* (Jones, 2014; Robert-Pillot, Copin, Himber, Gay & Quilici, 2014). Estos últimos se consideran de mayor preocupación debido a que pueden plantear problemas de salud pública como agentes de infecciones esporádicas o colectivas asociados al consumo de pescados o mariscos (Kriem et al., 2015).

2.1.1. *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae es agente causante de cólera, enfermedad transmitida por los alimentos con epidemia y pandemia potencial (Doyle & Buchanan, 2012). Estudios realizados por Ali et al. (2015) estimaron la carga global del cólera en 2,86 millones de casos anuales en países endémicos, siendo la tasa de incidencia de riesgo promedio anual de 2,30 casos por cada 1000 habitante (Ali, Nelson, Lopez & Sack, 2015).

Vibrio. cholerae tiene forma de barras curvas o rectas con un solo flagelo polar, inclusive la característica más definitoria es su capacidad de crecer en ausencia de sal, aunque lo óptimo de concentración para el crecimiento es de 5 a 10 ppm, y respecto a la temperatura el valor oscila entre 35° a 40°C (Jones, 2014). Además, a este patógeno se lo clasifica en dos biotipos, El TOR (llamado así porque se describió por primera vez en la estación de cuarentena de El Tor, en la península del Sinaí, Egipto) y el clásico (Ramamurthy & Nair, 2014).

2.1.2. *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus, es un agente de intoxicación alimentaria asociado al consumo de mariscos en muchos países del mundo, que generalmente ocasiona gastroenteritis en humanos, septicemia e infección de heridas (Villa et al., 2017). Esta bacteria crece en concentraciones de sal entre 20 a 25 ppm, y temperatura de 30° a 35°C. De hecho, tiene la capacidad para metabolizar el etanol a bajas concentraciones (Jones, 2014). Los factores de virulencia identificados para *V.*

parahaemolyticus son hemolisina directa termoestable (TDH) y hemolisina relacionada con THD (TRH) (Jones, 2017).

2.1.3. *Vibrio vulnificus*

Vibrio vulnificus es un patógeno transmitido por mariscos, que se distingue de otros miembros del género *Vibrio* por su habilidad de fermentar lactosa, siendo capaz de crecer en concentraciones del 6%, y detener el desarrollo en 8% de NaCl. Está ampliamente distribuido en ambientes costeros cálidos, pudiendo aislarse de aguas marinas y estuarinas, sedimentos, plancton, diversos moluscos y crustáceos (Karunasagar, 2014; Oliver, 2015; Baker-Austin & Oliver, 2018).

Las infecciones identificadas en los alimentos resultan casi exclusivamente del consumo de moluscos crudos o poco cocidos. La enfermedad inicia entre las 12 y 24 h posteriores a la ingesta de mariscos, presentando síntomas como gastroenteritis leves en pacientes sanos. Sin embargo, con un individuo susceptible, la enfermedad puede avanzar rápidamente en una enfermedad sistémica potencialmente mortal (Jones, 2014).

2.2.- INOCUIDAD EN MERCADOS DE EXPENDIO MINORISTA

Según la norma INEN 2687, los mercados son sitios de compra y venta de alimentos que cuentan con infraestructura fija y cerrada. Estos mercados deben cumplir con requisitos y prácticas para comercializar alimentos inocuos para el consumo humano (INEN 2687, 2013). Estrada-García et al., (2005) realizaron estudios sobre venta de alimentos preparados con mariscos en mercados de México, donde obtuvieron como resultado la presencia de *Vibrio cholerae* y *V. parahaemolyticus*, revelando las malas condiciones sanitarias existentes en el sitio.

El GAD municipal del cantón Manta ejecuta y promulga ordenanzas públicas que regulan las actividades del comercio y otras en los mercados públicos, con el

objeto de mejorar los requisitos de servicio, ambientales e higiénicos (GAD Manta, 2009; 2010). Según FAO (2001), el camarón vendido en mercados internos de los países presenta diferencias en el tratamiento higiénico sanitario con respecto al producto destinado a mercados de exportación. Además, se realizó una evaluación de exposición de la *V. cholerae* en camarón, y concluye que existe riesgo de contaminación cruzada a través del agua o de la manipulación por portadores asintomáticos.

Un mercado saludable es un lugar que presenta y garantiza condiciones higiénicas en la comercialización de alimentos nutritivos e inocuos; además cumple los requisitos establecidos en la NTE INEN 2687. Dentro de sus ventajas, se tiene: mejoramiento en las ventas e ingresos económicos, en la calidad de los productos, evita las enfermedades transmitidas por alimentos, incorporación del control de alimentos (INEN 2687, 2013).

2.3.- PREVALENCIA DE *VIBRIO* SPP. EN CAMARÓN

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) ≥ 3 (Chen et al., 2010). A esto se puede agregar, además, una alta prevalencia de *V. parahaemolyticus* en camarones minoristas (Xu et al., 2014), y mariscos (Yu et al., 2016) y se identificaron cinco aislamientos positivos para la cepa *trh* y ninguno de los aislamientos fue positivo para la cepa *tdh* (Xu, et al., 2014).

En las ciudades de Ho Chi Minh y Hanoi, Vietnam se evidencia la presencia de *V. parahaemolyticus*; *V. navarrensis*; *V. alginolyticus*; *V. cholerae* non O1 y *V. vulnificus* como los más prevalentes (Tra et al., 2016; Yen et al., 2020). En el noreste de Italia la prevalencia de *Vibrio* spp. en crustáceos fue alta para *V. parahaemolyticus*; sin embargo, no se detectó la presencia de *V. cholerae* ni *V. vulnificus* (Caburlotto et al., 2016).

En Alemania se investigó la presencia de *Vibrio* spp. en expendios minoristas de mariscos de diferentes regiones geográficas, demostrando su alta prevalencia en camarones y mejillones (Huehn et al., 2014). Adicionalmente, en Berlín, se determinó la prevalencia de *Vibrio* spp. en mariscos crudos, camarones y bivalvos de supermercados y tiendas de productos del mar. De las muestras analizadas, la prevalencia de *Vibrio* spp. en camarones fue ligeramente superior que en bivalvos (Vu, Alter & Huehn, 2018).

En Ecuador se obtuvieron resultados positivos para la presencia de *Vibrio* spp. (Sperling, Alter, & Huehn, 2015); es así, que el portal Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF, por sus siglas en inglés) publica alertas de presencia de *V. parahaemolyticus*; *V. vulnificus* y *V. algenolyticus* en camarones crudos congelados en países de la Comunidad Europea provenientes del Ecuador durante el periodo 1999 al 2019.

2.4.- HERRAMIENTAS DE DIAGNÓSTICO Y ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE Q PCR

2.4.1.-DETERMINACIÓN DE *Vibrio* POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL O CUANTITATIVA (qPCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como concepto, fue descrito por primera vez por Panet y Khorana en los años 70; sin embargo, quien desarrollo la técnica fue Kary Mullis y sus colaboradores en el año 1983. Consiste en una amplificación exponencial de un fragmento de ADN, y su principio se basa en el mecanismo de replicación de ADN *en vivo* (Maurer, 2006; Rodríguez-Lázaro, 2013).

La PCR pasó de ser una técnica para laboratorios de investigación a laboratorios de diagnóstico en todo el mundo, debido a su versatilidad, especificidad y sensibilidad. Como conclusión, la PCR se utiliza con mucho éxito en laboratorios

de microbiología de alimentos para identificación de microorganismos (Maurer, 2006; Rodríguez-Lázaro, 2013).

La PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR) produce de manera simultánea la amplificación y detección, representando un avance significativo en el análisis de ADN; mediante el uso de la fluorescencia los datos se recopilan durante todo el proceso de PCR en tiempo real y, los resultados de qPCR se cuantifican en curvas de amplificación. Como ventajas de qPCR, se tiene: formato de tubo cerrado, análisis rápido y fácil de realizar, el intervalo dinámico de cuantificación es extremadamente amplio, es una técnica fiable y sensible (Kralik & Ricchi, 2017). Las aplicaciones de la qPCR, son variadas, pudiéndose resaltar las siguientes: Detección, cuantificación y control de patógenos; alternativa rápida a los métodos convencionales (Rodríguez-Lázaro, 2013; Uyttendaele et al., 2014).

La detección de *vibrios* patógenos se realiza mediante los métodos oficiales o de referencia, los cuales se basan en técnicas con agar, además requieren confirmación mediante pruebas bioquímicas (Doyle & Buchanan, 2012; Rodríguez-Lázaro, 2013). En la actualidad, se cuenta con métodos moleculares (PCR y qPCR) para analizar muestras de alimentos y ambientales en busca de diferentes *Vibrio* spp. potencialmente patógenas como *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* (Españeira, Atanassova, Vieites & Santaclara, 2010; Rodríguez-Lázaro, 2013; Garrido-Maestu et al., 2014; Ahmed, Rafiqzaman, Hossain, Lee & Kong, 2016; Greig et al., 2018; Liu et al., 2019). En el mercado mundial existen sistemas automatizados con tecnologías de amplificación de ADN unido a espectrofluorimetría láser (Martín de Santos, 2010).

El sistema BAX Hygiene combina esta tecnología (Martín de Santos, 2010); es un instrumento para detección de *vibrio* potencialmente patógenos por PCR, el cual crea rápidamente millones de copias de fragmentos de ADN, cuenta con reactivos como cebadores, enzima polimerasa, nucleótidos, control positivo e intercalador fluorescente, incorporado en una tableta. Dentro de sus ventajas se puede mencionar que presenta: reducción de horas de trabajo, minimiza el

potencial de contaminación cruzada, además lo hace en un sistema simple de tres pasos donde carga las muestras preparadas, corre el programa y lee resultados en la pantalla.

2.4.2.- TIPOS DE CAMARÓN QUE SE EXPENDEN EN LOS MERCADOS DE MANTA

La pesquería artesanal de camarón está dirigida a la captura de especies como pomada (*Protrachypene precipua*), cebrá (*Trachypenaeus byrdi*), blanco (*Penaeus vannamei*, *P. sylirostris* y *P. occidentalis*) y titi (*Xiphopenaeus riveti*) (Nicolaidis, Mendívez, García-Sáenz & Chicaiza, 2014). La especie más común *Penaeus vannamei*, forma parte del grupo conocido comercialmente como camarón blanco (Cedeño, 1974). Estos tipos de camarones son desembarcados en los puertos pesqueros artesanales y comercializados al por menor en los mercados. En los mercados de Manta también se observa la venta de camarón procedente de instalaciones de cultivo, que se puede reconocer del procedente de la pesca desde barcos arratrereros por tener menor talla. El camarón de cultivo es *P. vannamei*, del cual se exportaron en 2019 unas 645 mil toneladas (CNA, 2020).

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1.- UBICACIÓN

La investigación se efectuó en el cantón Manta en los mercados: 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 A&G, Empresa La Fabril S. A., acreditado bajo la norma NTE INEN ISO IEC 17025, ubicado en el kilómetro cinco y medio, vía Manta-Montecristi, 0°59'33.9"S 80°41'29.4"W.

3.2.- DURACIÓN

El desarrollo experimental de la investigación se realizó desde noviembre de 2019 hasta abril de 2020 con una duración de 6 meses.

3.3.- MÉTODOS, TÉCNICAS

3.3.1.- MÉTODOS

Bibliográfico: Este trabajo de investigación permitió realizar la recopilación de citas bibliográficas a través de libros y artículos científicos indexados relacionados con la temática de estudio.

Exploratorio: La propuesta de investigación brindó un primer acercamiento para identificar la prevalencia de *Vibrio cholerae*; *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en muestras de camarón de comercio minorista; lo que permitió relacionar la presencia o ausencia de estos agentes patógenos en los mercados del cantón Manta. Así mismo, se efectuaron entrevistas a los Administradores en la que se utilizó una lista de verificación fundamentada en la norma NTE INEN 2387:2013, (INEN 2687, 2013), la que se aplicó a los responsables de los mercados para

identificar su probable origen y las fases por las que pudo haber atravesado durante la cadena de comercialización, con el propósito de detectar eventuales fuentes de contaminación bacteriana y rupturas de la cadena de frío.

Descriptivo: La propuesta de investigación determinó la prevalencia del género *Vibrio* spp. empleando el método molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa (qPCR) cuantitativa, y con ello se determinó las especies patógenas *Vibrio cholerae*; *V. parahaemolyticus*, y *V. vulnificus* en muestras de camarón de comercio minorista en el cantón Manta.

3.3.2.- TÉCNICAS

Las técnicas que se realizarán en esta investigación son:

Para caracterizar los mercados de comercio minorista de camarón en el cantón Manta se utilizó una lista de verificación, donde se realizaron comprobaciones rutinarias para recolectar datos relacionados con los requisitos establecidos en la norma NTE INEN 2887 Mercados saludables (INEN 2687. 2013).

Para la detección *Vibrio cholerae*; *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, se realizó PCR cuantitativa en tiempo real. Esta es una técnica de laboratorio simple, versátil, sensible, específica y reproducible basada en el principio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La técnica consiste en una amplificación exponencial de un fragmento de ADN, donde una máquina (q) PCR y un colorante fluorescente en una reacción de PCR se une a su producto genético amplificado y le da un número de ciclos necesarios para que cada curva alcance un umbral en la señal de fluorescencia, valor Ct. Esta última es proporcional a la cantidad de ADN en su reacción dependiendo de los patrones utilizados (Rodríguez-Lázaro, 2013).

3.4.- VARIABLES EN ESTUDIO

3.4.1.- VARIABLE INDEPENDIENTE

Muestras de camarón de tres mercados del cantón Manta.

3.4.2.-VARIABLE DEPENDIENTE

Prevalencia de *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*,

3.5.- PROCEDIMIENTO

3.5.1. CARACTERIZACIÓN DEL CENTRO DE EXPENDIO MENOR DE CAMARÓN MEDIANTE LA NORMA NTE INEN 2687:2013 MERCADOS SALUDABLES

Se calificó los mercados mariscos Playita Mía; Central de Manta y Parroquial Eloy Alfaro, 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). Se midió el grado de cumplimiento de las prácticas de comercialización en función de los requisitos sanitarios.

3.5.2.- DETECCIÓN DE *Vibrio cholerae*; *V. vulnificus*; *V. parahaemolyticus* EN CAMARÓN DE COMERCIO MINORISTA DEL GAD MUNICIPAL DEL CANTON MANTA

Las muestras de camarón de expendio menor se recolectaron y enviaron al laboratorio siguiendo las recomendaciones de la NTE INEN 1529-2:1999 (INEN 1529-2, 1999), la toma de las muestras se realizó en condiciones asépticas, con rapidez, pero cuidadosamente, y de manera representativa. El tamaño de muestra fue de mínimo de 100 g de camarón. Las muestras se enviaron al laboratorio lo más rápido posible y en condiciones que reduzcan al mínimo la posibilidad de cambio de la calidad microbiológica, inclusive se evitó que durante el transporte sean expuestas a luz directa.

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 (ICMSF, 2011; p. 429), donde $n=10$ (número de unidades de muestras a analizar); $c=0$ (número máximo de resultados positivos permitidos). Se realizaron tres replicas. El total de muestras fue calculado como se muestra en Tabla 1 :

Tabla 1
Detalle de la cantidad de muestras

Microorganismo patógeno	Número de mercados seleccionados	Número de muestras por mercado	Frecuencia de toma de muestra (semanas)	Total
<i>V. cholerae</i> ; <i>V. vulnificus</i> ; <i>V. parahaemolyticus</i>	3	10	3	90

Nota. Fuente: Autor de la investigación

En la preparación de la muestra de camarón de expendio menor se utilizaron las recomendaciones de la NTE INEN-ISO 6887-3 (INEN-ISO 6887-3, 2014); que indica quitar el exoesqueleto del crustáceo y cortar la carne en trozos, mezclar en un homogeneizador rotatorio y se añade la cantidad necesaria de diluyente para obtener una dilución 1 en 9.

Para la detección de *Vibrio* spp. potencialmente patógeno (*V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*) en camarón de comercio minorista, se efectuó el ensayo microbiológico molecular q PCR reacción en cadena de la polimerasa, método 050902 del Instituto de Investigación de la Asociación Oficial de Químicos Agrícolas (AOAC RI, por sus siglas en inglés) (Hoelzer et al., 2013).

3.6.-TÉCNICAS ESTADÍSTICAS

Para el análisis estadístico de las variables en estudio se llevó a cabo las siguientes pruebas:

Para comparar las diferencias de nivel de cumplimiento de la norma NTE INEN 2387:2013, (INEN 2687, 2013) 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 que las varianzas resulten heterógenas, se aplica una prueba de varianza no paramétrica Kruskal-Wallis con su correspondiente prueba a posteriori.

Los resultados de las pruebas microbiológicas de prevalencia de *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* fueron calculados como porcentajes con el correspondiente intervalo de confianza de 95%. La prevalencia de cada bacteria se comparó mediante una prueba chi cuadrado. Los cálculos se efectuaron empleando el programa MS Excel® 2016.

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. Para el procesamiento de los datos se utilizó el software IBM-SPSS versión 22.

3.6.1.- 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.

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- CARACTERIZACIÓN DE LOS CENTROS DE EXPENDIO DE CAMARÓN MEDIANTE LA NORMA NTE INEN 2687:2013 MERCADOS SALUDABLES

Dentro de la caracterización se aplicó una lista de verificación conforme a la norma NTE INEN 2687:2013 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 2). El porcentaje global de todos los mercados (48.8%) se encontró por debajo del mínimo esperado (70.0%), (Anexo 1) Aplicación de una lista de verificación conforme a la norma NTE INEN 2687:2013.

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%) al de los otros dos mercados que no difirieron entre si (47.7 y 68.8%), para Playita Mía y Central de Manta, respectivamente).

Tabla 2
Cumplimiento de requisitos de INEN 2687 en mercados de comercio minorista de camarón en Manta, Ecuador, establecidos en porcentaje (%).

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

Nota. Fuente: Autor de la investigación

4.1.1.- REQUISITOS RELATIVOS A LA INFRAESTRUCTURA

La infraestructura es un conjunto de locales e instalaciones físicas donde se desarrolla una actividad comercial. En general, 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, mezones y techos, entre otros. Sin embargo, tanto el mercado de Playita Mía como Eloy Alfaro evidenciaron deficiencias en su infraestructura alejándose al cumplimiento de la norma NTE INEN 2687:2013, (Anexo 2) Requisitos relativos a la infraestructura.

4.1.2.- REQUISITOS RELATIVOS A LOS SERVICIOS

Los servicios son recursos con los que dispone un mercado para su funcionamiento diario. El promedio entre el mercado Central de Manta y Playita Mía (72.7%) permite corroborar el cumplimiento de la norma NTE INEN 2687:2013. No obstante, el mercado Eloy Alfaro no dispone de las características establecidas en dicha norma para la operatividad, (Anexo 3) Requisitos relativos a los servicios.

4.1.3.- REQUISITOS RELATIVOS A LOS EQUIPOS Y UTENSILIOS

Los equipos y utensilios son el conjunto de herramientas que se emplean para la manipulación de alimentos. Entre los mercados Central de Manta y Playita Mía registran un promedio del 86,7% de cumplimiento de requisitos. Al contrario de lo expuesto, en el mercado Eloy Alfaro persiste el incumplimiento de los requisitos establecidos en la normativa referida en cuanto al uso de equipos y utensilios, (Anexo 4) Requisitos relativos a los equipos y utensilios.

4.1.4.- REQUISITOS RELATIVOS AL PUESTO DE COMERCIALIZACIÓN

Puesto de comercialización o puesto de venta es el espacio o lugar donde se exhiben y expenden productos alimenticios. Los mercados Central de Manta y Playita Mía tienen un promedio de cumplimiento del 81.6%. Cabe indicar, que aunque los dos mercados antes mencionados cumplen con la norma referida, estos no evidenciaron en la visita in situ que los camarones estaban exhibidos y protegidos en vitrinas refrigeradas. En contraparte, el mercado Eloy Alfaro registro deficiencias en este requisito, (Anexo 5) Requisitos relativos al puesto de comercialización.

4.1.5.- REQUISITOS DE HIGIENE DEL COMERCIANTE DE ALIMENTOS

El comerciante de alimentos se considera, a toda persona que tiene contacto directo con los productos alimenticios y efectúa su venta. En los mercados evaluados se identificó el incumplimiento general del certificado de salud de los trabajadores, vestimenta, aseo de manos, higiene y prácticas del manipulador de alimentos, (Anexo 6) Requisitos de higiene del comerciante de alimentos.

4.1.6.- REQUISITOS RELATIVOS A LA LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN

La limpieza es la remoción de la suciedad y la desinfección es aquella, en la que se eliminan los microorganismos. El programa de limpieza, el uso de productos químicos y el almacenamiento se cumple sólo en el Mercado Central (100.0%), al contrario de lo antes descrito, se observa que los mercados Playita Mía y Eloy Alfaro incumplen con estos requisitos, (Anexo 7) Requisitos relativos a la limpieza y desinfección.

4.1.7.- REQUISITOS RELATIVOS AL CONTROL DE PLAGAS

El control de plagas es práctica de regulación y manejo de especies que perturban la salud pública. Se observa, que el mercado Eloy Alfaro incumple con las disposiciones establecidas en la norma NTE INEN 2687:2013, 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.

4.1.8.- REQUISITOS RELATIVOS A CAPACITACIÓN

La capacitación se la define como el grupo de acciones didácticas, direccionadas a mejorar los conocimientos, habilidades y aptitudes del comerciante de alimentos. Los mercados evaluados registran un promedio del 39.4% de cumplimiento. No obstante, el porcentaje obtenido no alcanza el mínimo esperado del 70.0%, aunque el mercado Eloy Alfaro evidencia incumplimiento total en este requisito.

4.1.9.- REQUISITOS RELATIVOS AL CONTROL Y ASEGURAMIENTO DE LA INOCUIDAD

El control y aseguramiento de la inocuidad son procedimientos que previenen los efectos evitables y disminuyen los defectos inevitables que significan un riesgo para la salud de la población, los cuales pueden variar según el tipo de alimento. Es evidente que los mercados de Playita Mía, Eloy Alfaro y Central de Manta, no cumplen con Supervisión, responsable(s) de la supervisión y con el Programa de control y aseguramiento de la inocuidad.

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. Es así, que Schlottfeldt, Rodríguez, Herrera, Rosales & Franco, (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.

4.2.- PREVALENCIA DE *V. CHOLERAE*; *V. PARAHAEMOLYTICUS*; *V. VULNIFICUS* EN MUESTRAS DE CAMARÓN DE EXPENDIO MENOR

Para el estudio de prevalencia realizadó en tres mercados de expendio menor del Cantón Manta (Acápite 3.1). Se recolectaron 84 muestras de camarón fresco.

Los resultados de prevalencia de *Vibrios* spp. potencialmente patógenos en los mercados Central de Manta, Playita Mía y Eloy Alfaro no difieren significativamente entre mercados para las las tres especies de *Vibrio* spp. (Prueba de Chi cuadrado, $p > 0,05$), (Tabla 3), (Anexo 8) Prueba Chi cuadrado.

Tabla 3
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	0.0	

Nota. Fuente: Autor de la investigación

La prevalencia de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* discrepan con los límites microbiológicos de la Norma INEN 456 (2013), la cual establece que dichos patógenos no deben ser detectados, tanto en camarones y langostinos crudos como congelados.

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%. Al respecto, Ndip, Akoachere, Mokosso, Ndip & Anyangwe, (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. 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, Serralta-Peralta, Hernández Gómez, Sosa-Castilla & Castillo-Cocom, (2015) no reportan prevalencia de *V. cholerae* en productos marinos en México.

Se observa 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) en un estudio de la distribución actual de *V. cholerae* en los océanos del mundo, encuentran que la concentración de clorofila *a*, el pH y la temperatura superficial del mar explican de mejor manera la distribución del potencial patógeno, y encuentran que las costas de América Latina presentan condiciones favorables y semejantes a las de Bangladés 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 prevalencia de *V. parahaemolyticus* del 48.3% en camarones, aunque la prevalencia en bivalvos, particularmente en ostras, fue mayor (63.4%).

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 observa prevalencias de 66.7% y 57.9% en Yakarta. Por su parte, en China Xu et al. (2014) determinan que en camarones vendidos por minoristas se encuentra una prevalencia de 37.7%. Además, estudios de Silva et al. (2018) encuentran 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 identifican un 31.1% de prevalencia de este *vibrio*.

También Sperling et al. (2015) reportan valores de 80.8% de prevalencia en camarón de expendios minoristas y granjas de Ecuador, lo cual puede relacionarse con el reporte de Berry, Park & Lightner (1994), quienes encuentran una prevalencia de 36.7% en camarones crudos importados por Estados Unidos procedentes de Ecuador. Entre los estudios que reportan valores menores de prevalencia de *V. parahaemolyticus* en camarones, están los de Abd-Elghany & Sallam (2013) quienes indican una prevalencia de 16.7% en mercados de la ciudad de Mansoura, Egipto; Eja et al. (2008) quienes examinan la prevalencia de este *vibrio* en mariscos de Nigeria y observan 13.6%; y Zarei, Borujeni, Jamnejad & Khezrzadeh, (2012) quienes reportan prevalencia de 7.1% en camarones de expendio en mercados de Irán.

Esta generalidad de la presencia de *V. parahaemolyticus* en muestras de camarones expendidos 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) reportó prevalencia de *V. vulnificus* de 12.6% en camarones consumidos en Francia, mientras que Vu et al. (2018) encuentran prevalencias de 1.3% en camarones de ventas de minoristas en Berlín, Alemania.

Trabajos realizados por Elhadi, Radu, Chen & Nishibuchi, (2004) encuentran prevalencia de 6.0% en camarones obtenidos en los mercados y supermercados de Malasia. De igual forma, Koralage et al. (2012) observan un 2.4% de prevalencia en camarones pre cosechados en una provincia al Noreste de Sri Lanka. De igual forma, Tra et al. (2016) investigaron la prevalencia de camarones en mercados minoristas en Hanoi, Vietnam, encontrándola en 1.5%.

También, Sperling et al. (2015) reportaron valores de 3.5% de prevalencia en camarón de expendios minoristas y granjas de Ecuador, mientras que 10.0% de prevalencia ha sido reportado 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 *V. vulnificus* entre los camarones procedentes de China (Berry et al., 1994).

Se deduce de los estudios antes citados, que la prevalencia de *V. vulnificus* es menor en crustáceos que otras especies de *Vibrio*. 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 este microorganismo.

CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1.- CONCLUSIONES

- El cumplimiento de la norma NTE INEN 2687 “Mercados Saludables”, por los mercados Central de Manta, Playita Mia y Eloy Alfaro en 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 norma NTE INEN 2687 “Mercados Saludables”, con un 68% en el global de los requisitos, mientras que el mercado informal de Eloy Alfaro, tuvo el menor cumplimiento (5.9%).
- El mayor incumplimiento de la norma NTE INEN 2687 “Mercados Saludables”, 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 en Manta.
- Entre las tres especies de *Vibrio* detectadas, *V. cholerae* mostró la prevalencia promedio más alta (69.7%), sin diferencias significativas entre los tres mercados. *V. parahaemolyticus* alcanzó una prevalencia promedio de 49.2%, mientras que *V. vulnificus* una prevalencia baja (10.0 y 3.3%)

5.2.- RECOMENDACIONES

- Para determinar la presencia o ausencia de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, con el método AOAC RI N°050902, utilizar agua de peptona alcalina en concentraciones de 10g de peptona y 10g de NaCl por litro, ajustando el pH luego de la esterilización a 8.5 ± 0.2 .
- Se deben implementar alianzas estratégicas entre los GAD Municipales, Ministerio de Salud Pública e Instituciones de Educación Superior y/o Centros de Investigaciones, para dar cumplimiento al artículo de inocuidad y seguridad alimentaria número 281 de la Constitución Política del Ecuador, que trata de los derechos de soberanía alimentaria para el control y aseguramiento de la calidad e inocuidad de los productos marinos que se expenden en los mercados minoristas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abd-Elghany, S. M., & Sallam, K. I. (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>
- Ahmed, R., Rafiqzaman, S. M., Hossain, M. T., Lee, J.-M., & Kong, I.-S. (2016). Species-specific detection of *Vibrio alginolyticus* in shellfish and shrimp by real-time PCR using the groEL gene. *Aquaculture International*, 24(1), 157–170. <https://doi.org/10.1007/s10499-015-9916-5>.
- Ali, M., Nelson, A. R., Lopez, A. L. & Sack, D. A. (2015). Updated Global Burden of Cholera in Endemic Countries. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(6), e0003832. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003832>.
- Aspiazu-Miranda, E. P, Granda-Barba, Y. M. & Mosquera-Herrera, C. E. (2017). Implementation of a multiplex PCR for the diagnosis of *vibrio cholera*, in quality control of export shrimp. *Dominio de las Ciencias* 3 (4), 369-380.
- Baker-Austin, C. & 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., & 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>
- Caburlotto, G., Suffredini, E., Toson, M., Fasolato, L., Antonetti, P., Zambon, M. & Manfrin, A. (2016). Occurrence and molecular characterisation of *Vibrio parahaemolyticus* in crustaceans commercialised in Venice area, Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 220, 39-49. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.007>.
- CDC (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades). 2006. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food—10 states, United States, 2005. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 55:392-395.

- CDC (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades). 2007. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food—10 states, United States, 2006. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 56:336-339.
- CNA. (2020). Exportaciones de camarón ecuatoriano durante el periodo 2010-2019. *Revista Acuicultura*. Cámara Nacional de Acuicultura, Guayaquil, Ecuador, 133, 60.
- Cobo-Cedeño, M. C. (1974). El cultivo del camarón en el Ecuador. SE/32 *En: FAO Actas del Simposio sobre Acuicultura en América Latina*. Volumen 1 – documentos de investigación. Montevideo, Uruguay, 26 de noviembre a 2 de diciembre de 1974. *FAO Inf. Pesca* (159) Vol. 1:374 p. FAO, Roma.
- Doyle, M. P. & Buchanan, R. L. (Eds.). (2012). *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. American Society for Microbiology Press.
- Chen, Y., Liu, X.-M., Yan, J.-W., Li, X.-G., Mei, L.-L., Ma, Q.-F. & 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. & Echeverría, A. (2014). Determinación por PCR en tiempo real de *Escherichia coli* en muestras de comida rápida. *La Granja*, 19(1), 44. <https://doi.org/10.17163/lgr.n19.2014.03>.
- Cremonesi, P., Pisani, L. F., Lecchi, C., Ceciliani, F., Martino, P., Bonastre, A. S. & 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. & Shafaie, A. (2000). A Review of Pathogenic *Vibrio* Infections for Clinicians. *Infect Med* 17 (10),:665-685.
- Eja, M. E., Ariba, C., Etok, C. A., Ikpeme, E. M., Arikpo, G. E., Enyi-Idoh, K. H., & 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., & 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., & 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>
- Espiñeira, M., Atanassova, M., Vieites, J. M. & Santaclara, F. J. (2010). Validation of a method for the detection of five species, serogroups, biotypes and virulence factors of *Vibrio* by multiplex PCR in fish and seafood. *Food Microbiology*, 27(1), 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.09.004>.
- Estrada-Garcia, T., Lopez-Saucedo, C., Arevalo, C., Flores-Romo, L., Luna, O. & Perez-Martinez, I. (2005). Street-vended seafood: a risk for foodborne diseases in Mexico. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(2), 69-70.
- FAO 2001. Consulta mixta FAO/OMS de expertos sobre la evaluación de riesgos asociados a los peligros microbiológicos en los alimentos: identificación de peligros, evaluación de exposición y caracterización de peligros de *Campylobacter* spp. en pollos para asar y *Vibrio* spp. en mariscos, Oficina Central de la OMS, Ginebra, Suiza, 23-27 de julio de 2001 (No. WHO/SDE/PHE/FOS/01.4).
- Farmer, J. J., Janda, J. M., Brenner, F. W., Cameron, D. N. & Birkhead, K. M. (2015). *Vibrio*. En *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1-79). <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01078>.
- Franco Monsreal, J., Serralta-Peralta, L. E. del S., Hernández Gómez, J. R., Sosa-Castilla, F., & Castillo-Cocom, J. A. (2015). Prevalencia de especies de importancia clínica del género *Vibrio* en alimentos marinos de origen animal de establecimientos de la ciudad y puerto de Progreso de Castro, Yucatán, México. *Medwave*, 15(05). <https://doi.org/10.5867/medwave.2015.05.6147>
- Frazier, W. C., & Westhoff, D. C. (2003). *Microbiología de los alimentos*. Acribia.
- Fleckenstein, J. M., Bartels, S. R., Drevets, P. D., Bronze, M. S. & 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>.

- GAD Manta (Gobierno Descentralizado del cantón Manta) 2009. Ordenanza sustitutiva que reglamenta el cobro del canon de arrendamiento de locales comerciales y el funcionamiento interno de los mercados municipales regenerados de la ciudad de Manta. Municipio del cantón Manta. Manta, Ecuador, 20 de noviembre del 2009.
- GAD Manta (Gobierno Descentralizado del cantón Manta) 2010. Ordenanza que regula las actividades del comercio y otras en las áreas adyacentes a los mercados públicos del cantón Manta. Municipio del cantón Manta. Manta, Ecuador, 13 de mayo del 2010.
- Garrido-Maestu, A., Chapela, M. J., Peñaranda, E., Vieites, J. M. & 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.
- Greig, D. R., Hickey, T. J., Boxall, M. D., Begum, H., Gentle, A., Jenkins, C., & Chattaway, M. A. (2018). A real-time multiplex PCR for the identification and typing of *Vibrio cholerae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 90(3), 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.11.017>.
- Havelaar, A. H., Kirk, M. D., Torgerson, P. R., Gibb, H. J., Hald, T., Lake, R. J. & Bellinger, D. C. (2015). World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLOS Medicine*, 23.
- Hoelzer, S., Wallace, M., Fleck, L., DiCosimo, D., Harris, J., Andaloro, B., Farnum, A., Davis, E. & Rohrbeck, J. (2013). BAX® System Real-Time PCR Assay for *Vibrio cholera*, *parahaemolyticus*, and *vulnificus*. AOAC® *Performance Tested*, license number, 050902. Wilmington, USA.
- Huamán Santos, E.E. y Zárate Murillo, W. (2019). Análisis situacional de las condiciones higienico-sanitarias del manipulador de alimentos en los mercados de abastos de Lima Cercado enero-junio 2017. Tesis de pregrado. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Norbert Wiener, Lima, Perú.
- Huehn, S., Eichhorn, C., Urmersbach, S., Breidenbach, J., Bechlars, S., Bier, N. & Strauch, E. (2014). Pathogenic vibrios in environmental, seafood and clinical sources in Germany. *International Journal of Medical*

Microbiology: IJMM, 304(7), 843-850.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.07.010>.

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 el análisis microbiológicos*. Instituto Ecuatoriano de Normalización, Quito.

INEN (2013a). *Norma Técnica Ecuatoriana INEN 456. Camarón o langostinos congelados*. Instituto Ecuatoriano de Normalización, Quito.

INEN (2013b). *Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1896. Pescados frescos refrigerados o congelados de producción acuícola*. Instituto Ecuatoriano de Normalización, Quito.

INEN (2013c). *Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2687. Mercados saludables*. Instituto Ecuatoriano de Normalización, Quito.

INEN (2014). *Norma Técnica Ecuatoriana INEN-ISO 6887-3. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 3: Reglas específicas para la preparación de pescados y productos de la pesca (ISO 6887-3:2003, IDT)*, Instituto Ecuatoriano de Normalización, Quito.

Janda, J. M., Newton, A. E. & Bopp, C. A. (2015). *Vibriosis*. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(2), 273-288. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.007>.

Jones, M. K. & 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. (2014). *Vibrio* | Introduction, Including *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and other *Vibrio* species. En Batt, C. A., & Tortorello, M. L. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 691-698). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00345-1>.

Jones, J. L. (2017). *Vibrio*. Chapter 11. *En*: Dodd C. E. R., Aldsworth, T, Stein, R.A., Cliver, D. O. & Riemann, H. P. (Eds.), *Foodborne Diseases (Third*

- Edition*) (pp. 243-252). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00011-5>.
- Karunasagar, I. (2014). Bacteria: *Vibrio vulnificus*. *En: Motarjemi, Y. (Ed.), Encyclopedia of Food Safety* (pp. 564-569). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00119-0>.
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>.
- Kriem, M. R., Banni, B., Bouchtaoui, H. E., Hamama, A., Marrakchi, A. E., Chaouqy, N., ... Quilici, M. L. (2015). Prevalence of *Vibrio* spp. In raw shrimps (*Parapenaeus longirostris*) and performance of a chromogenic medium for the isolation of *Vibrio* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 61(3), 224-230. <https://doi.org/10.1111/lam.12455>
- Koralage, M. S. G., Alter, T., Pichpol, D., Strauch, E., Zessin, K.-H., & 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>
- Liu, Y., Cao, Y., Wang, T., Dong, Q., Li, J. & 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>.
- Martín de Santos, R. (2010). Métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de los alimentos. *En: Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*. Recuperado de: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/1108> (consultado 14 oct 2019).
- Ndip, R. N., Akoachere, J.-F. T. K., Mokosso, D. K., Ndip, L. M., & 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), 146-159–159. <https://doi.org/10.4314/eamj.v79i3.8895>
- Maurer, J. (Ed.). (2006). *PCR methods in foods*. New York, NY: Springer.
- Mok, J. S., Ryu, A., Kwon, J. Y., Kim, B. & Park, K. (2019). Distribution of *Vibrio* species isolated from bivalves and bivalve culture environments along

the Gyeongnam coast in Korea: Virulence and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Food Control*, 106, 106697. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.06.023>.

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>

Nicolaidis, F., Mendívez, W., García-Sáenz, R., & Chicaiza, D. (2014). Pesca de la flota langostinera artesanal en el golfo de Guayaquil y Esmeraldas, Ecuador durante 2012. Informe Técnico No. 2017-7, Instituto Nacional de Pesca, Guayaquil, Ecuador. Recuperado de: <http://institutopesca.gob.ec/wp-content/uploads/2017/07/Langostino-Artesanal-2012.pdf> (consultado 14 oct 2019).

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. & Kaper, J. B. (2013). *Vibrio* Species. *Food Microbiology*, 401-439. <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch16>.

Oliver JD. 2015. The biology of *Vibrio vulnificus*, *Microbiol Spectrum* 3(3):VE-0001-2014. doi:10.1128/microbiolspec.VE-0001-2014.

Palomino-Camargo, C. & González-Muñoz, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(3), 535-546. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2014.313.93>.

Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J. & Sohier, D. (2011). Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*, 28(5), 848-861. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.008>.

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).

Ramamurthy, T. & Nair, G. B. (2014). Bacteria: *Vibrio cholerae*. En: Motarjemi, Y. (Ed.), *Encyclopedia of Food Safety* (pp. 546-554). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00117-7>.

- Raszl, S. M., Froelich, B. A., Vieira, C. R. W., Blackwood, A. D., & 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. & 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. & 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>.
- Salihah, N. T., Hossain, M. M., Lubis, H. & Ahmed, M. U. (2016). Trends and advances in food analysis by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Food Science and Technology*, 53(5), 2196-2209. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2205-0>.
- 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) (Master's thesis, Universidad Central del Ecuador, Quito).
- Schlottfeldt, Y. E., Rodríguez, M. A., Herrera, C, Rosales, M. A., & Franco, G (2010). Determinación de coliformes fecales y bacterias enteropatógenas en camarón comercializado en los principales mercados de la ciudad de Tapachula, Chiapas. *Higiene y Sanidad Ambiental*, 10: 523-526.
- Silva, B. C. J. D., Hossain, S., Dahanayake, P. S., Zoysa, M. D., & 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. & 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. & 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>.
- Tantillo, G. M., Fontanarosa, M., Pinto, A. D. & 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. & 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.
- Uyttendaele, M., Rajkovic, A., Ceuppens, S., Baert, L., Coillie, E. V., Herman, L., ... Imberechts, H. (2014). PCR Applications in Food Microbiology. En *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 1033–1041). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00246-9>.
- Vezzulli, L., Pezzati, E., Brettar, I., Höfle, M. & 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>.
- Villa, I. G., González, L. R., Garduño, M. G. S., Chávez, M. R. C., Reynoso, F. L., Espejo, I. A. A. & Chávez, A. S. (2017). Detección de *Vibrio parahaemolyticus* (tlh) y factores de virulencia en Ostión *Crassostrea virginica* en el Golfo de México. *Revista Bio Ciencias*, 4(6), 15. <https://doi.org/10.15741/revbio.04.06.03>.
- Vu, T. T. T., Alter, T. & Huehn, S. (2018). Prevalence of *Vibrio* spp. in Retail Seafood in Berlin, Germany. *Journal of Food Protection*, 81(4), 5.
- Xu, X., Wu, Q., Zhang, J., Cheng, J., Zhang, S. & 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>.

- Yen, N. T. P., Nhung, N. T., Van, N. T. B., Cuong, N. V., Tien Chau, L. T., Trinh, H. N., ... Carrique-Mas, J. (2019). Antimicrobial residues, non-typhoidal *Salmonella*, *Vibrio* spp. And associated microbiological hazards in retail shrimps purchased in Ho Chi Minh city (Vietnam). *Food Control*, 107, 106756. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106756>.
- Yu, Q., Niu, M., Yu, M., Liu, Y., Wang, D. & Shi, X. (2016). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail shellfish in Shanghai. *Food Control*, 60, 263-268. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.08.005>.
- Zarei, M., Borujeni, M. P., Jamnejad, A., & Khezrzadeh, 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>

ANEXO

ANEXO 1



a.- Mercado Central de Manta.



b.- Playita Mía.



c.- Mercado Parroquial Eloy Alfaro.

4.1.- Aplicación de una lista de verificación conforme a la norma NTE INEN 2687:2013.

ANEXO 2



a.- Mercado Central de Manta



b.- Playita Mía



c.- Mercado Parroquial Eloy Alfaro.

4.1.1.- Requisitos relativos a la infraestructura.

ANEXO 3



a.- Mercado Central de Manta



b.- Playita Mía



c.- Mercado Parroquial Eloy Alfaro.

4.1.2.- Requisitos relativos a los servicios.

ANEXO 4



a.- Mercado Central de Manta



b.- Playita Mía



c.- Mercado Parroquial Eloy Alfaro.

4.1.3.- Requisitos relativos a los equipos y utensilios.

ANEXO 5



a.- Mercado Central de Manta.



b.- Playita Mia.



c.- Mercado Parroquial Eloy Alfaro.

4.1.4.- Requisitos relativos al puesto de comercialización.

ANEXO 6



a.- Mercado Central de Manta.



b.- Playita Mia.



c.- Mercado Parroquial Eloy Alfaro.

4.1.5.- Requisitos de higiene del comerciante de alimentos.

ANEXO 7



a.- Mercado Central de Manta.



b.- Playita Mía.



c.- Mercado Parroquial Eloy Alfaro.

4.1.6.- Requisitos relativos a la higiene y desinfección.

ANEXO 8

Prueba de Chi cuadrado para la variable prevalencia de *Vibrio cholerae*; *V. parahaemolyticus*; *V. vulnificus*.

	Central de Manta	Playita Mía	Eloy Alfaro	TOTAL
<i>V. cholerae</i>	19	20	19	58
	11	10	5	26
	30	30	24	84
			$p =$	0.430

	Central de Manta	Playita Mía	Eloy Alfaro	TOTAL
<i>V. parahaemolyticus</i>	10	18	13	41
	12	12	11	43
	30	30	24	84
			$p =$	0.099

	Central de Manta	Playita Mía	Eloy Alfaro	TOTAL
<i>V. vulnificus</i>	3	1	0	4
	27	29	24	80
	30	30	24	84
			$p =$	0.207