

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**IDENTIFICACION DE VIBRIOS NO CÓLERA EN *ULVA* spp COLECTADA EN LA
PALOMA, ROCHA**

Por

LAMAS, Daiana

TESIS DE GRADO presentada como
uno de los requisitos para obtener el
título de Doctor en Ciencias
Veterinarias Orientación: Higiene,
Inspección-Control y Tecnología de
los Alimentos.
MODALIDAD: Estudio de Caso

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2020**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis aprobada por:

Presidente de mesa:



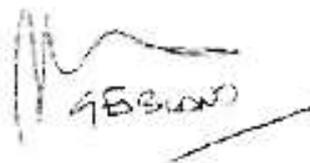
Dra. Cristina Friss de Kereki

Segundo Miembro (Tutor):



Dra. Carina Galli Cetraro

Tercer Miembro:



Dra. Graciela Fabiano

Co- tutor:



Dr. José Pedro Dragonetti Saucero

Fecha: 16 de diciembre de 2020

Autor:



Dalena Lamas

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi tutora la Dra Carina Galli por creer en mí y siempre apoyarme. Por estar en todo momento, haciéndose un lugarcito para ayudarme. Por compartir su hogar y su familia, en definitiva, por llevar la docencia con vocación y por brindarme su amistad.

Agradecer al Dr. José Pedro Dragonetti por sus consejos, experiencia y buena disposición, siempre.

También agradecer a los integrantes del instituto de Investigaciones Pesqueras por ser un gran grupo humano.

A los docentes por siempre tener una sonrisa y buena disposición.

A Gonzalo Chalela por su ayuda constante en los procesamientos de las muestras de algas en el laboratorio.

A la Dra Graciela Fabiano por su ayuda en la toma de muestras, sugerencias e información brindada.

A Heber por su amabilidad y buen humor cada vez que pasaba por portería a retirar un libro.

Y por siempre a mi familia y amigos por su apoyo incondicional y paciencia infinita.

LISTADO DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Tabla 1 Patologías causadas en humanos por infecciones por Vibrios.....	13
Figura 1 Mapa de la costa de La Paloma mostrando los sitios de muestreo.....	21
Figura 2. Identificación de vibrios no cólera.....	23
Gráfico1. Distribución de los diferentes vibrios aislados por zona de extracción....	24

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.
AGRADECIMIENTOS	2
LISTADO DE CUADROS Y FIGURAS	4
1.- RESUMEN.....	6
2.- SUMMARY.....	7
3.- INTRODUCCIÓN.....	8
4.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
4.1 ALGAS	9
4.1.1.- Definición de las algas	9
4.1.2.- Clasificación.....	9
4.1.3.- Hábitat.....	9
4.1.4.- Diferentes usos de las algas	10
4.1.5.- Producción	10
4.1.6.- Valor nutricional	11
4.1.7- <i>Ulva</i> spp.....	11
4.1.8- <i>Ulva</i> en Uruguay	12
4.2.- ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS (ETA).....	12
4.3.- VIBRIOS.....	13
4.3.1.- Antecedentes	13
4.3.2.- Generalidades	14
4.3.3.- <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	15
4.3.4.- <i>Vibrio vulnificus</i>	17
4.3.5.- <i>Vibrio alginolyticus</i>	18
4.3.6.- Métodos para el aislamiento e identificación	19
4.3.6.1.- Agar CHROMagar™ <i>Vibrio</i>	19
4.3.6.2.- API Índice Analítico de Perfil	19
5.- OBJETIVOS:	20
5.1.- Objetivos generales.....	20
5.2.- Objetivos particulares	20
6.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
6.1.- Recolección de muestras	21
6.2 Procesamiento de muestras	21
7.- RESULTADOS OBTENIDOS	23
8.- DISCUSIÓN	25
9.- CONCLUSIONES.....	26
10.- BIBLIOGRAFÍA.....	27

1.- RESUMEN

Esta tesis se focalizó en identificar la presencia de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio alginolyticus* en macroalgas del género *Ulva* en la Paloma, departamento de Rocha (Uruguay), así como se establecieron pautas para prevenir el crecimiento de estos vibrios en dichas algas poscosecha. *Ulva* spp. fueron extraídas de forma manual durante el período octubre 2018 y mayo 2019. Se utilizó C1HROMagar™ Vibrio para la detección de los vibrios no cólera. A las colonias características se les realizó test de oxidasa y las positivas se confirmaron por API 20 NE (Biomériux). En todas las muestras de algas recolectadas se encontró vibrios no cólera. El *Vibrio alginolyticus* se aisló de todas las muestras analizadas. Se aisló *Vibrio parahaemolyticus* en 18.2% de las muestras mientras que *Vibrio vulnificus* se identificó en un 13.6%. Se concluyó que existen condiciones propicias para el desarrollo de estos vibrios, registrándose por primera vez el hallazgo de *V. vulnificus* y *V. alginolyticus* en lechuga de mar en La Paloma. Se plantearon pautas para prevenir las vibriosis asociadas a macroalgas (*Ulva* spp.) en consumidores y manipuladores.

2.- SUMMARY

This thesis was focused on identifying the presence of Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus and Vibrio alginolyticus in macroalgae of the genus Ulva in La Paloma, department of Rocha (Uruguay), as well as establishing guidelines to prevent the growth of these vibrios in such post-harvest algae.

Ulva spp. were extracted manually in the period between October of 2018 and May of 2019. In order to detect non cholera vibrios, CHROMagar™ Vibrio was used. Characteristic colonies were sampled and picked to perform the oxidase test and positive colonies were confirmed by API 20 NE (Biomériux). Non-cholera vibrios were found in all collected algae samples. Vibrio alginolyticus was isolated from all samples tested. Vibrio parahaemolyticus was isolated in 18.2% of the samples while Vibrio vulnificus was identified in 13.6%. It was concluded that there are favourable conditions for the development of these vibrios, the finding of V. vulnificus and V. alginolyticus in sea lettuce in La Paloma being registered for the first time. Guidelines to prevent vibriosis associated to macroalgae (Ulva spp.) in consumers and handlers were proposed.

3.- INTRODUCCIÓN

La Paloma, en el departamento de Rocha, es uno de los destinos turísticos elegido por la población local y extranjera. La gastronomía es destacable en este departamento por su oferta en productos artesanales típicos como ser mariscos, pescados frescos, buñuelos de algas, entre otros.

La presencia de vibrios en los diferentes recursos hidrobiológicos es motivo de preocupación para la salud pública. Estos recursos son utilizados en restaurantes locales y puestos de comidas artesanales de esta zona del país siendo pasibles de contaminación cruzada, insuficiente refrigeración e inadecuada cocción.

En el 2015, Cortazzo y Pérez estudiaron los parámetros microbiológicos en algas del género *Ulva* sin encontrar *Vibrio* spp. en las muestras analizadas. Sin embargo, Olivera y Popovich (2017) y Dragonetti y col., (2018) reportaron resultados positivos para *Vibrio parahaemolyticus* en todas las placas sembradas.

Dada la severidad de los casos que año a año se producen durante el verano en la costa uruguaya sumado al subdiagnóstico de cuadros de gastroenteritis asociados al consumo de recursos pesqueros es necesario profundizar el estudio de la presencia de vibrios en dichos recursos hidrobiológicos. Así mismo, es incipiente la investigación, específicamente en lo atinente a los aspectos higiénico-sanitarios en *Ulva* spp.

4.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 ALGAS

4.1.1.- Definición de las algas

Las algas son un grupo muy diverso de organismos autótrofos, fotosintéticos de estructura simple que incluyen desde organismos unicelulares microscópicos hasta organismos multicelulares filamentosos simples o ramificados (Ibáñez y Herrero, 2017; Dreckmann 1998; Baldauf, 2003) que llegan a medir hasta 50 metros. Son talofitas (Quitral y col., 2012), poseen un talo en el que no se diferencian ni raíces, ni tallo, ni hojas, y son de origen polifilético. Presentan distintas formas de reproducción asexual y sexual que van desde la simple división celular hasta ciclos con alternancia de generaciones (Duran de Grau y Pascual., 1986).

4.1.2.- Clasificación

Según diferentes autores y los criterios adoptados, las algas se pueden clasificar de diversas formas. A modo de ejemplo teniendo en cuenta su tamaño se pueden diferenciar en:

Microalgas o Micrófitas: también conocidas como fitoplancton o plancton vegetal. Su tamaño oscila entre menos de un micrón hasta 2 mm. Se las encuentra tanto en ambientes naturales como artificiales (Negri y col., 2004)

Macroalgas o Macrófitas: miden desde unos pocos milímetros a decenas de metros viviendo adheridas a un sustrato (bentónicas) encontrándose en todos los continentes y durante todo el año pese a que la cantidad de algas es menor en los meses de otoño e invierno evidenciándose un marcado incremento en la primavera (Negri y col., 2004).

Las macroalgas son un grupo de algas marinas pluricelulares que se clasifican según su coloración en tres grupos: (Mendoza, 1999; Swamy, 2011 en Quitral y col., 2012).

- Algas Pardas (Phaeophyta o feófitas) corresponden a un grupo muy grande de algas marinas variando su pigmentación de amarillo pardo a pardo oscuro. Producen gran cantidad de un mucus protector.
- Algas Rojas (Rhodophyta o rodófitas) son el segundo grupo más grande de algas y son las más primitivas.
- Algas Verdes (Chlorophyta o clorofitas) se encuentran en menor número que las algas pardas y rojas y su pigmentación varía desde amarillo verdoso hasta verde oscuro).

4.1.3.- Hábitat

La distribución de las macroalgas es amplia ya que se las puede encontrar desde la zona intermareal superior hasta la submareal inferior (Mendoza, 1999) esto incluye

grietas, pozas de marea hasta lugares en la profundidad protegidas de la insolación y del golpe de la ola. Viven naturalmente arraigadas a un sustrato (roca, mejillones, arena, etc.) encontrándose influenciadas por diferentes factores como ser: cantidad y calidad de luz, temperatura, pH y salinidad del agua, así como el movimiento del agua y los nutrientes disponibles. Existen otros aspectos para tener en cuenta como la actividad que pueda ejercer tanto el hombre, como animales herbívoros sobre dichas poblaciones (Negri y col., 2004; Mendoza, 1999)

4.1.4.- Diferentes usos de las algas

Las algas presentan diversas aplicaciones constituyendo un recurso natural pasible de ser explotado (Gutiérrez y col., 2017; Negri y col., 2004). Se puede afirmar que más de la mitad de las especies de algas conocidas se usan como alimento (Quitral y col., 2012) o como ingrediente para conferirles sabor o propiedades nutritivas y benéficas para la salud (Ibañez y Herrero, 2017; McHugh, 2002). Se utilizan con fines medicinales y en diferentes industrias además de la alimentaria entre las que se destacan la industria de fertilizantes, textil y cosmética. Otra industria que destaca su uso es la farmacéutica con la obtención de yodo y diferentes ficocoloides, como el agar y el carragen de las algas rojas y los alginatos de las pardas (Barrios González y col., 2011; McHugh, 2002; Negri y col., 2004). Estos coloides también son empleados para la producción de pinturas, en bacteriología y odontología entre otros. También se las utiliza en la producción de combustibles. Por su contenido en carotenos se incorporan en la alimentación de las gallinas ponedoras y en canarios (Borazo de Zaixso y col., 2015; FAO, 2004).

Algunas algas son utilizadas como bioindicadoras de contaminación y depuradoras de ecosistemas acuáticos contaminados debido a su capacidad de absorber iones de metales pesados, como zinc y cadmio (Peña y col., 2005; FAO, 2004). Existen estudios que sugieren propiedades antimicrobianas de las macroalgas (Balaraman y col., 2013; Ravikumar y col., 2016).

Se las utiliza como alimento funcional ya que reduce el índice glucémico en las preparaciones en las cuales se añaden (Bravo, 2012 en Olivera y Popovich, 2017). Además, las algas poseen propiedades tecnológicas que permiten mejorar la calidad sensorial y nutritiva de alimentos cárnicos y pastas (Quitral, 2012).

4.1.5.- Producción

En 2016, el volumen total de plantas acuáticas (recolectadas del medio natural y cultivadas) fue de 31,2 millones de toneladas. La producción mundial de plantas acuáticas cultivadas, en la cual predominan las algas marinas, aumentó su volumen de 13,5 millones de toneladas en 2005 a más de 30 millones de toneladas en 2016. Este significativo crecimiento se debió al cultivo de diferentes especies de algas marinas tropicales en Indonesia quien aumentó su producción de casi 3,5 miles de toneladas en el 2010 a 11,6 miles de toneladas en el 2016 (FAO, 2018). Según estos datos podemos concluir que las macroalgas cultivadas representan un 96.4%

del total de la producción mundial y es la forma de producción que más aumenta anualmente.

China e Indonesia fueron los mayores productores y cultivadores de algas en el mundo en el 2016. Chile fue el único país por América del Sur con una producción de 15 mil toneladas. Las exportaciones de algas y otras plantas acuáticas para dicho año registró 1700 millones de USD (FAO, 2018).

El comercio de plantas acuáticas presentó un aumento de 940 millones de dólares desde 1976 a 2016 cuando se alcanzó más de 1000 millones de dólares. Los principales exportadores fueron Indonesia, Chile y la República de Corea y, los principales importadores China, el Japón y los Estados Unidos de América (FAO, 2018).

4.1.6.- Valor nutricional

El valor nutricional de las algas depende de factores tales como: especie, época del año, temperatura del agua, salinidad, entre otros. Las algas marinas presentan bajo contenido de calorías y lípidos, así como elevada concentración de proteínas, hidratos de carbono, fibra dietética, minerales y vitaminas.

El contenido de proteínas difiere según la especie de alga. En algas pardas, se ha reportado entre 3 y 15% en base seca, mientras que las algas verdes y rojas entre 10 y 47% (Lordan y col., 2011). De acuerdo con los requerimientos recomendados por la FAO y la OMS; las algas son una fuente importante de aminoácidos esenciales (Rajapakse y Kim, 2011).

Referente a los lípidos, presentan un bajo contenido, entre 1-5 % en base seca (Lordan y col., 2011, Van Ginneken y col., 2011). Cabe mencionar que existe un predominio de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, tales como los pertenecientes a las familias omega 3 y el omega 6 (Wang y col., 2013 en Gutiérrez y col., 2017). Van Ginneken y col., (2011) destacan que la baja relación omega 6/omega 3 presente en las algas, es beneficiosa para la salud humana.

Contienen importantes cantidades de vitaminas A, B1, B12, C, D, y E, riboflavina, niacina, ácido pantoténico y ácido fólico (Dhargalkar y Verlecar, 2009).

Poseen alto contenido de hidratos de carbono como polisacáridos estructurales, de almacenamiento y funcionales cuyo valor varía entre 20 a 76%. La proporción de fibra dietética puede variar de 36 a 60% en base seca de la cual aproximadamente el 55-70% es fibra dietética soluble (Rajapakse y Kim, 2011). Las algas tienen alta proporción de fibra soluble que le confiere un incremento en la sensación de saciedad, reduce la respuesta glicémica y presenta propiedades laxantes e hipocolesteromiantes (López Regueiro y col., 2013).

Presentan alto contenido de minerales, alrededor de un 36% en base seca, que incluye sodio, calcio, potasio, cloro, fósforo, yodo, hierro, zinc, cobre, selenio, molibdeno, flúor, manganeso, boro, níquel y cobalto. Además, aportan el requerimiento diario de yodo (150 Mg/día) (Rajapakse y Kim, 2011). También presentan una relación Na/K baja contribuyendo a disminuir la incidencia de hipertensión (Matanjun y col., 2009).

4.1.7- *Ulva* spp.

Las algas verdes del género *Ulva* crecen en zonas de la costa tanto intermareal como submareal de todos los océanos del mundo (Borazo de Zaixso y col., 2015). Así mismo al tolerar salinidades bajas pueden encontrarse en estuarios.

Las especies de *Ulva* tienen talos simples formados frecuentemente por una lámina translúcida de dos células de grosor. Estas capas pueden formar tubos huecos o quedar como simples filamentos de células (Borazo de Zaixso y col., 2015).

Se fijan al sustrato (rocas, mejillones, canto rodado u otros objetos) mediante un disco basal o filamentos rizoidales. Pueden alcanzar hasta 1 metro de altura y 50 cm de ancho cuando las condiciones son propicias como encontrarse adheridas al sustrato en fondos arenosos de aguas tranquilas (Díaz-Piferrer y López, 1959 en Chávez, 2017). Pueden resistir períodos largos de desecación. Su color varía desde verde claro a verde oscuro.

La reproducción ocurre mediante la liberación de células móviles flageladas que pueden ser sexuales (gametas) o asexuales (esporas) (Duran de Grau y Pascual., 1986).

4.1.8- Ulva en Uruguay

Ulva spp. es el alga más consumida en nuestro país, siendo *Ulva lactuca* y *Ulva fasciata* las que más se extraen en forma artesanal para consumo humano.

Son recolectadas en el litoral Atlántico, principalmente en el departamento de Rocha. A nivel local son utilizadas en restaurantes y puestos gastronómicos artesanales especialmente durante la temporada turística (diciembre - marzo) donde la demanda de productos asociados al mar es mayor que en el resto del año (Cortazzo y Pérez, 2015).

Los consumidores en búsqueda de nuevos sabores y texturas han incorporado en su dieta este tipo de producto en ensaladas, bocaditos fritos o galletitas saborizadas. En Montevideo y resto del país estos productos escapan la estacionalidad veraniega comercializándose durante todo el año.

4.2.- ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS (ETA)

Son enfermedades producidas por la ingestión de agua o alimentos contaminados con agentes biológicos como bacterias, virus, parásitos; agentes físicos o químicos en cantidades tales que afecten la salud de un consumidor o grupo de estos en forma aguda o crónica (OMS, 2020). ETA es considerada como tal siempre que se vincule con un alimento y haya ingresado por vía oral. Las ETA son una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo y representan uno de los principales problemas para la salud pública. Ocasionan un gran impacto económico tanto por los gastos en salud producidos como en las actividades relacionadas con la producción de alimentos (Zamudio y col., 2011). Se presentan en países en vías de desarrollo como países desarrollados. Afectan principalmente a lactantes, niños y ancianos, siendo una de las causas de muerte infantil en el mundo principalmente en menores de 5 años (OMS, 2015).

Los cambios en los hábitos alimentarios como ser el consumo de alimentos fuera del hogar (cantinas, restaurantes, puestos artesanales, etc.) implican una mayor manipulación de los alimentos, dificultad en mantener la cadena de frío y facilitan la contaminación cruzada, lo que favorece la aparición de estas enfermedades (Consejería de empleo y desarrollo tecnológico, 2010).

Los recursos pesqueros presentan peligros biológicos, químicos o físicos que puedan afectar a los consumidores por lo que es necesario identificarlos para prevenir las posibles enfermedades asociadas a estos.

Se entiende por inocuidad alimentaria a aquel alimento que no afecta la salud del consumidor el cual ha sido elaborado, manipulado, envasado, almacenado, transportado y exhibido bajo condiciones higiénico-sanitarias adecuadas. Si el consumidor ingiere dicho alimento, respetando las indicaciones de preparación del proveedor, éste no le causará ninguna enfermedad (OPS, s.f.).

4.3.- VIBRIOS

4.3.1.- Antecedentes

En 1950 Japón reportó el primer brote de enfermedad causada por el *Vibrio parahaemolyticus* en 272 individuos que presentaron un cuadro de gastroenteritis aguda de los cuales 20 fallecieron (Fujino y col., 1953). En América del Sur, Argentina reportó la presencia de *V. parahaemolyticus* en mejillones en 1971 (Casellas y col., 1977 en Raszl y col., 2016) siendo el primer y único reporte para este vibrio en dicho país. En el mismo año en Maryland (Estados Unidos) se identificó este patógeno asociado al consumo de cangrejos mal cocidos donde 3 brotes de gastroenteritis fueron reportados (Molenda y col., 1972). En 1975, Brasil denunció el primer caso de infección por *V. parahaemolyticus* diagnosticado en un niño (Hofer, 1983) destacándose como el país con más hallazgos de este vibrio en muestras de medio ambiente y alimentos de origen marino en América del Sur hasta el 2015 (Raszl y col., 2016). Así mismo, *V. parahaemolyticus* ha sido reportado en casos aislados y brotes en diferentes países de América del Sur exceptuando a Uruguay y Argentina. En Uruguay, Ramos y col., en 1979 describen por primera vez la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio alginolyticus* en peces bentónicos y heces de niños con diarrea. En 2018 Dragonetti y col., realizan la primera comunicación de *V. parahaemolyticus* en macroalga *Ulva* spp, en el Departamento de Rocha.

La presencia de *Vibrio vulnificus* en América del Sur ha sido documentada desde 1982 cuando fue encontrada en muestras de agua estuarina en el estado de Rio de Janeiro en Brasil (Rodrigues y Hofer, 1986). Sin embargo, en Uruguay se diagnosticó el primer caso de infección en humanos en 1997 en un paciente diabético de 60 años quien permaneció varias horas con sus piernas en contacto con agua del Río de la Plata provocándole sepsis y muerte (Carrerou-Perreng, 2001 en Raszl y col., 2016). Según el Ministerio de Salud Pública (2019), se registran anualmente alrededor de 10 notificaciones de esta bacteria, siendo en todos los casos debido al contacto con el agua de mar. El último reporte hasta la fecha ocurrió durante el verano del 2019 en Maldonado, Uruguay donde se notificó el fallecimiento de un hombre de 52 años a causa de una infección por *Vibrio vulnificus* que ingresó a través de una herida en piel.

Los casos en los cuales la vía de entrada del agente fueron heridas no deben ser considerados como ETA. Sin embargo, la presencia del patógeno en el medio acuático implica un riesgo potencial para la presentación de ETA.

Miyamoto y col. en 1961 aislaron por primera vez al *V. alginolyticus*, pero no fue considerada una especie patógena hasta el año 1973 (Zen-Yoji y col. 1973 en Franco y col., 2014) pero, desde entonces, los casos en los cuales ha sido implicada han ido en aumento. La enfermedad causada por este vibrio se encuentra actualmente en auge, aunque su presentación es esporádica (González y Cecchini s.f.a). Así mismo, Reilly y col., 2011 destacan el riesgo potencial para la salud el uso de algas marinas directamente de forma tópica o mediante preparados caseros para la limpieza y aplicación sobre heridas.

Parte de este trabajo está basado y tiene como antecedente nacional principal la tesis de Maestría Internacional en Tecnología de Alimentos de la Dra. Carina Galli Cetraro: "Identificación de vibrios no cólera en macroalgas del género *Ulva* extraídas en la costa este de la República Oriental del Uruguay". Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. Università degli studi di Parma.

4.3.2.- Generalidades

El género *Vibrio* se encuentra dentro de la familia *Vibrionaceae*. Son bacilos Gram negativos, rectos o curvados, aerobios o anaerobios facultativos, generalmente móviles debido a un flagelo polar simple. Pueden ser no halófilos como el *V. cholerae* o halófilos como *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. alginolyticus* que requieren sal para su crecimiento (Chart, 2002; Leyton y Riquelme, 2008). No son formadores de esporas, Su tamaño varía entre 0.5 a 0.8 µm de ancho y 1.4 a 2.6 µm de largo. Muchas especies son fermentadoras de glucosa sin producción de gas, productoras de oxidasa y catalasa (McLaughling, 1995 en Drake y col., 2007). Habitan en las aguas marinas costeras y estuarinas de todo el mundo encontrándose tanto libremente en la columna de agua así como también asociados al zooplancton, fitoplancton, peces, crustáceos y moluscos quienes ofician de reservorios de éstos vibrios (López, 2012). Los *V. anguillarum*, *V. alginolyticus* y *V. vulnificus* son microorganismos patógenos tanto para peces de vida libre, como de cultivo (Colwell & Grimes, 1984). También son frecuentes las vibriosis en crustáceos, con gran mortalidad en cultivos de camarones peneidos (*Vibrio harveyi*) (Cuellar, 2013).

El género *Vibrio* está compuesto por 142 especies de las cuales 12 fueron hasta ahora identificadas como patógenas para el hombre (Sawabe y col., 2013) destacándose entre ellos al *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae* (Robert-Pillot y col., 2014) y *V. alginolyticus*. Las infecciones causadas por las diferentes especies de vibrios pueden dividirse en dos grupos: las causadas por *V. cholerae* y las provocadas por vibrios no-cólera también llamadas vibriosis.

El *V. parahaemolyticus* y el *V. cholerae* se los relaciona mayormente en infecciones gastrointestinales mientras que el *V. vulnificus* está asociado con infecciones de heridas y septicemias (Roig y col., 2009). El *V. alginolyticus* causa otitis medias y externas e infecciones gastrointestinales (Chen y col., 2011). En la Tabla 1 se observan las diferentes patologías causadas por algunos vibrios de interés para la salud pública.

El *V. parahaemolyticus* y el *V. vulnificus* pueden persistir en sedimentos donde entran en un estado viable pero no cultivable (*VBNC, viable but non-culturable, por sus siglas en inglés*) cuando las condiciones medioambientales son adversas (Kaneko y Colwell, 1973) como falta de nutrientes, temperaturas bajas y pH inadecuado (Oliver, 2010). Las bacterias en estado VBNC no pueden recuperarse del ambiente, no forman colonias en medios sólidos altamente nutritivos, pero son consideradas vivas y metabólicamente activas (Oliver, 2000).

Los cambios que sufren las bacterias en estado de *VBNC* incluyen; reducción de tamaño, alteraciones en su fisiología y bioquímica, modificaciones en la composición en ácidos grasos de la membrana citoplasmática, entre otros (Oliver, 2004 en López, 2012). Este estado se revierte una vez que las condiciones sean favorables, volviéndose metabólicamente activa y cultivable nuevamente.

Tabla 1. Patologías causadas en humanos por infecciones por Vibrios (Adaptado de López, 2012)

Especie	Patologías		
	Gastroenteritis	Infección de heridas	Septicemia primaria
<i>V. a</i>	+	++	(+)
<i>V. c no-O1</i>	++	(+)	+
<i>V.c O1/O139</i>	++	+	ND
<i>V. p</i>	++	(+)	+
<i>V. v</i>	+	++	++

V.a: *Vibrio alginolyticus*. *V.c:* *Vibrio cholerae*. *V.p:* *Vibrio parahaemolyticus*. *V.v:* *Vibrio vulnificus*. Infección descrita en: ++ alto número de casos, +bajo número de casos. (+): Infección poco habitual ND: infección no descrita

4.3.3.- *Vibrio parahaemolyticus*

- su hábitat natural son aguas marinas costeras, estuarinas y sedimentos
 - anaerobio facultativo
 - halófilico: crece en aguas con salinidad óptima de 10-30 g/l (ICMSF, 1996).
 - su crecimiento se ve favorecido en aguas templadas entre 5-43°C con una temperatura óptima de 37°C (ICMSF, 1996) donde su tiempo de generación estimado entre 8 a 9 minutos (Hernández y col, 2005), aunque González y Cecchini (s.f.b) establecen un tiempo de generación de 12 a 18 minutos en productos marinos.
- crece óptimamente a un pH entre 7,6 – 8,6 con un rango entre 4,8 a 11 (Beuchat, 1973).

El *V. parahaemolyticus* es una bacteria multiserotípica que contiene 13 diferentes antígenos O y 71 diferentes antígenos K en su cápsula (Balakrish y Hormazábal, 2005). Los serotipos O3:K6, O4:K12, O4:K68 han estado implicados en brotes en Estados Unidos, América del Sur y Europa (FDA, 2012; Letchumanan y col., 2014). Sus factores de virulencia incluyen 3 hemolisinas específicas: directa termoestable (tdh), la hemolisina relacionada con la directa termoestable (trh), la termolábil y un sistema de secreción tipo III causante de enterotoxicidad y citotoxicidad (Johnson, 2013). La tdh presenta actividad hemolítica, enterotóxica, cardiotoxica y citotóxica (Park y col., 2004).

Se han encontrado otros factores de virulencia en *V. parahaemolyticus* relacionados con la capacidad de causar la enfermedad, como ser: factores de adherencia, colonización y de invasión celular; pili y hemaglutininas (*mannose sensitive hemagglutinin*-MSHA), entre otros (López, 2012). Se diferencia de otros vibrios por el fenómeno de Kanagawa (KP) (Dalsgaard, 2017) donde la hemolisina directa termoestable (tdh) produce un halo de hemólisis en el medio Wagatsuma agar (7% de NaCl, manitol y sangre humana o de conejo fresca) incubado a 35-37°C durante 24 h. (López, 2012).

Al ser un habitante normal del medio marino no se puede evitar su presencia en los alimentos de este origen como moluscos bivalvos, pescados y crustáceos principalmente. Así mismo se lo ha encontrado en algas del género *Ulva* (Dragonetti y col., 2018). La infección se asocia con el consumo de agua contaminada o productos hidrobiológicos crudos o mal cocidos (Daniels y col., 2000) o por contaminación cruzada. En los bivalvos la depuración controlada no es eficaz para su eliminación.

Generalmente la infección se manifiesta clínicamente como una gastroenteritis donde se observa una inflamación de la membrana interna del intestino. Es un cuadro de leve a moderado y revierte en menos de una semana (autolimitante en la mayoría de los casos) con una duración media de 3 días. Presenta un periodo de incubación de 4 a 96 h con una media de 15 h (Balakrish y Hormazábal, 2005). Se caracteriza por náuseas, diarrea abundante (en las formas graves se presenta acuosa con moco y sangre), vómitos, dolor abdominal. La aparición de fiebre y escalofríos es menos frecuente (Blake y col., 1979). Normalmente no se requiere tratamiento antibiótico ni hospitalización. Se requiere aporte hidroelectrolítico vía oral o parenteral y antibioticoterapia en casos graves (González y Cecchini, s.f.b). En algunos casos el período de incubación y las manifestaciones clínicas son similares a las causadas por otros enteropatógenos quedando subdiagnosticada.

El *V. parahaemolyticus* puede ingresar a través de heridas preexistentes en contacto con agua con el agente (Hernández y col, 2005) o por aquellas soluciones de continuidad ocasionadas durante la manipulación de peces, moluscos o crustáceos (cortes, rasguños) o comida de origen marino (Dalsgaard, 2017). En estos casos las heridas infectadas habitualmente requieren además de la antibioticoterapia el desbridamiento y drenaje de estas. En el caso de que la bacteria llegue a invadir el torrente sanguíneo puede desencadenar septicemia caracterizada por fiebre, hipotensión, shock y muerte en muchos casos.

A pesar de que la septicemia primaria causada por este vibrio es rara puede ocurrir en individuos con enfermedades crónicas subyacentes como ser linfomas, tuberculosis pulmonar, úlcera duodenal, artritis reumatoidea, hepatitis crónica, entre otras. Otra población susceptible son mujeres embarazadas o pacientes inmunodeprimidos (Blake y col., 1979). La septicemia cursa de forma grave y puede llegar a ser mortal.

Este patógeno se asocia a su vez con casos de otitis infecciosa (Dalsgaard, 2017).

Las concentraciones infecciosas del *V. parahaemolyticus* se encuentra en 1×10^4 bacteria por gramo (Hernández y col, 2005) aunque la gravedad dependerá tanto de la cepa bacteriana como del hospedador.

La inactivación efectiva de *V. parahaemolyticus* se logra a una temperatura de congelación de -18 a -24°C y la muerte de este, mediante la cocción a temperaturas mayores a 55 °C por 10 min (Andrews y col., 2000) El procesamiento a altas temperaturas, así como la irradiación son otros métodos para eliminar este

microorganismo del alimento (Andrews y col., 2003). Es altamente susceptible a pH bajo y a desinfectantes como el alcohol (FDA, 2012).

4.3.4.- *Vibrio vulnificus*

Patógeno humano oportunista que se distribuye ampliamente en los nichos ecológicos del ecosistema marino y estuarino (Strom y Paranjpye, 2000) incluyendo costas marinas, sedimento, plancton, peces y mariscos (González y Cecchini, s.f.c). Es halófilico, crece en aguas con un rango de salinidad entre 7- 16 g/l (Leng, 2019) Es mesófilo y no resistente a pH menores a 5. Crece en un rango de temperatura entre 20 a 24°C (Mahmud y col., 2008).

Los alimentos principalmente involucrados son ostras, almejas, cangrejos y peces. Puede ser clasificado en 3 biotipos: el biotipo 1 se relaciona con las infecciones en humanos, el biotipo 2 es responsable de enfermedad en anguilas (Dalsgaard, 2017; Tison y col., 1982), mientras que el biotipo 3 fue aislado de manipuladores de pescado en Israel (Bisharat y col., 1999).

La virulencia de esta bacteria se encuentra asociada esencialmente al polisacárido capsular, aunque existen otros factores que juegan un rol importante en la patogenicidad de este vibrio (Strom y Paranjpye, 2000). A modo de ejemplo se puede citar una exotoxina con actividad citolítica y hemolítica (vvhA), la toxina RTX (rtxA), el pili tipo 4 (pilA) (Johnson, 2013) y el lipopolisacárido capsular (Strom y Paranjpye, 2000).

Los casos clínicos de infección por *V. vulnificus* ocurren debido al consumo de mariscos que albergan este microorganismo o por la exposición de heridas abiertas al agua de mar (Hlady y Klontz, 1996). La severidad de esta infección está influida por factores como la exposición o ingesta del inóculo, virulencia potencial del organismo, así como el estado de salud del individuo.

Este organismo es capaz de causar septicemia primaria, infección de heridas y en mucho menor frecuencia gastroenteritis (Strom y Paranjpye, 2000).

La septicemia primaria se produce al consumir productos pesqueros crudos con el agente infeccioso. Afecta individuos con enfermedades crónicas, particularmente enfermos hepáticos, pacientes con úlceras gástricas, inmunodeprimidos y alcohólicos (Li y col., 2018). Los síntomas típicos ocurren dentro de los 7 días y comienza por la aparición abrupta de fiebre y escalofríos puede estar seguida por lesiones cutáneas usualmente en las extremidades inferiores o tronco. Tienen una evolución rápida que va desde vesículas o ampollas con contenido hemorrágico hasta llegar a la necrosis del tejido. La hipotensión durante las primeras 12 hs o leucopenia están asociadas con un pronóstico desfavorable. En estos individuos las bacterias ingresan al torrente sanguíneo provocando un shock séptico y la muerte en más del 50% de los casos (Blake y col., 1979).

La infección de heridas se produce por su contaminación expuesta al agua de mar en presencia de la bacteria, o por heridas provocadas durante la manipulación de productos pesqueros con el agente. Los síntomas en las heridas pueden aparecer en aproximadamente 4 horas, destacándose una inflamación local que puede evolucionar desde una celulitis (contenido sero-hemático) hasta necrosis del tejido (Tacket y col., 1984). La infección puede tornarse sistémica generando fiebre, escalofríos, hipotensión y en casos más severos, shock septicémico (Blake y col., 1979).

La *gastroenteritis* se produce por la ingestión de alimentos con *V. vulnificus* en individuos sanos que puede dar como resultado un cuadro clínico entre las 18 horas y los 7 días post ingestión. Los síntomas comunes son vómitos, diarrea acuosa y profusa y dolor abdominal. El cuadro generalmente dura unos pocos días y tiende a ser autolimitante en la mayoría de los casos (Klontz y col., 1988).

Si la infección es detectada en forma temprana, el *V. vulnificus* es susceptible a tratamiento con antibióticos como las tetraciclinas (FDA, 2012). Las drogas alternativas son cefotaxima y ciprofloxacina. En la infección de heridas además de la antibioticoterapia es necesario, el tratamiento quirúrgico como drenaje, desbridamiento (González y Cecchini, s.f.c).

4.3.5.- *Vibrio alginolyticus*

Vibrio alginolyticus es una bacteria con distribución mundial que se encuentra presente en todos los ambientes y organismos marinos considerándola parte de la microflora marina normal (Chen y col., 2011). Crece a salinidades de 5–25 g/l (Hornstrup y col., 1993). Es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos y polares (Zavala y col., 2005). Es Oxidasa, catalasa, indol y VogesProskauer positivo; produce ácido a partir de glucosa, maltosa, manitol y sacarosa (Rivera, O, 2010).

Se ha aislado de aguas costeras templadas y tropicales con temperaturas superiores a 17°C (Zavala y col., 2005). Es una de las especies de *Vibrio* aislada con más frecuencia (González y Cecchini, s.f.a).

Dada su capacidad de adhesión al mucus del huésped, se le asocia a enfermedades oportunistas, lo cual es un factor crucial en el mecanismo de virulencia (Luo y col., 2016). Otros factores de virulencia incluyen la capacidad de producir hemólisis, hemaglutinación y proteasas (Zanetti y col., 2000). A pesar de esto, su virulencia es baja y se asocia frecuentemente con otros microorganismos patógenos (Franco, 2014).

Las infecciones por *V. alginolyticus* varían dependiendo la forma en que éste entra al organismo. La ingesta de productos marinos contaminados crudos o insuficientemente cocidos causan un cuadro gastrointestinal autolimitante. Si se presenta un cuadro diarreico agudo debe realizarse el tratamiento de sostén mediante el aporte hidroelectrolítico (González y Cecchini, s.f.a).

Al entrar en contacto con agua de mar puede producir sobreinfecciones de heridas, otitis, conjuntivitis, celulitis y abscesos (Schmidt 1979).

El alcoholismo y el inmunocompromiso son factores de riesgo para la ocurrencia de la enfermedad. Las tetraciclinas son los antibióticos de primera elección para el tratamiento específico en la celulitis y sepsis; las alternativas son cefotaxima y ciprofloxacina.

4.3.6.- Métodos para el aislamiento e identificación

El método convencional utilizado en el aislamiento e identificación de los vibrios incluye, el enriquecimiento en un medio líquido seguido de la siembra en un medio sólido (Hara-Kudo y col., 2001).

Se han desarrollado medios alternativos como el agar tiosulfato-citratosaes biliares-sacarosa (TCBS) que buscan evitar el crecimiento de la microflora natural que acompaña la siembra en los medios de cultivo convencionales. Así mismo se crearon medios selectivos como el CHROMagar™ Vibrio (CHROMagar, Francia) que nos permiten identificar diferentes especies del género vibrio (Su y col., 2005).

4.3.6.1.- Agar CHROMagar™ Vibrio

El CHROMagar™ Vibrio agar es un medio de cultivo selectivo, cromogénico basado en el cambio de pH debido a la fermentación de la sacarosa. Permite diferenciar claramente *V. parahaemolyticus* de *V. vulnificus*, ambas incapaces de fermentar la sacarosa. *V. alginolyticus* permanece incoloro en CHROMagar™ Vibrio mientras que las colonias de *V. parahaemolyticus* presentan un color malva y las colonias de *V. vulnificus* presentan una coloración verde azulado a azul turquesa. Las muestras pueden procesarse mediante siembra directa por estrías en placa, así como realizando un paso previo de enriquecimiento.

4.3.6.2.- API Índice Analítico de Perfil

El sistema API 20 NE (Biomériux) es un sistema de pruebas bioquímicas de lectura directa e indirecta que basa su sistema de interpretación en algoritmos vinculados a una base de datos. El API 20 NE es específico para identificar bacilos Gram negativos no pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Consiste en 20 pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas y una base de datos. La lectura de estas reacciones se hace con la ayuda de la tabla de identificación y el reconocimiento se realiza mediante el catálogo analítico "Analytical Profile Index API 20NE" o el software "APILAB".

Las pruebas bioquímicas que se efectúan son: reducción de nitratos a nitritos o nitrógeno, formación de indol, fermentación de glucosa, arginina dehidrolasa, presencia de ureasa, hidrólisis de esculina, hidrólisis de gelatina, β -galactosidasa, oxidasa. Además, evalúa la asimilación de D-glucosa, L-arabinosa, D-manosa, D-manitol, N-acetilglucosamina, D-maltosa, gluconato potásico, ácido cáprico, ácido adípico, ácido málico, ácido fenilacético, citrato trisódico.

5.- OBJETIVOS:

5.1.- Objetivos generales

Identificar la presencia de vibrios no cólera en *Ulva* spp. colectada en La Paloma, Departamento de Rocha, Uruguay.

5.2.- Objetivos particulares

Identificar la presencia de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio alginolyticus*.

Establecer pautas para prevenir el crecimiento de vibrios no cólera poscosecha en macroalgas del género *Ulva*.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.- Recolección de muestras

Las algas se recolectaron de la zona de El Cabito, El Faro y zona INAPE en el balneario La Paloma, Rocha durante el período comprendido entre octubre 2018 y mayo 2019. El muestreo se realizó teniendo en cuenta las zonas de extracción elegidas por los recolectores artesanales para la preparación de buñuelos de algas además de la disponibilidad de las algas y accesibilidad al momento de la recolección. La figura 1 es una imagen satelital con los puntos donde se realizó el muestreo.

Las algas extraídas se encontraban adheridas directamente a las rocas o bien fijadas a los mejillones. La extracción se realizó de forma manual. Las algas se colocaron directamente en bolsas *ziploc*® y fueron inmediatamente acondicionadas en la caja isotérmica con hielo en escamas para su transporte al Instituto de Investigaciones Pesqueras, Facultad de Veterinaria, UdelaR.

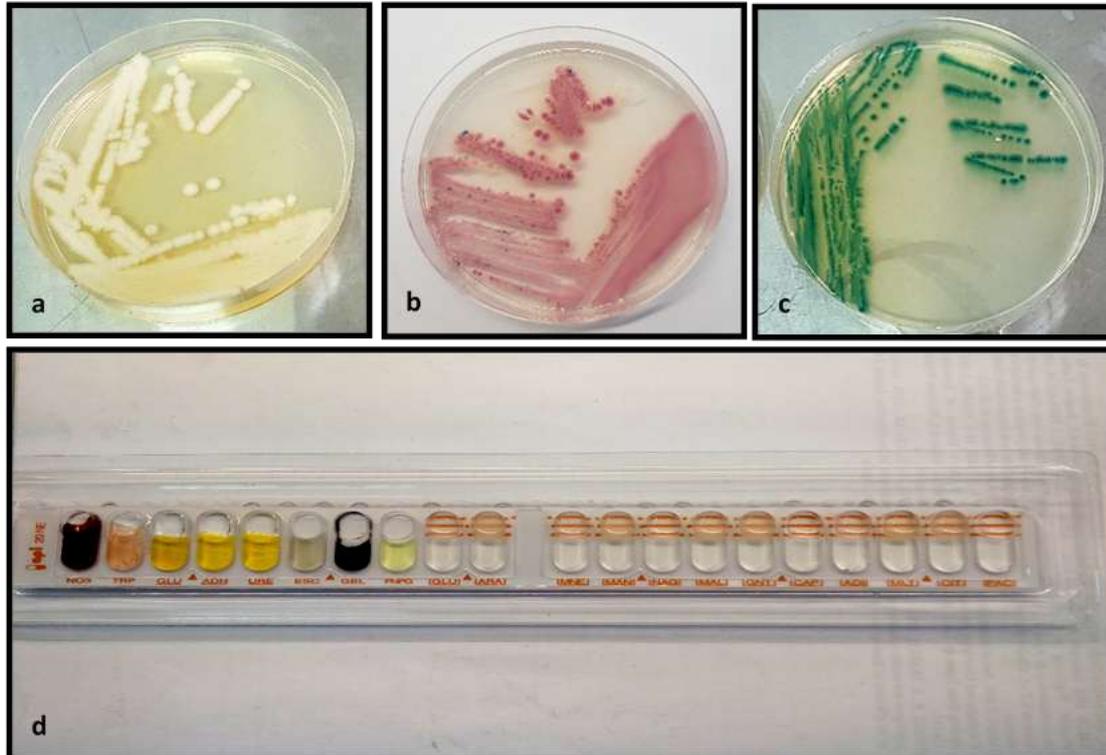


Figura 1. Mapa de la costa de La Paloma mostrando los sitios de muestreo. Fuente: adaptado de Imágenes ©2020 TerraMetrics <https://gmapgis.com>

6.2 Procesamiento de muestras

Se procesaron un total de 22 muestras, para su enriquecimiento se utilizó 225 ml de agua peptonada alcalina y 25 g de algas. Se homogenizaron y luego se incubaron a 36°C por 18 - 24 horas. Transcurrido el enriquecimiento se sembraron por duplicado en CHROMagar™ *Vibrio* incubándose a 36°C por 24 horas. A las 24 horas se realizó la lectura en base al código de colores de CHROMagar™ para la identificación de vibrios no cólera (ver figura 2):

A las colonias características se les realizó test de oxidasa. Las oxidasas positivas se confirmaron por API 20 NE (ver Figura 2). A su vez se enviaron muestras a laboratorio externo certificado (LAAI Laboratorio Analítico Agroindustrial) para confirmar los hallazgos y evaluar la técnica.



Malva: *Vibrio parahaemolyticus* Verde: *Vibrio vulnificus* Crema: *Vibrio alginolyticus*

Figura 2. Medios para la identificación de vibrios no cólera. CHROMagar™ Vibrio agar: a) colonias de *Vibrio alginolyticus*. b) colonias de *Vibrio parahaemolyticus*. c) colonias de *Vibrio vulnificus*. d) API 20 NE

7.- RESULTADOS OBTENIDOS

Durante el periodo de muestreo la temperatura y salinidad del agua de mar se mantuvo dentro del rango apropiado para el desarrollo o sobrevivencia de los vibrios no cólera estudiados en esta tesis. La temperatura mínima registrada fue de 13°C en el mes de octubre y la máxima fue de 25.1°C en el mes de febrero con un promedio de 20,1°C. La salinidad alcanzó máximos de 32,1 g/l en octubre y 11,2 g/l en febrero con un promedio 26,2 g/l. Los datos de salinidad y temperatura del agua marina fueron obtenidos de la base de datos de la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA-MGAP), La Paloma (Fabiano y col., 2019).

En la Tabla 3 se muestra la distribución de las diferentes especies de vibrio aisladas según zona de muestreo, así como el número total de muestras analizadas.

En todas las muestras analizadas se encontró *Vibrio alginolyticus* visualizándose como único agente patógeno se visualizó en el 72.7% de las mismas. Se aisló *Vibrio parahaemolyticus* en 18.2% de las muestras mientras que *Vibrio vulnificus* se identificó en un 13.6%. El punto de extracción no influyó en el tipo de vibrio aislado (ver Gráfico 1).

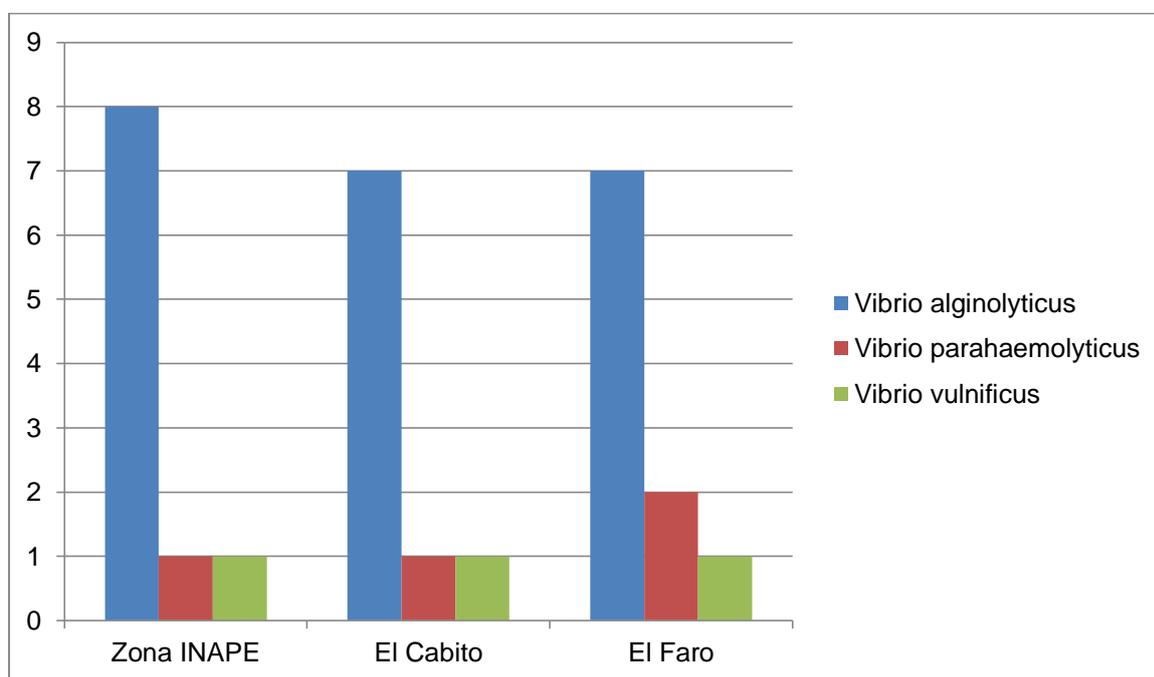


Gráfico 1. Distribución de los diferentes vibrios aislados por zona de extracción

La educación de los consumidores y manipuladores es clave para prevenir las vibriosis asociadas a macroalgas (*Ulva spp.*) así como crear conciencia sobre los riesgos que implican determinadas prácticas recreativas o hábitos alimentarios. Las pautas para prevenir el crecimiento de vibrios no cólera poscosecha en macroalgas del género *Ulva* y evitar vibriosis por contaminación cruzada de las superficies de trabajo y productos terminados (*omelettes*, buñuelos y ensaladas) incluyen:

- evitar el consumo de algas crudas o ligeramente cocidas: es aconsejable una cocción profunda como ser hervido o fritura
- al momento de manipular las algas, utilizar guantes o vendaje a prueba de agua en caso de tener heridas en las manos.
- lavarse las manos con agua y jabón después de manipular productos hidrobiológicos.
- lavar cualquier herida expuesta al contacto con las algas con abundante agua y jabón.
- no utilizar agua de mar como agua de lavado.
- evitar contaminación cruzada de las algas cocidas con crudas u otros productos hidrobiológicos así como con utensilios, mesadas o recipientes.
- evitar el contacto o ingreso al agua de mar o estuarina si presenta una herida (incluidos los cortes y las raspaduras).
- en caso de infección en piel consultar al médico informando que ha estado en contacto con algas.
- no utilizar algas como compresas sobre heridas, quemaduras de sol o cualquier otra solución de continuidad.

8.- DISCUSIÓN

En el período de extracción de las macroalgas se constataron temperaturas y salinidades adecuadas para el crecimiento o sobrevivencia de los vibrios no cólera de estudio aislándose *Vibrio alginolyticus* en la totalidad de las muestras, mientras que *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* se encontraron en menor proporción. Esto se encuentra en concordancia con los hallazgos de Murthy y col, (2016) quienes lo aislaron en 9 de 10 de las macroalgas estudiadas dentro de las cuales se encontraba *Ulva lactuca*. Así mismo, Chen y col. (2011), en las costas de Shenzhen, Japón encontraron que dentro de la diversidad de vibrios aislados, el *V. alginolyticus* era el dominante y que existía una correlación positiva entre la temperatura del agua y la densidad de vibrios coincidiendo con nuestros resultados.

Así mismo, Galli (2019) informó que el vibrio que predominó en la matriz estudiada fue *V. alginolyticus*, también coincidiendo con nuestros resultados.

Egan y col. (2013) plantean a las macroalgas como hospedadoras de una diversa microbiota epífita dentro de la cual se encuentran los *Vibrio spp.* El *V. parahaemolyticus* ha sido aislado de *Ulva spp.* provenientes de las costas del canal Kii en Japón destacándose una mayor prevalencia de este durante el verano y el otoño que durante el invierno (Mahmud y col., 2007).

En nuestro trabajo, el *V. parahaemolyticus* se constató en el 18.2% de las muestras pero fueron en los meses de enero y febrero donde se registraron los mayores promedios de temperatura en el agua sugiriendo la probable asociación entre el factor ambiental y la presencia del patógeno coincidiendo con los hallazgos de Mahmud y col., 2007.

Mahmud y col., (2008) aisló *V. vulnificus* de diferentes macroalgas encontrando mayor prevalencia del vibrio en verano y otoño donde la temperatura del agua osciló entre 20-29°C en comparación con los meses de invierno. En concordancia con nuestros estudios, las muestras que dieron positivas a *V. vulnificus* (13.6%) se registraron en los meses de octubre, enero y febrero aislándose por lo tanto en los extremos de temperatura y salinidad del periodo estudiado.

Por otro lado, según las observaciones realizadas por Eiler (2006) en la bahía de Barnegat, New Jersey, en invierno se encontró una baja densidad de vibrios cuando las temperaturas estuvieron por debajo de 18°C.

Por lo expuesto podemos afirmar que la temperatura y salinidad del agua influyen en la incidencia y densidad de los vibrios en el ambiente y consecuentemente en los diferentes recursos hidrobiológicos donde se incluyen las macroalgas.

En los últimos años el cambio climático ha tenido influencia en la temperatura del agua del mar registrándose un aumento en la misma en comparación con décadas anteriores. Esto podría provocar que los vibrios se aislen fuera de la temporada típica destacándose también la gran capacidad de adaptación que poseen estos patógenos a cambios medioambientales (Mahmud y col., 2008; Paz y col., 2007). Conocer los parámetros de temperatura y salinidad podrían ayudar a predecir la carga bacteriana probable de estas bacterias a lo largo de la costa (Mahmud y col., 2008). Las macroalgas presentan en su superficie una microbiota diversa dentro de la cual existen bacterias potencialmente patógenas para el hombre como ser *Vibrio spp.* (Duinker y col., 2016). Si bien no se han reportado infecciones asociadas al consumo de *Ulva spp.* en Uruguay, las mismas pueden convertirse en un riesgo para la salud pública si se consumen crudas o insuficientemente cocidas, así como durante el procesamiento y el almacenamiento inadecuado de las mismas.

9.- CONCLUSIONES

Los vibrios no cólera *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. alginolyticus* fueron aislados de algas pertenecientes al género *Ulva* provenientes de La Paloma, lo que indica que existen condiciones propicias para el desarrollo de estos.

Cabe destacar que el hallazgo de *V. vulnificus* y *V. alginolyticus* en lechuga de mar es inédito en este balneario. Así mismo, se puede inferir que la matriz *Ulva* spp. es apropiada para el *V. alginolyticus* así como reservorio para los otros vibrios no cólera de estudio en esta tesis.

Otra apreciación importante es la no influencia de la zona de extracción con los aislamientos reportados.

Ulva spp. constituye una fuente de estos microorganismos patógenos no considerada hasta el momento, por lo que su vinculación con posibles infecciones adquiridas por su consumo directo o en preparaciones insuficientemente cocidas así como la recontaminación poscocción por tablas y utensilios inadecuadamente higienizados debe ser tenida en cuenta.

Dado nuestro hallazgo es importante destacar que existe mayor riesgo de contraer una vibriosis al consumir estas algas durante los meses de verano ya sea por los hábitos alimenticios, así como por el aumento de la densidad de vibrios en aguas marinas durante los meses más cálidos. También existe el riesgo de contraer enfermedades asociadas con la exposición de heridas preexistentes o provocadas durante las diferentes actividades acuáticas con el agua de mar o el alga directamente.

Por lo anteriormente expuesto es importante seguir pautas para prevenir la vibriosis. Son necesarias futuras investigaciones en lo atinente al estudio de la cuantificación de estos vibrios en materia prima, así como la presencia de estos en producto terminado (buñuelos de algas, *omelettes*, ensaladas).

10.- BIBLIOGRAFÍA

1. Andrews L., Jahncke M. y Mallikarjunan K. (2003). Irradiación gamma de dosis baja para reducir las ostras vivas patógenas de vibriosis (*Crassostrea virginica*). Revista de tecnología de productos alimenticios acuáticos, 12 (3), 71–82.
2. Andrews L, Park, D y Chen, Y. (2000). Pasteurización a baja temperatura para reducir el riesgo de infecciones por vibrio de las ostras de concha cruda. Aditivos alimentarios y contaminantes, 17 (9), 787–791.
3. Balakrish G, Hormazábal, C. (2005). The *Vibrio parahaemolyticus* pandemic. Revista chilena de infectología, 22(2), 125-130.
4. Balaraman, D., Gnana E., Rajasekar F., Pandiyan, P., Subaramaniyan K., Sadaiyappan B. (2013). Isolation of bioactive compound from marine seaweeds against fish pathogenic bacteria *Vibrio alginolyticus* (VA09) and characterisation by FTIR Survey of immune organs View project Screening for potential probiotic strains as pathogen control bioagents and. Journal of Coastal Life Medicine Journal Homepage, 508(1), 26–33.
5. Baldauf S.L. (2003). The deep roots of eukaryotes. Science. <https://doi.org/10.1126/science.1085544>
6. Barrios González, V., Castillo, R., González, I., Savón Valdés, L., & Coto, G. (2011). Algas Marinas, Excelentes Nutrientes. Sociedad Uruguaya de Fitoterapia disponible en: <http://sociedaduruguayadefitoterapia.blogspot.com/2011/06/algas-marinas-excelentes-nutrientes.html>
7. Beuchat L (1973) Interacting Effects of pH, Temperature, and Salt Concentration on Growth and Survival of *Vibrio parahaemolyticus* Applied Microbiology Vol. 25, No. 5 pp. 844-846
8. Bisharat N., Agmon V., Finkelstein R., Raz R., Ben-Dror G., Lerner L., Soboh S., Colodner R., Cameron D.N., Wykstra D.L., Swerdlow D. L. y Farmer J.J. (1999). Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. *The Lancet*, 354(9188), 1421-1424.
9. Blake P.A., Merson M.H., Weaver R.E., Hollis D.G., Heublein P.C. (1979) Disease caused by a marine *Vibrio*. Clinical characteristics and epidemiology. N Engl J Med; 300:1–5
10. Borazo de Zaixso A.L, Ciancia M., Cerezo A.S, Piriz M.L., Casas, G.N., Eyra M C (2015). Utilización de las macroalgas marinas de la costa argentina y sus hidrocoloides.1: 67.
11. Chart H. (2002). *Vibrio mobiluncus, gardnerella and spirillum*. En: Dance, D. Medical Microbiology, A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control, D. Greenwood, R. Slack & J. Peutherer (editors). Edinburgh: Churchill Livingstone pp:314- 323.
12. Chávez T (2017) Reclutamiento y abundancia de especies del género ulva (chlorophyta) y su relación con variables hidrográficas en la bahía de la paz. 180 p
13. Chen, Ming-Xia, Li, He-Yang, Li, Gang, & Zheng, Tian-Ling. (2011). Distribution of *Vibrio alginolyticus*-like species in Shenzhen coastal waters, China. Brazilian Journal of Microbiology, 42(3), 884-896.
14. Colwell R.R & Grimes DJ. (1984). *Vibrio* diseases of marine fish populations. Helgoländer Meeresunters. 37, 265-287

15. Consejería de empleo y desarrollo tecnológico. (2010). Manipulación de alimentos (manual común). Junta de Andalucía.
16. Cortazzo, N., & Pérez, M. (2015). Valoración Higiénico-Sanitaria de la Macroalga comestible (Facultad de Veterinaria). Disponible en: <http://www.fvet.edu.uy/images/ContenidoMenu/Biblioteca/TesisdeGrado2015/FV-31573.pdf>
17. Cuéllar-Anjel J. (2013). Vibriosis. The Center for Food Security and Public Health. Iowa State University. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/vibriosis-in-shrimp-es.pdf>
18. Dalsgaard A. (2017) *Vibrio spp.* and seafood safety Department of Veterinary and Animal Sciences. Faculty of Health and Medical Sciences. University of Copenhagen. 40 p
19. Daniels N, MacKinnon L, Bishop R, Altekruise S, Ray B, Hammond R, Thompson S, Wilson S, N Bean N, Griffin P, Slutsker L. (2000). *Vibrio parahaemolyticus* Infecciones en los Estados Unidos, 1973 –1998, The Journal of Infectious Diseases , Volumen 181:5, 1661–1666p
20. Dhargalkar V, Verlecar X (2009) Southern Ocean seaweeds: A resource for exploration in food and drugs. National Institute of Oceanography. Aquaculture 287 (2009) 229–242
21. Dragonetti J.P., Friss de Kereki C., Fabiano G., Olivera F., Popovich R. (2018) Primera comunicación de *Vibrio parahaemolyticus* en macroalga *Ulva spp*, Departamento de Rocha, Uruguay. Simposio Latinoamericano de Inocuidad Alimentaria, VI. Buenos Aires, Argentina. (Poster)
22. Dragonetti J P (2019) Relevamiento de vibrios no cólera en la Laguna de Rocha República Oriental del Uruguay Facultad De Agronomía. Universidad De Buenos Aires. Universidad de Parma. 51p
23. Drake S L., Depaola A, Jaykus L. A. (2007). An overview of *vibrio vulnificus* and *vibrio parahaemolyticus*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 6(4), 120–144.
24. Dreckmann, E.K. 1998. Clasificación y nomenclatura de las macroalgas marinas bentónicas del Atlántico mexicano. UAM, Iztapalapa, CONABIO, 140pp.
25. Duinker A, Roiha I.S, Amlund H, Dahl L, Lock E, Kogel T, Mage A, Lunestad B (2016). Potential risks posed by macroalgae for application as feed and food- A Norwegian perspective. Report preparade by National Institute of Nutrition and Seafood Research (NIFES) for the Norwegian Food Safety Authority, 2-20.
26. Duran de Grau, N. Pascual, R. 1986 “Algas y Liqueenes” Mini Atlas Jover Ediciones Jover, S.A., España. 41pp
27. Egan S., Harder T., Burke C., Steinberg P., Kjelleberg S. & Tomas T. (2013) The seaweed holobiont: understanding seaweed- bacteria interactions. Dems microbiology Reviews, 37(3), 462-476.
28. Eiler A; Johansson M; Bertilsson S. (2006) Environmental Influences on Vibrio Populations in Northern Temperate and Boreal Coastal Waters (Baltic and Skagerrak Seas) Appl. Environ. Microbiol. Vol. 72, No. 9 p. 6004–6011
29. F.D.A. (2012) The Bad Bug Book, second edition published by the Center for Food Safety and Applied Nutrition, of the Food and Drug Administration (FDA), U.S. Department of Health and Human Services. Disponible en: <https://www.fda.gov/files/food/published/Bad-Bug-Book-2nd-Edition-%28PDF%29.pdf> . Fecha de consulta 20/5/2019a

30. Fabiano, G., Pereyra, I., Laporta, M., Silveira, S., Santana, O. (2019) Temperatura y salinidad superficial costera en La Paloma, Uruguay (Atlántico Sudoccidental). En: Base de datos de la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA-MGAP) La Paloma. (Versión impresa, sin publicar).
31. FAO (2004). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Puntos más salientes de los estudios especiales de la FAO. Alcance de la industria de las algas marinas. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/007/y5600s/y5600s07.htm#TopOfPage> Fecha de consulta 10/03/2019
32. FAO (2018) FAN (Fao Aquaculture Newsletter) n° 58 Abril 2018
33. Franco J, Lara E, Villa N, Mota L, Serralta L, Cuevas V, Sosa F (2014) Especies de importancia clínica del género *Vibrio* en alimentos marinos de origen animal de establecimientos de Puerto Ángel, Oaxaca, México. *Ciencia y Mar XX* (52): 3-30.
34. Fujino T, Okuno Y, Nakada D, Aoyama A, Fukai K., Mukai T, Ueho T. (1953) Sobre el examen bacteriológico de la intoxicación alimentaria por *Shirasu*. *Medical Journal of Osaka University*. Vol.4 No.2 / 3 pp.299-304
35. Galli C. (2019) Identificación de *Vibrios* no cólera en macroalgas del género *Ulva* extraídas en la costa este de la República Oriental de Uruguay. Universidad de Buenos Aires- Universidad de Parma. 58p
36. González Ayala S y Cecchini D. (s.f.a). Diagnostico e investigación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por los alimentos. Módulo 2. Enfermedades Bacterianas Transmitidas por Alimentos. OPS/OMS. Disponible en: <https://www.paho.org/arg/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroetas/modulo2/modulo2m.html> Fecha de consulta 5/6/2019
37. González Ayala S y Cecchini D. (s.f.b). Diagnostico e investigación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por los alimentos. Módulo 2. Enfermedades Bacterianas Transmitidas por Alimentos. OPS/OMS. Disponible en: <https://www.paho.org/arg/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroetas/modulo2/modulo2i.html> Fecha de consulta 5/6/2019
38. González Ayala S y Cecchini D. (s.f.c). Diagnostico e investigación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por los alimentos. Módulo 2. Enfermedades Bacterianas Transmitidas por Alimentos. OPS/OMS. Disponible en: <https://www.paho.org/arg/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroetas/modulo2/modulo2j.html> Fecha de consulta 5/6/2019
39. Gutiérrez R., González K., Rivera Y., Acosta Y., & Delange D. (2017). Algas marinas, fuente potencial de macronutrientes. *Revista de Investigaciones Marinas*, 37(2), 16-28 pp.
40. Hara-Kudo, Y., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Hasegawa, J. y Kumagai, S. (2001). Método mejorado para la detección de *Vibrio parahaemolyticus* en mariscos. *Microbiología aplicada y ambiental* 67(12), 5819-5823.
41. Hernández C, Ulloa J, Vergara J, Espejo R, Cabello F (2005) Infecciones por *Vibrio parahaemolyticus* e intoxicaciones por algas: problemas emergentes de salud pública en Chile. *Rev Méd Chile* 2005; 133: 1081-1088
42. Hlady W, Klontz K. (1996) The Epidemiology of *Vibrio* Infections in Florida, 1981–1993, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 173, Pages 1176–1183.

43. Hofer E. (1983) Primeiro isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* no Brasil de infecção gastrointestinal humana. / The first isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* from human gastrointestinal infection in Brazil *Rev. microbiol* ; 14(3): 174-5
44. Hornstrup K., Gahrn-Hansen, B. (1993) Extraintestinal infections caused by *Vibrio alginolyticus* in a Danish county, 1987–1992. *Scand. J. Infect. Dis.* 25, 735–740
45. Ibañez E., Herrero M. (2017). Las algas que comemos. Colección: ¿Qué sabemos de? 81:112 Madrid: Catarata. 112 pp
46. ICMSF (1996) Ecología microbiana de los productos alimentarios. Acribia M ICMSF - Zaragoza-España. 37-40.
47. Johnson N (2013) Fitness Factors in Vibrios: a Mini-review *Crystal Microb Ecol* 65:826–851
48. Kaneko T y Colwell R (1973) Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Journal of Bacteriology*, 113(1), 24-32.
49. Klontz KC, Lieb S, Schreiber M, Janowski HT, Baldy LM, Gunn RA. (1988) Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections. Clinical and epidemiologic features in Florida cases, 1981-1987. *Ann Intern Med.*;109(4):318-323.
50. Leng F, Lin S, Wu W, Zhang J, Song J, Zhong M. (2019) Epidemiology, pathogenetic mechanism, clinical characteristics, and treatment of *Vibrio vulnificus* infection: a case report and literature review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*
51. Letchumanan V, Chan K, Lee L, (2014) *Vibrio parahaemolyticus*: una revisión sobre la patogénesis, prevalencia y técnicas avanzadas de identificación molecular. *Front. Microbiol* 5:705.
52. Leyton, Y; Riquelme, C. (2008) Vibrios en los sistemas marinos costeros *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43(3): 441-456
53. Li L, Wang L, Zhang C, Chen P, Luo X (2018) A case of *Vibrio vulnificus* related wound infection diagnosed by next-generation sequencing. Case report. Published by Elsevier Ltd.
54. López, M (2012). Epidemiología y cinética de crecimiento y supervivencia de *Vibrio parahaemolyticus* en moluscos bivalvos de interés comercial. 2012. ISSN 2254-7606. Universidad de Zaragoza. Tesis doctorado. 261 p.
55. López-Regueiro S, Ramos-Sáiz E. M., López-Picado A., Burgos-Alonso N. y Arana-Salaberría A. (2013). Fitoterapia como coadyuvante en el tratamiento de la obesidad. *Farmacéuticos Comunitarios*, 5(1): 30-38.
56. Lordan S., Ross R. P. y Stanton C. (2011). Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Mar drugs*, 9,1056-1100.
57. Luo G, Huang L, Su Y, Qin Y, Xu X, Zhao L, Yan Q. (2016) flrA, flrB and flrC regulate adhesion by controlling the expression of critical virulence genes in *Vibrio alginolyticus*. *Emerg Microbes Infect.* 3;5(8):e85.
58. Mahmud Z, Neogi S, Kassu A, Wada T, Islam M, Nair B, Ota F (2007). Seaweeds as a reservoir for diverse *Vibrio parahaemolyticus* populations in Japan. *International Journal of Food Microbiology* 118 (2007) 92–96
59. Mahmud Z, Neogi S, Kassu A, Huong B, Jahid I, Islam M, Ota F (2008) Occurrence, seasonality and genetic diversity of *Vibrio vulnificus* in coastal seaweeds and water along the Kii Channel, Japan. *FEMS Microbiol Ecol* 64:209–218

60. Matanjun P, Mohamed S, Mustapha NM, Muhammad K. (2009). Nutrient content of tropical edible seaweeds, *Euclima cottonii*, *Caulerpa lentillifera* and *Sargassum polycystum*. J Appl Phycol; 21: 1-6.
61. McHugh D. (2002). Perspectivas para la producción de algas marinas en los países en desarrollo. FAO, (968) 30p.
62. Mendoza M (1999). Las Macroalgas Marinas Bentónica de la Argentina. Ciencia Hoy, 9(50), 90-98.
63. Ministerio de Salud Pública. (2019). Comunicado sobre Bacteria *Vibrio vulnificus*. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/comunicados/comunicado-sobre-bacteria-vibrio-vulnificus> Fecha de consulta 10/03/2019
64. Miyamoto, Y., Nakamura K & Takizawa K. 1961. Pathogenic halophiles. Proposals of a new genus "Oceanomonas" and of the amended species names. Japanese Journal of Microbiology 5(4): 477-86.
65. Molenda J, Johnson W, Fishbein B, Wentz B, Mehlman I, Dadisman JrT (1972)
66. Gastroenteritis por *Vibrio parahaemolyticus* en Maryland: aspectos de laboratorio. Appl Microbiol. 24 (3): 444-8.
67. Murthy K, Mohanraju R, Karthick P, Ramesh C (2016). Phenotypic and molecular characterization of epiphytic *Vibrio* from the marine macro algae of Andaman Island, India. Indian Journal of Geo-Marine Sciences, 45(2), 304-309.
68. Negri, R. M., Benavides, H. R., & Akselman, R. (2004). Algas del litoral marplatense. en E. E. Boschi & M. B. Coureau (Eds.), La vida entre mareas: vegetales y animales de las costas de Mar del Plata, Argentina (pp. 73–86).
69. Oliver J (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria FEMS Microbiol Rev 34 415-425.
70. Oliver J (2000) The Public Health Significance of Viable but Nonculturable Bacteria en Colwell R and Grimes D Nonculturable Microorganisms in the Environment 16: 277-300p.
71. Olivera, F. & Popovich, N. (2017). Tecnologías de proceso, calidad higienico-sanitaria y comercial de la macroalga *Ulva* spp. Facultad de Veterinaria.
72. OMS (2020) Inocuidad de los alimentos Principales enfermedades transmitidas por los alimentos y sus causas. Disponible en: https://www.who.int/topics/foodborne_diseases/es/ Fecha consulta abril 2020.
73. OMS (2015) Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths> Fecha de consulta: abril 2019.
74. OPS (s.f.). Educación en inocuidad de alimentos: Glosario de términos. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10433:educacion-inocuidad-alimentos-glosario-terminos-inocuidad-de-alimentos&Itemid=41278&lang=en. Fecha de consulta: 5 de mayo de 2019.
75. Park K, Ono T, Rokunda M, Jang M, Okada K, Iida T y Honda T. (2004) Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. Infection and Immunity. 72(11).
76. Paz S, Bisharat N, Paz E, Kidar O, Cohen D (2007). Climate change and the emergence of *Vibrio vulnificus* disease in Israel. Environmental Research, 103, 390-396.

77. Peña E, Palacios M, Álvarez N (2005) Algas como indicadores de contaminación. Ciencias Físicas, Exactas y Naturales. Universidad del Valle. 164p.
78. Quitral, V; Morales, C; Sepúlveda, M; Schwartz, M.(2012) Propiedades nutritivas y saludables de algas marinas y su potencialidad como ingrediente funcional. Revista Chilena de Nutrición, 39(4), 196-202.
79. Rajapakse N, Kim S. (2011) Nutritional and digestive health benefits of seaweeds. Adv Food Nut Res; 64: 17-28.
80. Ramos T., Bertullo V., Giavi M. (1979) Aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* en el Uruguay. Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO), Ministerio de Educación y Cultura.
81. 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, Vol. 121, pp. 1201–1222.
82. Ravikumar, S., Anburajan, L., & Meena, B. (2016). Antibacterial activity of *Ulva reticulata* from southwest coast of Kanyakumari, India. Journal of Coastal Life Medicine Journal Homepage, 4(3), 246–247.
83. Reilly G, Reilly C, Smith E, Baker-Austin C (2011). *Vibrio alginolyticus*-associated wound infection acquired in British waters, Guernsey, July 2011. Eurosurveillance, 16(42).
84. Rivera O, (2010) Bacteriemia relacionada con catéter intravascular por *Vibrio alginolyticus* en un paciente inmunodeprimido. Servicio de Microbiología y Parasitología Hospital Universitario Marqués de Valdecilla Santander. Cantabria Disponible en: <http://www.wider.es/casosclinicos/index.php/bacteriemia-relacionada-con-cateter-intravascular-por-vibrio-alginolyticus-en-un-paciente-inmunodeprimido/>
85. Robert-Pillot A, Copin, Himber C, Gay M, Quilici M. (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 75–8.
86. Rodrigues, D, Hofer E. (1986) Caracterização de espécies do gênero *Vibrio* do ecossistema água-ostra da Baía de Sepetiba, RJ, Brasil / *Vibrio* species from the water-oyster ecosystem of Sepetiba Bay in Rio de Janeiro State, Brazil. Rev. Microbiol 17(4): 332-8, out-dez. 1986. ilus, tab
87. Roig F, Sanjuan E, Llorens A, and Amaro C (2010) pilF Polymorphism-Based PCR To Distinguish *Vibrio vulnificus* Strains Potentially Dangerous to Public Health. Applied and environmental microbiology. 76:5 p. 1328–1333.
88. Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumura, Y., Gao, F., Amin, AKM, Mino, S., y Satomi, M. (2013). Actualización de los clados de *Vibrio* definidos por filogenia de secuencia multilocus: propuesta de ocho nuevos clados y descripción de *Vibrio tritonius* sp. nov. Fronteras en microbiología, 4, 414.
89. Schmidt U, Chmel H, Cobbs C (1979) *Vibrio alginolyticus* Infections in Humans J. Clin. Microbiol. Vol. 10, No. 5 P. 666-668.
90. Strom M S, Paranjpye R N (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. Microbes and Infection, 2(2), 177–188.
91. Su Y, Duan J, y Wu W (2005). Selectividad y especificidad de un medio cromogénico para la detección de *Vibrio parahaemolyticus*. Revista de protección alimentaria, 68 (7), 1454-1456.

92. Tacket C, Brenner F, Blake P. (1984) Clinical features and an epidemiological study of *Vibrio vulnificus* infections. J Infect Dis. 149(4):558-561.
93. Tison D; Nishibuchi M; Greenwood J; Seidler R. (1982). *Vibrio vulnificus* biogroup 2: new biogroup pathogenic for eels. Applied and environmental microbiology. 44. 640-6.
94. Van Ginneken, V., Helsper, J. P.F.G, De Visser, W., Van Keulen, H. y Brandenburg. W. A. (2011). Polyunsaturated fatty acids in various macroalgal species from north Atlantic and tropical seas. Lipids in Health and Diseases, 10, 104.
95. Zamudio M, Henri A, Martínez-Urtaza J, Campos J (2011) Experiencias en la vigilancia epidemiológica de agentes Patógenos transmitidos por alimentos a través de Electroforesis en campo pulsado (pfge) en el Perú. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 28(1): 128-35.
96. Zanetti S, Deriu L, Volterra M P, Falci P, Molicotti G, Fadda, I. Senchi. (2000). Virulence factors in *Vibrio alginolyticus* strains isolated from aquatic environments. Ann. Ig. 12:487-491.
97. Zavala A; Quiñónez Elsa; Vázquez C. (2005). La vida oscura del *Vibrio alginolyticus*. Revista Digital Universitaria; 6:4. Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art3/art3.htm>