

2ij, 93



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**PATOLOGIA, DIAGNOSTICO Y EPIDEMIOLOGIA
DE LAS GASTROENTERITIS DEBIDAS A
Vibrio parahaemolyticus**

**TRABAJO MONOGRAFICO
Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

p r e s e n t a

GALO GERARDO ORTIZ GARCIA

1 9 8 7



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES HISTORICOS	2
III. GENERALIDADES ACERCA DEL AGENTE ETIOLOGICO	
1. Taxonomía	10
2. Ultraestructura	12
3. Características microscópicas	16
4. Propiedades de Cultivo	
4.1 Características fisiológicas relacionadas con su aislamiento y cultivo en el laboratorio	21
4.2 Cultivo y morfología macroscópica	25
4.2.1 Caldos de enriquecimiento	26
4.2.2 Medios en placa	27
4.3 Cultivo de células en estrés	32
5. Características bioquímicas	39
6. Tipificación	43
7. Métodos de detección y recuento	47
IV. PATOGENICIDAD Y PATOLOGIA	51
A. Relación entre las hemolisinas de <u>Vibrio parahaemolyticus</u> y su patogenicidad	
A.1 Antecedentes	54
A.2 La prueba de Kanagawa	55
A.3 Hemolisinas detectadas en <u>Vibrio parahaemolyticus</u>	60

A.4	La hemolisina termoestable directa	
A.4.1	Purificación	63
A.4.2	Propiedades fisicoquímicas	65
A.4.3	Efecto Arrhenius	66
A.4.4	Propiedades biológicas	
a.	Actividad hemolítica	69
b.	Citotoxicidad	71
c.	Enterotoxicidad	72
d.	Toxicidad letal	74
e.	Respuestas en piel de animales	76
f.	Cardiotoxicidad	77
g.	Receptores de membrana	82
h.	Signos clínicos y su relación con la TDH	85
A.4.5	Métodos de detección	88
B.	Factores asociados a la infección	91
B.1	Inoculación en ratones	93
B.2	Inoculación en conejos	95
B.3	Adherencia de <u>Vibrio parahaemolyticus</u>	100
B.4	Invasividad de <u>Vibrio parahaemolyticus</u>	110
C.	Patología	116
V.	DIAGNOSTICO	
1.	Aislamiento	119
2.	Identificación	122
VI.	TRATAMIENTO	124

VII. EPIDEMIOLOGIA

1. Aspectos ecológicos

1.1 Distribución geográfica	130
1.2 Variación estacional	131
1.3 Correlación con parámetros ambientales	135
1.4 Ocurrencia en mar abierto	138
1.5 Asociación con organismos superiores	140
1.6 Relación con bacteriófagos	141

2. Fenómenos epidemiológicos

145

VIII. DISCUSION

152

IX. CONCLUSIONES

153

X. ANEXOS

157

XI. BIBLIOGRAFIA

168

I. INTRODUCCION

Vibrio parahaemolyticus es un microorganismo halófilo que desempeña funciones importantes en la ecología de los estuarios y cuya posición taxonómica no está aún bien definida. Actualmente, se le ha venido relacionando con frecuentes brotes epidémicos de gastroenteritis en todo el mundo sin haberse esclarecido del todo los mecanismos mediante los cuales provoca las alteraciones.

En países orientales tales como Japón, es responsable de aproximadamente el 70% de los casos de gastroenteritis registradas anualmente y en otros como Estados Unidos, ocupa un lugar entre los principales patógenos entéricos. Sin embargo, en México no se ha establecido su verdadera frecuencia debido a que no se le ha estudiado en la forma apropiada: a pesar de que los métodos microbiológicos que detectan confiablemente a este microorganismo no requieren el empleo de técnicas sofisticadas, su investigación no se lleva a cabo en forma rutinaria, ya que erróneamente, sigue sin considerársele como patógeno importante.

El propósito de este trabajo es dar a conocer esta bacteria, subrayando su relevancia en diferentes aspectos, con la finalidad de dirigir la atención de los bacteriólogos hacia lo que ella representa en lo que se refiere al mantenimiento del equilibrio de ciertos ecosistemas y, principalmente, a la incidencia de los padecimientos intestinales. Cabe mencionar que en nuestro país, un elevado porcentaje de enfermedades entéricas sigue quedando sin diagnóstico, debido al desconocimiento de varios agentes etiológicos y de las técnicas para detectarlos.

Sea esta una invitación para que los infectólogos y la gente relacionada con el campo de la salud consideren en sus estudios a este microorganismo, el cual puede significarse como un importante agente causal de gastroenteritis en México.

II. ANTECEDENTES HISTORICOS

La historia de Vibrio parahaemolyticus se remonta al 21 de octubre de 1950, cuando en los suburbios situados al sur de Osaka, Japón tuvo lugar un brote de envenenamiento alimentario, que provocó la muerte a 20 de las 272 personas que desarrollaron gastroenteritis aguda; en esa ocasión, la causa del envenenamiento fue una pequeña sardina, llamada "shirasu" en japonés (Engraulis japonica Houttuyn), la cual se hierve en agua con sal y es costumbre comerla cuando se encuentra parcialmente seca (43,93).

El 23 de octubre siguiente, el Prof. T. Omura, investigador de Medicina Forense, publicó los principales síntomas clínicos de la enfermedad y sus hallazgos patológicos en ocho casos de autopsia; de los períodos de incubación que observó, el más corto fue de una hora, pero en la mayoría de los casos dicho tiempo fluctuó entre dos y seis horas; respecto a los signos que detectó en todos los pacientes, el primero era un intenso dolor abdominal del cual la mayoría de los enfermos se refería a "una sensación ardiente en el estómago", el segundo era vómito y, el tercero, diarrea de frecuencia variable: muchos pacientes excretaban heces acuosas y en algunos casos sanguinolentas; en ocasiones, se detectó la aparición de fiebre y, los casos más severos manifestaron disnea, taquicardia y cianosis.

Los principales hallazgos patológicos comunes en los ocho casos de autopsia, fueron los siguientes: lesión catarral del estómago, hiperemia del mesenterio, erosión de yeyuno e ileon, congelación de varios órganos incluyendo las glándulas suprarrenales y hemorragia interlobulillar en los pulmones (69).

Con el fin de prevenir nuevos brotes de envenenamiento alimentario, se iniciaron de inmediato los trabajos encaminados a determinar el agente causal, destacando el Dr. Tsunesaburo Fujino entre los investigadores más activos; su sede: el Instituto de Investigación para Enfermedades Microbianas en la Universidad de Osaka (69).

Aunque el "shirasu" utilizado durante sus investigaciones bacteriológicas había sido mantenido en una caja de hielo, se encontraba ya descompuesto y desprendía un fuerte olor a amoníaco; la observación de las muestras al microscopio reveló que se encontraba intensamente contaminado con bacterias (69,93).

Para excluir la posible etiología de microorganismos filtrables (PPIO) y venenos químicos, homogeneizó el "shirasu" en solución salina fisiológica y filtró el homogeneizado a través de dos filtros Berkefeld N. Entonces, inyectó intraperitonealmente en cobayos los filtrados 1 y 2; el animal inoculado con el filtrado 1 murió de peritonitis purulenta, mientras que el segundo no desarrolló síntoma alguno.

Las características de la peritonitis observada en el primer cuyo fueron idénticas a las encontradas en ratones inyectados intraperitonealmente con "shirasu" y resultaron muy similares a las manifestadas por humanos. Sin embargo, al hacer las revisiones pertinentes, encontró que el filtro No. 1 estaba roto y, por ello, había permitido que el agente causal formara parte del filtrado correspondiente. Esto sugería que el pequeño número de bacterias presentes en el filtrado claro era lo suficientemente virulento para matar al cobayo durante la noche (69).

Para efectuar los estudios bacteriológicos centrifugó un extracto de "shirasu" e inoculó el sobrenadante en varios medios de cultivo, los que incubó posteriormente a 37°C, tanto en condiciones aerobias como en anaerobias. No aisló microorganismos de los géneros Salmonella, Clostridium o Proteus pero desarrollaron colonias de lo que en un principio se pensó que serían Lactobacillus y Staphylococcus y, además, bacilos Gram-negativos; éstos producían colonias blanquecinas y opacas que microscópicamente semejaban a Escherichia; sin embargo, un frotis de una colonia, manifestó la presencia de algunas bacterias Gram-negativas con los bordes aumentados y gruesos entre los numerosos bacilos Gram-negativos.

Los intentos por separar ambos tipos de bacterias Gram-negativas presentes en la misma colonia mediante su transferencia a placas de agar fresco fueron infructuosos. Por esta razón, formuló la hipótesis de que una de las dos cepas era patógena y, por tanto, inhibiría el crecimiento de la otra in vivo; por ello, crecería más rápido si se le inculaba en animales.

Así, utilizando ratones, inyectó intraperitonealmente una suspensión de colonias que contenían los dos tipos de bacterias Gram-negativas y varias horas después, cuando se manifestaron los síntomas, tomó muestras del líquido de ascitis y las inoculó intraperitonealmente en otros. Repitió este procedimiento una vez más y pudo constatar que, en un lapso de entre 2.5 y 3 horas, los ratones manifestaron síntomas típicos.

Entonces, inoculó el líquido de ascitis de este último grupo de ratones en placas de agar sangre que se incubaron posteriormente a 37°C durante diez horas y, una vez transcurrido este tiempo, aparecieron dos tipos de colonias: uno de no hemolíticas constituidas por bacilos delgados Gram-negativos que, al someterse

a pruebas bioquímicas manifestaban la producción de ácido y gas en medios con glucosa pero que no hidrolizaban la gelatina y otras que desarrollaban halo de hemólisis, integradas por bacilos gruesos Gram-negativos que se teñían fuertemente en sus extremos, producían ácido pero no gas en medios con glucosa, licuaban la gelatina y eran extremadamente virulentos para los ratones.

Pronto identificó al primer microorganismo como Proteus morganii, pero no pudo relacionar al segundo con alguna bacteria patógena descrita con anterioridad. Esta última era activamente móvil por medio de un flagelo polar simple y sus movimientos recordaban a los de Vibrio cholerae; sin embargo, no reaccionaba con el suero anti-Vibrio cholerae y su eje longitudinal no era curvo, por lo cual se concluyó que no podía pertenecer al género Vibrio (69,93).

Recurriendo tanto al Manual Bergey de Bacteriología Determinativa, 6a. edición, como al artículo de Skerman: "Clave Mecánica para la Identificación Genérica de Bacterias", el investigador clasificó al microorganismo dentro del género Pasteurella y como sus características mostraban semejanza con las de Pasteurella hemolytica, decidió darle el nombre de Pasteurella parahemolytica.

Posteriormente aisló a la misma bacteria del contenido intestinal de una víctima de envenenamiento alimentario y, entonces, junto con sus colaboradores, Okuno, Nakada, Aoyama, Fukai, Mukai y Ueho, anunció el descubrimiento de un nuevo patógeno durante el 25º Encuentro Anual de la Asociación Japonesa de Enfermedades Infecciosas, celebrado en 1951 (69).

En el otoño de 1955, el Dr. Takikawa intercambió impresiones con el Dr. Fujino y le habló de los resultados de los estudios bacteriológicos realizados en el Hospital Yokohama con motivo de un brote de envenenamiento alimentario que involucró a 120 pacientes, de los cuales ninguno murió. Había aislado en placas de agar con NaCl al 4% (generalmente empleadas para aislar estafilococos), un bacilo Gram-negativo dotado de un flagelo polar simple. Sus características eran similares a las de Pasteurella parahaemolytica, pero era halófilo, lo cual no se había analizado con anterioridad para la especie mencionada (43,69).

El alimento implicado en el incidente del hospital era un pepino en salmuera y se especulaba que el agente causal había sido un microorganismo halófilo presente en un pez: la caballa, que había contaminado los pepinos (69,43,93).

En su primera publicación sobre la bacteria, el Dr. Takikawa reportó que su cepa era una "bacteria halófila" y más tarde le dió el nombre de Pseudomonas enteritis, no obstante que reconoció que sus características eran idénticas a las de Pasteurella parahaemolytica (93).

El Dr. Kawakita, miembro del Comité Internacional sobre Nomenclatura de Bacterias, se comunicó con el Dr. Takikawa, manifestándole que, si en realidad pensaba que su microorganismo era idéntico a Pasteurella parahaemolytica, debería respetar el Código de Nomenclatura de Bacterias y, por ello, retener su nombre específico; por tanto, tenía que denominar a su bacteria Pseudomonas parahaemolytica. A partir de entonces, en Japón, el microorganismo se designó "bacteria halofílica patógena" y se investigaron casos subsecuentes de envenenamiento alimentario causados por éste en el consumo de Ika (calamar) y Aji (caballa).

Más tarde, se realizó un estudio en el que Kosuga y Yamaji compararon la cepa EB101 aislada por Fujino con la "bacteria haloflica patógena" de Takikawa, llegando a la conclusión de que ambas pertenecían a la misma especie, aún cuando existían pequeñas variaciones entre ellas, destacando la producción de ácido a partir de arabinosa. Se les detectó un antígeno común, uno cepa-específico y otros termolábiles y termoestables (69).

Un poco después, Miyamoto declaró que el microorganismo debería colocarse en el género Aeromonas debido a que fermentaba la glucosa y así propuso un nuevo género para las bacterias fermentativas halófilas: Oceanomonas. De esta manera sugirió que, tanto los aislamientos clínicos de Fujino, como los de Takikawa y los suyos, fueran incluidos dentro del nuevo género como O. parahaemolytica, O. enteritidis y O. alginolytica, respectivamente (69,43,93).

En 1960, el Ministerio Japonés de Salud y Bienestar organizó un comité especial para investigar a la "bacteria haloflica patógena". De este modo, el grupo de Riichi Sakazaki realizó extensos estudios: examinó 1,072 cepas de bacilos cortos Gram-negativos, los cuales resultaron móviles y exhibían como características la producción de indol, reducción de nitratos, licuefacción de la gelatina, reacción positiva de citocromo-oxidasa y fermentación de la glucosa. Observó que estos halófilos patógenos formaban dos grupos (a los que denominaron biotipos 1 y 2), encontrando que la cepa EB101 aislada por Fujino y la 14 de Takikawa eran idénticas; entonces sugirió que ambas deberían ser clasificadas dentro del género Vibrio y propuso el nombre de Vibrio parahaemolyticus para la "bacteria haloflica patógena" (69,138).

En 1963, Vibrio parahaemolyticus fue subdividido en dos biotipos, designándose oficialmente como "Chohen Vibrio" al biotipo 1 (que en japonés significa vibrio que causa gastroenteritis).

Ese mismo año, se leyó durante una reunión en Japón un artículo publicado por Sakazaki, Iwanami y Fukumi y, en dicha ocasión, Fujino declaró estar de acuerdo en que el microorganismo se asemejaba a Vibrio (69).

Independientemente del trabajo que realizaba el grupo del Dr. Sakazaki, Fujino había iniciado un estudio taxonómico de Pasteurella parahaemolytica: comparó los aislamientos originales, cepas EB101 y EB102 con varias otras de los géneros Vibrio, Aeromonas y Pseudomonas y siguiendo la descripción de Davis & Park llegó también a la conclusión de que el microorganismo debería ser incluido dentro del género Vibrio, depositando las cepas EB101 y EB102 en el ATCC, el 5 de mayo de 1965.

En este aspecto es interesante señalar el hecho de que fue hasta 1974 cuando, en forma conjunta, Fujino, Sakazaki y Tamura propusieron a la cepa EB101 (clasificada con el número ATCC17802), como la cepa tipo de Vibrio parahaemolyticus (70).

En 1965, Zen-Yoji realizó un estudio de taxonomía numérica sobre Vibrio parahaemolyticus, concluyendo que el biotipo 2 debería ser separado de la especie; además, mostró que la frecuencia de su aislamiento en pacientes era extremadamente baja comparada con su alta incidencia en peces, mariscos y equipo usado en cocina para su preparación.

Sakazaki llegó a las mismas conclusiones que Zen-Yoji después de llevar a cabo un estudio de taxonomía numérica en cepas de Vibrio incluyendo algunas de Photobacterium y otras no identificadas de origen marino.

De esta manera, en ese mismo año, Sakazaki nombró al biotipo 2 como Vibrio alginolyticus y reconoció sólo al biotipo 1 como Vibrio parahaemolyticus.

Si bien esta distinción de especies se aceptó desde ese mismo año (1965), el Subcomité de Taxonomía de Vibrios del Comité Internacional de Bacteriología Sistemática la admitió hasta 1974 (85) y, el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática, la reconoció hasta 1984 (13).

III. GENERALIDADES ACERCA DEL AGENTE ETIOLOGICO

1. TAXONOMIA

Las agrupaciones taxonómicas representan asociaciones naturales de microorganismos en virtud de un origen o herencia común; por tanto, los individuos de un mismo conjunto demuestran uniformidad genética. Así, se ha reconocido la necesidad de complementar una clasificación fenotípica con una genotípica y a este tipo de combinación de dos clasificaciones se le ha designado: taxonomía polifásica.

En taxonomía bacteriana se han utilizado dos métodos de análisis del genotipo bacteriano: la determinación de la composición en bases del ácido desoxirribonucleico (% de GC) y las hibridaciones in vitro entre ácidos nucleicos (ADN/ADN o ADN/ARN) de bacterias que pertenecen a especies o géneros taxonómicamente cercanos.

Chargaff (1955) y Lee (1956) demostraron que, en todas las células, el ADN contiene cantidades similares de bases púricas y pirimídicas, pero la relación: $G+C/A+T+G+C$, es constante en el seno de una misma especie y varía de una a otra (22).

En consecuencia, existe una relación entre el valor % de GC de una bacteria y su posición taxonómica.

Tomando en cuenta este criterio, se han observado diferencias entre Vibrio parahaemolyticus y la especie tipo del género, Vibrio cholerae: si bien sus valores % de GC son cercanos (46 ± 1 y 48 ± 1 , respectivamente), su semejanza en estudios de taxonomía numérica es del 66 al 75% que no es alta y puede considerarse como un nivel marginal, apenas aceptable, para coleccionar ambas especies dentro del mismo género (37,46).

además, se ha observado un alto grado de similitud entre bacterias luminosas y Vibrie parahaemolyticus, sugiriéndose que las primeras son representativas de alguna especie muy relacionada con esta última (44,132) y, por otro lado, el carácter halófile de Vibrie parahaemolyticus, sugiere una línea de evolución diferente de la de Vibrie cholerae (44).

Con base en lo anterior y teniendo en cuenta el tipo de flagelación de Vibrie parahaemolyticus (flagelo polar simple en medio líquido y flagelación peritrica en medio sólido), así como su valor % de GC, Baumann lo incluyó en el género Beneckea (Lucibacterium), describe por Campbell en 1954.

Aunque en un principio muchos investigadores aceptaron esta sugerencia, el hecho de que no hubiese en existencia un cultivo de Beneckea labra, especie tipo de este género, impidió efectuar los análisis correspondientes. Este, sumado a que el valor % de GC del género Beneckea (Lucibacterium) es de 45 a 48% y quedaba incluido en el de Vibrie (38 a 51%), provocó que esta posición perdiera fuerza y, al final, dicho género (Beneckea) fuera descartado (21,22,13).

En un estudio epidemiológico, Chatterjee (51) realizó algunos aislamientos de lo que él denominó "biotipos de Vibrie parahaemolyticus", los cuales cumplían con la definición de la familia Brucellaceae y cuyas características manifestaban una posición intermedia entre los géneros Pasteurella y Yersinia.

En consecuencia, sugería una revisión adicional sobre la taxonomía de este microorganismo, con la creación de un nuevo género en la familia Brucellaceae.

Pese a todo, la "bacteria halofílica patógena" aparece en la última edición del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (1984) en la Sección 5: Bacilos Gram-negativos Anaerobios Facultativos, Familia: Vibrionaceae, Género: Vibrio, Especies: Vibrio parahaemolyticus (13).

2. ULTRAESTRUCTURA: ESTUDIOS SOBRE SU COMPOSICION QUIMICA

La pared celular de los microorganismos Gram-negativos tiene una estructura trilaminar que está compuesta de preteínas y lipopolisacáridos (LPS); a su vez, esta última está constituida por un polímero de azúcares unidos covalentemente, fosfatos y lípidos. El LPS se divide en dos fracciones: una cadena lateral de polisacáridos solubles en agua que tiene actividad antigénica O y el lípido A. En los microorganismos entéricos, estas dos subunidades se encuentran unidas por medio de un enlace 2-ceto-3-desoxioctanato (KDO). Por su parte, la cadena lateral polisacárida se subdivide en la estructura antigénica O y el polisacárido central, el cual contiene glucosa, galactosa, heptosa y glucosamina. El lípido A está formado por glucosamina, ácidos grasos esterificados, ácidos grasos hidroxilados, grupos O-acetilo y fosfato (61).

Contrastando con la estructura clásica del LPS, se ha encontrado que el perteneciente a una bacteria marina, Vibrio marinus cepa PS-207, es similar a una mutante entérica R, en la cual no se encuentran presentes la estructura antigénica O ni el polisacárido central. Así, la naturaleza lipofílica de la cubierta celular de las bacterias marinas puede tener un significado ecológico al favorecer su adhesión a los exudados presentes en la superficie de los peces o permitiendo la formación

de agregados en el agua de mar (61).

El interés suscitado por establecer las diferencias bioquímicas y fisiológicas entre las bacterias Gram-negativas marinas y no marinas, ha conducido a estudiar la cubierta celular de Vibrio parahaemolyticus, ya que este microorganismo se aísla predominantemente del ambiente estuarino y, por ello, se le considera como "intermedio" entre las formas marinas y las terrestres (61).

Deneke y Colwell (61) estudiaron la cubierta celular de Vibrio parahaemolyticus encontrando que su LPS era diferente tanto de las mutantes entéricas R como del de la cepa de Vibrio marinus PS-207, dado que:

- Posee una estructura antigénica O
- Su cadena lateral polisacárida tiene un peso molecular mayor
- El LPS puede extraerse con fenol al 45% en vez de la mezcla fenol-cloroformo-éter de petróleo utilizada en el caso de Vibrio marinus
- Los azúcares que constituyen al polisacárido central son diferentes
- La cantidad de lípido A, en relación al LPS total, se encuentra en el rango del de los microorganismos Gram-negativos no marinos.

Por otro lado, estos investigadores encontraron que el LPS de Vibrio parahaemolyticus era similar al de Vibrio marinus, en el sentido de que ambas cepas poseen bajas cantidades de ácidos grasos hidroxilados y, además, una alta proporción molar de fosfatos con respecto a los aminoazúcares presentes en el lípido A; todo ésto, en contraste con las bacterias no marinas.

Estos resultados parecen reforzar la hipótesis de que Vibrio parahaemolyticus ocupa una posición intermedia entre las formas bacterianas marinas y terrestres.

En un trabajo similar, Rietschel (146) estudió los ácidos grasos presentes en el LPS de Vibrio parahaemolyticus, encontrando ácido mirístico, palmítico y 3-hidroxiáurico en cantidades similares, además de un ácido insaturado que identificó tentativamente como ácido palmitoleico. Asimismo, este investigador observó que el principal componente del total de ácidos grasos es el 3-hidroxi mirístico, que se encuentra unido por medio de enlaces amida.

Por su parte Beuchat (20) detectó, además, ácidos dodecanoico, tetradecanoico, hexadecanoico, hexadecenoico, octadecanoico, octadecenoico y, en cantidades menores, dodecenoico, pentadecanoico, heptadecanoico, octadecadienoico y eicosenoico. De igual manera, observó cierta relación entre la composición de ácidos grasos y la resistencia al calor del microorganismo.

Se ha visto que la temperatura de crecimiento y el medio de cultivo afectan la composición de los ácidos grasos en las bacterias Gram-negativas y, del mismo modo, que la composición de ácidos grasos y la temperatura de crecimiento influyen sobre la estabilidad térmica de la bacteria (20). Por tanto, cambios en el medio de crecimiento, son responsables no sólo de diferencias cuantitativas, sino que, en algunos casos, de cualitativas en el espectro de ácidos grasos en las células Gram-negativas.

Así, Beuchat (20) observó un aumento en los niveles de ácido tetradecanoico en células desarrolladas en TSB con NaCl al 7.5%, en comparación con el exhibido por las que habían crecido en concentraciones menores de este compuesto; también detectó que

un aumento en el ácido hexadecanoico, se acompañaba de una disminución en el hexadecenoico conforme se elevaba la temperatura. Estos cambios se asociaban con una mayor resistencia al calor, es decir, mayor resistencia, mientras más grande fuera la relación ác. saturados/ác. insaturados.

Por otro lado, se ha demostrado que las proporciones de ácidos grasos saturados e insaturados afectan la fluidez y permeabilidad de las membranas celulares y que, cuanto mayor es esta relación, menor es la permeabilidad. Sin embargo, la influencia que pueda ejercer esta relación sobre la resistencia al calor, estará sujeta a condiciones de ensayo tales como la temperatura de crecimiento y la concentración de los compuestos del medio de cultivo (20).

En otras investigaciones, Daily (58) detectó una superóxidodismutasa (SOD) en Vibrio parahaemolyticus cuya actividad se encuentra en bajos niveles cuando el microorganismo crece en condiciones de anaerobiosis y se eleva como respuesta a tensiones altas de oxígeno. Este proceso inductivo puede ser de ayuda para el microorganismo cuando se establece en tejidos aerobios, ya que le permite transformar los radicales superóxido en peróxido (transformado posteriormente en agua por medio de la catalasa), aumentando el E_h y creando así focos de infección.

Por su parte, Collins y Knowles (93) reportaron la existencia de un citocromo tipo C en la fracción soluble de extractos libres de células de V. parahaemolyticus que tiene la capacidad de unir monóxido de carbono; su función es desconocida.

3. CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS

A. Morfología

Investigado al microscopio de luz, V. parahaemolyticus aparece como un bacilo recto, en ocasiones curvo y pleomórfico que, en general, no presenta agrupación (aunque ocasionalmente llega a formar cadenas).

Con cierta frecuencia produce esferoplastos, no forma endosporas ni microquistes, es Gram-negativo y, eventualmente, puede manifestar una concentración del colorante en los extremos de células jóvenes en proceso de división. Posee un flagelo polar simple envainado cuando crece en medio líquido y, bajo ciertas condiciones de cultivo, puede sintetizar flagelos peritricos no envainados (13, 93, 37).

B. Flagelación

En general, el arreglo de flagelos en una célula bacteriana es constante dentro de una misma especie; en consecuencia, se le utiliza como una característica taxonómica. La variación en la organización flagelar se ha reportado en un número limitado de bacterias; en 1943, Johnson observó flagelación mixta (flagelo polar y peritricos en la misma célula) en dos bacterias luminosas, Photobacterium sepiac y Photobacterium harveyi (actualmente Vibrio harveyi); en 1950, Houwink observó el mismo fenómeno en una bacteria no identificada; en 1953, Leifson constató este hecho en algunas cepas de Aeromonas; en 1956, Leifson y Sneath demostraron este tipo de flagelación en Chromobacterium spp.; en 1958, Buttiaux y Voisin advirtieron este arreglo para

una bacteria halófila, supuestamente del género Benecke; en 1963, Leifson aisló una bacteria marina con flagelación mixta perteneciente al género Pseudomonas y finalmente, en 1971, Baumann descubrió este tipo de flagelación en V. parahaemolyticus y V. alginolyticus (27, 26, 15).

Baumann reportó que el 95% de las cepas de Vibrio parahaemolyticus analizadas por él, presentaban una flagelación peritrica, además del flagelo polar, cuando crecía en un medio sólido. Yabuuchi (202) confirmó los hallazgos de Baumann, concluyendo que la flagelación de este microorganismo es mixta: polar-peritrica; además, encontró diferencias entre ambos tipos de flagelos, entre las que destacaba la longitud de ondas; para el polar era de 2.53 μ , mientras que para los peritricos era de 1.72 μ . Estas observaciones son muy similares a las efectuadas en flagelos de bacterias marinas fermentativas aisladas del intestino de animales marinos.

Otra diferencia observada entre los dos tipos de flagelos fue que el polar, a diferencia de los peritricos, se encuentra envainado. Esta cubierta es continuación de la membrana externa de la pared celular.

Asimismo, Yabuuchi observó que los flagelos peritricos son fácilmente eliminados del cuerpo bacteriano por medio de agitaciones mecánicas suaves, desintegrándose posteriormente en el medio y, por otro lado, que la acidificación del medio debida a la fermentación de carbohidratos, también destruye a los flagelos peritricos. Estas observaciones sugieren que estos flagelos son más frágiles que los polares.

En dos estudios inmunológicos, Shinoda (162, 163) detectó di-

ferencias antigénicas existentes entre los dos tipos de flagelos de V. parahaemolyticus; en el primero de ellos, logró purificar las flagelinas por medio de electroforesis en un copolímero de cloruro de polivinilo y acetato del mismo compuesto (Pevikon G-870) como medio de soporte y, una vez purificadas, las aplicó a una columna de Sephadex G-200 en forma separada, obteniendo cromatogramas similares; cuando se aplicaban juntas se manifestaba un solo pico, lo cual indicaba que su peso molecular era semejante. Así, por comparación con las posiciones de elución de la albúmina sérica bovina y de la ovoalbúmina, se determinó que su peso molecular era de 40,000 daltons.

Asimismo, determinó algunas propiedades fisicoquímicas de estas sustancias así como su composición de aminoácidos, con lo cual estableció diferencias antigénicas entre los flagelos. En base a ello, pudo explicar el hecho de que la flagelina peritrica pudiera ser eluida con amortiguador de fosfatos al 0.03N, mientras que la polar lo era a una concentración de 0.12N.

En el trabajo subsecuente, Shinoda corroboró las observaciones anteriores y pudo demostrar en forma evidente la diferencia antigénica entre las dos flagelinas por medio de microscopía electrónica; para ello, utilizó anticuerpos conjugados con ferritina, dirigidos contra cada tipo de flagelina y obtuvo como resultado la observación de flagelos "ferritados" con ferritina fácilmente distinguibles en cada uno de los casos (162).

Cabe señalar que, al comparar las longitudes de onda de los flagelos, se encuentran diferencias entre los datos proporcionados: para el flagelo polar, Baumann reporta 1.3 a 1.4 μ y 1.0 μ para los peritricos, Ogasawara y Kuno 1.9 μ para el fla-

gelo polar y DeBoer de 1.5μ (27). Estos datos, aunque presentan semejanza entre sí, difieren de los publicados por Yabuuchi (202).

En 1975, De Boer (26) realizó un estudio comparativo entre V. parahaemolyticus y V. alginolyticus investigando la influencia de factores químicos sobre la flagelación y el desarrollo en forma de enjambre (swarming) de estas especies, encontrando que algunos agentes tenso-activos como las sales biliares y el Teepol, inhiben la formación de flagelos laterales y, en consecuencia, el swarming.

En 1977, Shinoda (164) efectuó una investigación sobre la formación y función de los flagelos peritricos y observó que a 25°C se manifestaban tanto microscópicamente como inmunológicamente; en cambio, cuando el microorganismo se cultivaba a 37°C , el número máximo de este tipo de flagelos se alcanzaba hasta las 6 horas pero, una noche después, no se les detectaba por medio del microscopio e inmunológicamente sólo se advertían pequeñas cantidades. Estos resultados sugieren que los flagelos laterales, a temperaturas superiores a las del medio ambiente (37°C en adelante), llegan a desprenderse espontáneamente de las células y se descomponen en el medio. A este respecto, De Boer (27) reporta hallazgos similares.

Asimismo, Shinoda (164) observó que la síntesis de flagelos laterales se inhibe inmediatamente cuando se transfiere el microorganismo de medio sólido a líquido y que, además, estos organelos no se forman a bajas concentraciones de agar en el medio (0.3%), en las cuales, poseyendo un flagelo polar, los microorganismos se mueven fácilmente. Así, parece que la formación de flagelos peritricos es una especie de adaptación de

las células a su medio ambiente. A partir de muestras clínicas se han aislado mutantes que poseen flagelo polar pero no peritricos y estas cepas no desarrollan swarming en medio sólido; con ello puede concluirse que el flagelo polar es un órgano de locomoción exclusivo para medio líquido.

En 1979, Kimura (102) llevó a cabo un estudio sobre el efecto del pH del medio sobre la flagelación de V. parahaemolyticus y observó que, la mayoría de las cepas analizadas, suspendía la formación de flagelos peritricos a pH 8.5 y, en todos los casos, a pH 9.0. Por tanto, puede establecerse que la flagelación peritrica se conserva en condiciones ácidas o neutras, mientras que la polar no se ve afectada a ningún valor de pH.

En 1982, Belas y Colwell (15) observaron el swarming de Vibrio parahaemolyticus por medio de microscopía electrónica de barrido, encontrando que el flagelo polar tiene un diámetro de 24 a 30 nm y está constituido por un "corazón" de 14 a 16 nm cubierto por una vaina, mientras que los laterales no se encuentran envainados y tienen un diámetro de 14 a 15 nm.

El swarming depende de un gran número de factores, tales como la temperatura, el pH, la concentración de agar y la concentración de NaCl en el medio.

Por otro lado, advirtieron que en la zona de swarming, estas bacterias aparecen de varios tamaños que van desde 1.5 μ hasta cinco o seis veces esa magnitud y, además, que la producción de flagelos laterales es mayor en las bacterias presentes en la zona de swarming que en las que se encuentran en los límites de la zona. El movimiento a través del agar puede dar como resultado la pérdida de los flagelos laterales por "rasuración", lo cual podría explicar su ausencia en los microorganismos en-

contrados fuera de la zona de swarming. Sin embargo, se ha su-
gerido que el swarming es inducido por productos metabólicos
de desecho originados por la bacteria durante su crecimiento
en el agar. Es posible que uno de estos productos induzca la
formación de flagelos laterales en la masa de enjambre de las
bacterias, pero una vez que éstas se alejan de la periferia
del swarming, los flagelos laterales no pueden ser reemplazados
ya que la concentración del inductor metabólico ha caído por
debajo del nivel necesario para estimular su producción.

4. PROPIEDADES DE CULTIVO

4.1 Características Fisiológicas Relacionadas con su Aislamiento y Cultivo en el Laboratorio

Uno de los principales rasgos fisiológicos de Vibrio parahaemolyticus es, sin duda, su carácter halofílico, catalogándosele en este sentido como halófilo moderado (93), ya que presenta crecimiento cuando las concentraciones de NaCl en el medio van de 0.1M a aproximadamente 1.2M, siendo la óptima de 0.5M. Sin embargo, si se aplicara la clasificación de Larsen (111), esta bacteria quedaría comprendida entre los microorganismos levemente halófilos cuyo nivel óptimo de NaCl en el medio es de 2 a 5%, ya que este autor considera como halófilos moderados a aquéllos que presentan máximo desarrollo a concentraciones de 5 a 20% de NaCl y como halófilos extremos a los que manifiestan un mejor crecimiento en rangos de 20 a 30% de NaCl.

Así pues, aún cuando V. parahaemolyticus exhibe cierta halotolerancia (hasta un 8%), se ha determinado que su concentración

óptima de NaCl es 0.5M, es decir, de 3% (150,189,126), aunque puede reducirse considerablemente al emplearse otros cationes tales como el Li⁺ y el K⁺. Por ejemplo, Rottini (150) encontró que al utilizarse K⁺ 0.103M y Li⁺ 0.17M, los requerimientos de Na⁺ disminuían hasta 0.007M.

En un trabajo similar, Morishita (126) obtuvo resultados semejantes; observó que el requerimiento mínimo de Na⁺ era de sólo 0.003M si en el medio se encontraba presente Li⁺, el cual manifiesta una acción preventiva en la lisis de bacterias marinas, ya que proporciona fuerza iónica y regulación osmótica adecuadas; estos resultados sugieren que el Li⁺ puede proteger la estructura celular y, bajo esas condiciones, su presencia puede ser importante en la incorporación de aminoácidos a la célula, proceso en el que se requiere en forma específica ión sodio. Además, este último parece indispensable en la síntesis proteica ya que se ha demostrado que ésta se suspende al cultivarse al microorganismo en medios que no lo contienen, aún cuando posean agentes osmóticos.

En un estudio en el que se investigó el papel del sodio en la fisiología bacteriana, Sakai y Sakai (93) encontraron que un grupo de bacterias marinas, al que denominaron TH (halófilos terrestres) y en el que se incluía a V. parahaemolyticus, presentaba semejanzas con otro establecido por ellos, al que designaron MH (halófilos marinos) y que cumplía con la siguiente descripción:

Las bacterias del tipo MH requieren Mg⁺⁺ para efectuar la oxidación de substratos; sin embargo, este catión no puede substituir al Na⁺ en otros procesos fisiológicos. De hecho, el Na⁺ previene la lisis celular y acelera a la citocromo oxidasa, la cadena de transporte de electrones y la formación

de ATP en la fosforilación oxidativa. Por otra parte, cumple también una función relevante en el transporte activo de nutrimentos dependiente de Na^+ y K^+ , al interior de la célula; por su parte, el K^+ es necesario sólo de manera accesoria y siempre en presencia de Na^+ . Consecuentemente, el tipo MH requiere, en forma indispensable, al Na^+ como único catión para su crecimiento. Además, este grupo pertenece a las bacterias psicrófilas, ya que pierde su capacidad de crecimiento al alcanzarse temperaturas de 37°C .

Las características que diferencian al tipo MH del TH, pueden resumirse así: en el tipo TH el requerimiento de Na^+ es menor que para el MH en la prevención de la lisis, la oxidación de sustratos, el sistema de transporte de electrones, la citocromo oxidasa y el desarrollo. Además, el tipo TH es capaz de crecer bien a 37°C y, por tanto, pertenece a las bacterias mesófilas.

Larsen (111) agrupó a los microorganismos halófilos en tres categorías: el grupo 1 está constituido por bacterias que tienen requerimientos específicos de Na^+ y Cl^- , el 2 por los que tienen requerimientos específicos de Na^+ pero no del anión y, por último, el grupo 3, cuyos miembros no muestran requerimientos específicos para el catión ni para el anión. Por tanto, en base a los datos obtenidos por varios investigadores, Vibrio parahaemolyticus podría incluirse en el grupo 2 de Larsen. Sin embargo, en 1981, Palasuntheram (140) realizó un estudio en el que observó que V. parahaemolyticus podía mantener su crecimiento en presencia de otros cationes tales como K^+ y Mg^{++} , si bien lo realizaba en forma lenta y, en base a sus resultados, sugirió que este microorganismo debería ser incluido en el grupo 3 de Larsen y no en el 2.

En cuanto a la variación de respuesta que puede presentar un microorganismo hacia la sal, en cantidad o calidad, Larsen aconseja precaución extrema para asegurarse de que la cepa que responde en forma distinta, sea en verdad la descendiente de la bacteria que originalmente fue puesta a prueba. Establece que hay una gran posibilidad de que una aparente adaptación sea, en realidad, la selección de un microorganismo diferente (111).

Otra característica importante en la fisiología de Vibrio parahaemolyticus es su temperatura de crecimiento, este microorganismo crece en el rango de temperatura típica de los mesófilos con una mínima entre 9 y 10°C, una máxima de 44°C y una óptima de 35 a 37°C (88,189).

La interacción conjunta de pH, temperatura y concentración de sal, da como resultado una ligera alteración en la temperatura límite para crecimiento; Beuchat (18) reportó un crecimiento moderado a 5°C cuando el medio se encontraba a pH alcalino y Covert (50) observó una temperatura máxima de desarrollo a 48°C, cuando el medio poseía concentraciones elevadas de NaCl.

Por otro lado, el rango de pH para el crecimiento de Vibrio parahaemolyticus es muy amplio, ya que desarrolla desde pH 5 hasta 11, siendo su óptimo entre 7.5 y 8.0 (189,18).

La capacidad de este microorganismo para crecer a pH elevado se ha aprovechado en el diseño de medios selectivos para su aislamiento.

Otro rasgo fisiológico característico de Vibrio parahaemolyticus es su tiempo de generación, el cual es extremadamente corto. Katoh (93) reportó valores de 8 a 9 minutos; por su parte, Ulitzur (191), en un estudio que incluyó 30 cepas de esta es-

pecie, detectó la existencia de dos grupos basándose en el tiempo de generación: el primero exhibía uno corto, de 12 a 14 minutos, mientras que el segundo manifestaba un tiempo mayor, de 20 a 25 minutos. No obstante, los tiempos más comúnmente observados van de 9 a 11 minutos (166).

4.2 Cultivo y Morfología Macroscópica

Vibrio parahaemolyticus ha capturado el interés de los microbiólogos en muchos campos, entre los que destacan el médico, el alimentario y el ecológico y, como resultado de ello, se ha desarrollado un gran número de métodos específicos para lograr su aislamiento, enriquecimiento y recuento (193).

La mayoría de las técnicas comprenden la inoculación directa de las muestras en medios que contienen agar o el enriquecimiento inicial en caldo, seguido de la siembra por estría para obtener el consecuente aislamiento en los medios sólidos adecuados. En la mayoría de los casos, la siembra directa es suficiente para las muestras fecales, pero las de alimentos y las colectadas del medio ambiente con frecuencia (no siempre) requieren un enriquecimiento previo. Algunos procedimientos contemplan incubaciones especiales a temperaturas elevadas (42 a 43°C) o bajo condiciones anaerobias, con el fin de proveer una selectividad adicional. Una vez aisladas, las colonias típicas de Vibrio parahaemolyticus se escogen y examinan utilizándose una serie de pruebas bioquímicas, fisiológicas y serológicas. En los casos en los que no sea posible efectuar el procesamiento inmediato de las muestras, éstas pueden congelarse, pero debe tomarse en cuenta el riesgo de estrés o incluso de la muerte de las células. Por ello, se recomienda el empleo de medios de transporte tales como el de Cary-Blair o el descrito por LeClair (93).

4.2.1. Caldos de Enriquecimiento

Las contribuciones iniciales a la metodología destinada al aislamiento y recuento de V. parahaemolyticus, las efectuaron investigadores japoneses, quienes diseñaron medios de enriquecimiento empleando agentes tales como el Teepol (detergente neutro), las sales biliares, colorantes, altas concentraciones de sal y pH's alcalinos.

Entre ellos, destaca el caldo glucosa-sal-Teepol (GSTB), el cual contiene, además del detergente, violeta de metilo y posee un pH final de 9.4. Este medio fue modificado posteriormente, substituyéndose el Teepol por lauril sulfato (12). Sin embargo, el caldo de Horie, con arabinosa, violeta de etilo y pH de 8.6, proporcionó valores diez veces más elevados en la técnica del Número Más Probable, cuando se le comparó con el GSTB (93). Posteriormente, el medio de Horie fue modificado por Kaper (99), quien substituyó la arabinosa por galactosa.

Otros caldos de enriquecimiento son el medio SWYE de Kaneko y Colwell (98) y el sal-colistina de Sakazaki (153). Kampelmacher (93) propuso uno a base de sal-Polimixina B (SPB) que posteriormente fue modificado por Sakazaki (153); Kristensen (107) utilizó con éxito un caldo de carne con NaCl al 7% y sulfonato de alquil benceno al 0.3%, al cual adicionó almidón y quitina.

Thompson y Trenholm (93) emplearon el caldo sulfito de bisulfuro rojo fenol (BSFR), el cual contiene además sacarosa, NaCl y manitol. Vanderzant y Nickelson (193) utilizaron caldo Trypticase Soya (TSB) suplementado con NaCl al 7% con una incubación de 8 a 12 horas, pero posteriormente sembraron en agua peptonada alcalina salina como un segundo enriquecimiento; con ese mismo objetivo, Sakazaki (153) utilizó el caldo de Monsur (telurito-sal-bilis).

Un estudio llevado a cabo en moluscos de las costas holandesas, incluyó la comparación de cinco caldos de enriquecimiento, llegando a la conclusión de que el caldo de carne con NaCl al 5% diseñado por Kampelmacher, incubado a 37°C, proporcionaba los mejores resultados (33).

Otro estudio realizado por Nakanishi y Murase (130), demostró que el SPB proporciona los mejores índices de detección cuando se investigan muestras de pescado crudo.

Para el mismo fin, Chun reportó un medio simple que contiene Teepol y NaCl al 3% en un amortiguador de fosfatos (93) y Beuchat (16) ha utilizado con éxito el caldo azul agua-amarillo alizarina suplementado con Teepol.

4.2.2. Medios en Placa

Una gran variedad de medios en placa, muchos de los cuales se desarrollaron originalmente para el aislamiento de Vibrio cholerae se han empleado con éxito en la investigación de Vibrio parahaemolyticus.

Indudablemente, el más comúnmente usado es el medio tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa (TCBS), desarrollado por Kobayashi (153); éste inhibe a un gran número de especies bacterianas (principalmente de la flora fecal), debido a la presencia de sales biliares y citrato de sodio y a que posee un pH alcalino de 8.6. Además, aporta una buena diferenciación preliminar de las especies de Vibrio en base a la reacción de fermentación de la sacarosa, ya que V. cholerae y V. alginolyticus fermentan este azúcar y producen colonias amarillas y, en general, Vibrio parahaemolyticus no utiliza este carbohidrato, por tal motivo, sus colonias son azules o azul verdosas.

Aunque el TCBS es un medio útil para el aislamiento de Vibrio cholerae y Vibrio parahaemolyticus, su selectividad no es muy alta y, por ello, no siempre impide el crecimiento de otros microorganismos tales como Proteus spp., Aeromonas spp. o Staphylococcus spp.

Para investigar su efectividad, Lotz (116) llevó a cabo un estudio en el que empleó 188 cepas diferentes pertenecientes a 31 especies bacterianas aisladas de muestras clínicas y marinas, así como a algunas de colección, obteniendo los siguientes resultados: 177 cepas crecieron en el medio, nueve especies produjeron las típicas colonias amarillas propias de V. cholerae y otras nueve, colonias verdes que semejaban a V. parahaemolyticus o V. vulnificus. De esta manera, quedó demostrada su limitada selectividad.

Por otro lado, no siempre se logra la diferenciación entre las especies patógenas de Vibrio y otras pobremente caracterizadas encontradas en el ambiente acuático.

Por estas razones, se han efectuado modificaciones al medio TCBS, tales como la elevación del contenido de NaCl (127), la adición de sulfonato de alquil benceno (107) o de algunos derivados de las sales biliares (75), obteniéndose resultados satisfactorios.

Al compararse distintas marcas comerciales del mismo medio, se ha observado que, a este nivel, existe también una variación significativa en la selectividad (93).

Se han desarrollado otros medios selectivos, varios de los cuales utilizan la fermentación de la sacarosa como característica diferencial. Así, por ejemplo, el medio azul de bromotimol-Teopol también conocido como agar de Akiyama (93), incluye al detergente como agente inhibitorio; Sakazaki lo modificó substituyendo el

Teepol por heptadecil sulfato de sodio (Tergitol 7), haciéndolo más selectivo. También se ha observado que el Teepol puede ser reemplazado por lauril sulfato (107).

El agar polimixina-tylosin-sal-sacarosa (PTSS) proporciona una diferenciación aceptable de las especies de Vibrio mediante la fermentación de la sacarosa y fundamenta su selectividad en el empleo de antibióticos en lugar de los detergentes (93).

En el agar azul agua-amarillo alizarina (WA) se incorporan los colorantes azul agua y amarillo alizarina en un medio adecuado para distinguir entre V. parahaemolyticus y V. alginolyticus; además de los indicadores, este medio contiene extracto de carne de res, peptona, NaCl, Teepol y sacarosa. La fermentación de esta última por parte de V. alginolyticus, da como resultado una reducción en el pH del medio, provocando que el agar adquiera un matiz azul debido al viraje del colorante azul agua. Por otro lado, la alcalinización del medio por parte de V. parahaemolyticus da como consecuencia un color amarillo naranja, causado por la acción del pH sobre el amarillo alizarina (93).

Horie (83) empleó un carbohidrato fermentable distinto de la sacarosa y diseñó el medio arabinosa-sulfato de amonio-colato (AAC) el cual contiene colato de sodio y posee un pH de 8.6. Desafortunadamente, los resultados de éste no son óptimos, ya que la fermentación de la arabinosa es una característica variable en la especie.

Por su parte, Watkins (200) diseñó su medio utilizando colato de sodio para inhibir el crecimiento de microorganismos Gram-positivos, galactosa como carbohidrato fermentable y sulfato de cobre con el fin de impedir el desarrollo de V. alginolyticus, especie que se encuentra estrechamente relacionada con V. parahaemolyticus.

cus y que en el medio ambiente existe en mayor número que este último.

Baross y Liston (6) crearon un medio no selectivo, empleando la hidrólisis del almidón como característica diferencial; no contiene agentes inhibidores, el pH se ajusta a 7.5 y las placas inoculadas se incuban en una jarra de anaerobiosis a 37°C, durante 36 a 48 horas; las muestras que contienen cantidades grandes de Bacillus spp. deben tratarse previamente con penicilina (20 U/ml), con el fin de lograr un mejor desarrollo de Vibrio spp.

Twedt y Novelli (193) llevaron a cabo un estudio sistemático de los medios propuestos para el aislamiento de V. parahemolyticus así como de sus componentes; de esta manera, se comprobó que la penicilina incorporada a los medios con pH alcalino era más útil que un buen número de los agentes selectivos sugeridos con anterioridad, entre los que se cuentan el telurito de potasio, desoxicolato de sodio, Teepol y NaCl al 6%.

Así, desarrollaron un medio que utilizaba la hidrólisis del almidón como característica diferencial y cuya formulación incluía peptona al 2%, extracto de levadura al 0.2%, almidón de maíz al 0.5%, NaCl al 3%, penicilina (2 U/ml) y agar al 1.5%, ajustando se su pH a 8.0.

Subsecuentemente, Vanderzant y Nickelson (193) realizaron un estudio comparativo, analizando los siguientes medios de cultivo: Staphylococcus 110 con penicilina (5 U/ml), agar Infusión Cerebro Corazón con NaCl al 5%, agar BHI con tetrametil-p-fenilendiamina al 0.1%, agar sulfito de bismuto, agar verde brillante-sulfadiazina, agar telurito-polimixina-yema de huevo, medio de Baross y Liston, medio de Twedt y Novelli con NaCl al 5% y sales biliares al 0.2%, medio de Twedt y Novelli con cristal

violeta (0.0001%), medio de Twedt y Novelli con almidón de maíz al 1%, NaCl al 7% y penicilina (10 U/ml) y, por último, el medio de Twedt y Novelli con almidón de maíz al 1% y NaCl al 7%, pero sin penicilina.

Tras efectuar el análisis de los resultados, llegaron a la conclusión de que el medio de Twedt y Novelli con ligeras modificaciones (almidón de maíz al 1% y NaCl al 7%), era el más apto para el aislamiento selectivo de V. parahemolyticus; en él, el microorganismo desarrolló colonias circulares, planas, de color blanco cremoso y manifiesta una reacción amilasa positiva.

Debido al alto costo y gran dificultad de obtener el agar TCBS en algunos países como la India (actualmente también México), varios investigadores han diseñado medios de cultivo más simples y, por lo mismo, menos caros. Así, S. P. De (93) reporta que el agar VP de Kaper (99) con taurcolato de sodio y lauril sulfato de sodio, posee propiedades similares al TCBS; del mismo modo, Chatterjee (52) publicó sus resultados con el agar sacarosa-teepol-telurito (STT), el cual contiene peptona, extracto de carne de res, Teepol, telurito de potasio, sacarosa, azul de bromotimol y agar.

En los Estados Unidos no es difícil obtener el TCBS pero no todos los laboratorios, especialmente los clínicos, lo trabajan de rutina.

Algunos investigadores tales como Carruthers (41), reportan resultados satisfactorios usando medios más comunes como el manitol-sal-agar y Roland (149) recomienda el xilosa-lisina-desoxicolato (XLD) suplementado con NaCl al 1.5% y almidón al 0.5%, como adecuado para el aislamiento del microorganismo.

Teniendo en cuenta la limitada selectividad y capacidad diferencial del agar TCBS, Kourany (104) diseñó un medio para el aislamiento e identificación de V. parahaemolyticus, considerando que la continua presencia de V. alginolyticus en las muestras, puede ocultar su crecimiento. Este medio (TSAT) lleva, por cada litro de agua destilada, 40 g de agar soya tripticase, 25 g de NaCl, 20 g de sacarosa, 0.5 g de sales biliares y 3 ml de una solución de cloruro de trifeniltetrazolio al 1%, ajustándose su pH a 7.1; la diferenciación se basa en el color y tamaño de las colonias; las del primero son rojo brillantes, mientras que las del segundo son blancas, más pequeñas y ocasionalmente, presentan un pequeño centro rosado. Una desventaja de este medio es que Proteus spp. desarrolla colonias indistinguibles de las de Vibrio parahaemolyticus.

Pese a todo, Sakazaki recomienda la táctica empleada por Nakaniishi, Murase y Teramoto en el aislamiento e identificación de esta bacteria, consistente en una combinación del caldo sal-poli mixina y el agar de TCBS, ya que así no hay necesidad de identificar bioquímicamente las colonias obtenidas en el agar; sin embargo, esta opción no se recomienda para aquéllos cuya experiencia con V. parahaemolyticus no sea amplia (153).

4.3 Cultivo de Células en Estrés

Los microbiólogos de alimentos han examinado detalladamente los problemas relacionados con el daño causado a Vibrio parahaemolyticus por la acción del frío y el calor; este aspecto es interesante debido a que los alimentos de origen marino son preservados mediante refrigeración o congelación y, la mayoría, se cocen bien o por lo menos se calientan antes de ser consumidos.

Un hecho ampliamente comprobado es que V. parahaemolyticus es sensible al frío cuando se encuentra presente en los alimentos y el agua (50,115,30); varios estudios han demostrado que si bien un cierto porcentaje de los vibrios que se encuentran en alimentos refrigerados o congelados pierden viabilidad, una gran cantidad de los sobrevivientes sufren un daño subletal y se muestran altamente sensibles a los medios que contienen agentes tenso-activos. En tales condiciones, los microorganismos dañados generalmente no pueden reparar su anomalía y se manifiestan como no viables pues, cabe subrayar, los métodos comúnmente utilizados para la detección de esta bacteria recomiendan el empleo de varios medios selectivos que contienen agentes tenso-activos, los cuales evidentemente, están diseñados para el cultivo de células normales pero no para aquéllas que se encuentran dañadas subletalmente (196).

Ya que Vibrio parahaemolyticus es un microorganismo halófilo, concentraciones óptimas de sal pueden incrementar su resistencia a las condiciones desfavorables. Tamayo (50) estudió en Japón la prevención de los brotes de envenenamiento alimentario causados por esta bacteria y observó que el NaCl, en una concentración de 5 a 7%, podía aumentar su sobrevivencia en extractos alimenticios durante su almacenamiento a -18°C por períodos cortos (4 días).

Asakawa (50) reportó una disminución más considerable en la cantidad de V. parahaemolyticus a -10°C que a -20°C en medios de cultivo de laboratorio y, por otro lado, al inocular carne de atún con este microorganismo, encontró que la sobrevivencia era casi la misma tanto a -20°C como a -10°C y que, en ambos casos, resultaba mayor que a 0°C .

Sin embargo, V. parahaemolyticus sobrevive bajo condiciones de venta, ya que el microorganismo se ha aislado repetidamente de muestras de marisco comercial. Vanderzant y Nickelson (194) establecen que al almacenarse camarón completo inoculado durante 8 días y a temperaturas de 10 a -18°C , se reduce el número inicial del microorganismo; en su estudio comprobaron que después de ese tiempo sólo prevalecen cerca de 10^3 células por camarón, cuando en principio la población era de 10^5 . Esto concuerda con otros reportes que afirman que V. parahaemolyticus puede ser recuperado tanto del camarón como del sedimento marino congelados.

Las células expuestas al frío sufren daño a nivel de membrana celular, el cual se acompaña de un incremento en la permeabilidad a los agentes tenso-activos (32); por esta razón, Ray (143) sugiere que a las células dañadas por el frío, se les permita entrar a una "fase de reparación" en un medio no selectivo, para eliminar así el efecto inhibitorio de los agentes selectivos.

Aunque V. parahaemolyticus se multiplica mejor en medios que contienen NaCl al 3%, se ha detectado que las células dañadas subletalmente son sensibles a tal ambiente. En consecuencia, Ray utiliza como medio de reparación (no selectivo) el caldo Soya fripticase (TSB), que contiene una salinidad de 0.5% y, una vez que ha transcurrido la "fase de reparación" y entran en la "fase de multiplicación", las células pueden exponerse a un ambiente de mayor salinidad tal como el TSB suplementado con NaCl al 3%.

Este cambio puede efectuarse después de una o dos horas de in-

incubación a 35°C y, posteriormente, se emplea el caldo Glucosa-Sal-Teepol (GSTB) para lograr un enriquecimiento selectivo; de este modo, un número muy pequeño puede llegar a ser hasta de 10⁶/ml en el GSTB, tras 6 horas de incubación a 35°C.

Este último medio también lo recomienda Dupray (63), aunque esta investigadora aconseja una incubación de 8 horas.

Ma-Lin (117) pudo comprobar la mayor susceptibilidad de estas células hacia la sal, mediante la inoculación de bacterias (que habían sido expuestas a 3°C durante media hora) en TSB suplementado con NaCl al 8%.

Una de las causas por las que estas células exhiben una mayor sensibilidad hacia diversos agentes, es que sus barreras de permeabilidad no son lo suficientemente efectivas para evitar la entrada de antimetabolitos. Asimismo, los agentes tenso-activos presentes en algunos medios, en concentraciones inocuas para células normales, resultan perjudiciales para las que han sido previamente dañadas. Por ejemplo, el Teepol a una concentración ordinaria (0.4%), inhibió en forma determinante el recobro de este tipo de células (117).

En otro estudio donde se registraba espectrofotométricamente el crecimiento de células dañadas por el frío, pudo apreciarse que algunas sales de hierro y magnesio estimulaban el proceso de reparación (117).

Se ha reportado que el Mg⁺⁺ actúa en forma cooperativa con el Na⁺ en la prevención de la lisis en V. alginolyticus, ya que proporciona estabilidad a la membrana celular y es necesario para la actividad de ciertas enzimas involucradas en los procesos de reparación de este microorganismo (192).

En el estudio de Ma-Lin (117) pudo observarse que las células dañadas por el frío se beneficiaban al agregarse concentraciones altas de Mg^{++} en el medio de recuperación.

Por otro lado, las concentraciones micromolares de Fe^{3+} dieron resultados similares a los obtenidos con Mg^{++} a concentraciones milimolares, mientras que el Fe^{++} , en general, fue ineficaz.

Al tratar de recuperar V. parahaemolyticus de ostras refrigeradas, las cuentas resultaron notablemente inferiores que en estudios de cultivo puro; sin embargo, se pudo apreciar el efecto benéfico del Mg^{++} y del Fe^{3+} en los medios de recuperación.

Por lo que se refiere a las células dañadas por el calor, se sabe que el deterioro de la membrana se acompaña por una salida de constituyentes intracelulares tales como proteínas, aminoácidos, enzimas y ácidos nucleicos. Heinis (79) realizó una serie de estudios con el fin de obtener información acerca de la recuperación de V. parahaemolyticus afectado por este agente físico.

Observó que el 2,4-dinitrofenol (que actúa como desacoplante de la fosforilación oxidativa), era inefectivo en contra del microorganismo, si bien era necesario que el medio contuviera glucosa.

Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Pierson (79) quien había experimentado con S. typhimurium en un medio que contenía citrato como única fuente de carbono, pero no en uno con glucosa.

Heinis empleó el medio TSB que contiene este último carbohidra-

to; de esta manera, aunque la fosforilación oxidativa esté bloqueada , puede generarse el suficiente ATP por fosforilación a nivel de sustrato, estimulando así la recuperación.

Asimismo, Heinis constató que la síntesis de pared celular es un paso crítico al recuperar al microorganismo; para ello empleó cicloserina, la cual inhibe las actividades de la alanina racemasa y de la D-alanina sintetasa, bloqueando por tanto, la incorporación selectiva de D-alanina en el péptidoglicán de la pared celular.

Se pudo observar que otro de los procesos involucrados durante los primeros 90 minutos de la recuperación es la síntesis proteica. Esto se comprobó al utilizar sulfato de kanamicina, sustancia que inhibe este proceso al actuar sobre la subunidad 30 S ya sea durante su iniciación, elongación o terminación.

El continuo efecto inhibitorio de la rifampicina y la actinomicina D, observado por Heinis, indica que la síntesis de ARN_m es necesaria en el período de recuperación, sobre todo en los primeros 30 minutos después del daño.

Durante el tratamiento térmico se daña en forma considerable la capa polisacárida de la célula, que normalmente protege a la capa lipoproteica de la membrana contra la acción lítica del lauril sulfato y del desoxicolato de sodio.

Al igual que Ma-Lin (117), Heinis observó que el Mg^{++} está fuertemente implicado en los mecanismos de reparación, ya que este ión no sólo no abandona a la célula durante el tratamiento térmico, sino que además, las células así dañadas requieren niveles elevados del mismo durante su proceso de reparación; por otro lado, este requerimiento es inmediato (dentro de los primeros 30 minutos). Esto llevó a Heinis a sugerir la utilidad

de adicionar Mg^{++} a los medios usados para la recuperación de Vibrio parahaemolyticus en alimentos procesados (79).

Si bien Heinis (79) utiliza como medio de recuperación al TSB con NaCl al 3%, Vanderzant (196) recomienda el TSB con NaCl al 7% (para los homogeneizados refrigerados), junto con el agar modificado de Twedt y Novelli.

Sin embargo, en un estudio comparativo, Beuchat (19) advirtió que estos medios, al igual que el GSTB, son menos eficientes que el caldo arabinosa-violeta de estilo (HARB) y el caldo azul agua-amarillo alizarina (WA) para recobrar células dañadas por frío o calor.

La recuperación de Vibrio parahaemolyticus a partir de homogeneizados de ostión con varios medios de enriquecimiento se ve limitada no sólo por factores tales como agentes tenso-activos, pH y sales inorgánicas, sino también por la microflora natural presente a la hora del análisis. Se ha visto, por ejemplo, que ciertas especies de Pseudomonas aisladas de ostiones, reprimen el desarrollo de Vibrio parahaemolyticus (117).

Pese a todo, la omisión de Mg^{++} o de Fe^{3+} , o de ambos, en los medios de enriquecimiento, puede conducir a una subestimación del grado de contaminación por este microorganismo en los alimentos de origen marino, refrigerados o congelados.

5. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

Varios investigadores han proporcionado gran información acerca de las características bioquímicas de V. parahaemolyticus. Este microorganismo es un facultativo que posee ambos metabolismos: respiratorio y fermentativo; produce una catalasa y una citocromo oxidasa, fermenta la glucosa en forma anaeróbica y no produce acetoina, es decir, es negativo para la prueba de Voges-Proskauer; también fermenta galactosa, levulosa, maltosa, manitol, manosa, ribosa y trehalosa. En contraste, no fermenta adonitol, dulcitol, eritritol, inositol, lactosa, melizitosa, rafinosa, ramnosa, salicina, sorbosa, sorbitol, sacarosa y xilosa.

La variación de cepa puede observarse analizando la fermentación de arabinosa, celobiosa y melibiosa.

Vibrio parahaemolyticus es positivo para la producción de indol, posee descarboxilasas para lisina y ornitina, reduce los nitratos a nitritos y degrada gelatina, quitina, almidón, caseína, esculina y lecitina. Generalmente, es negativo para la actividad de arginina dihidrolasa, la producción de ácido sulfhídrico, ureasa, fenilalanina desaminasa y luminiscencia.

Comúnmente esta bacteria utiliza los siguientes compuestos como fuentes únicas de carbón: D-gluconato, acetato, citrato, propionato, DL-malato, piruvato, fumarato, lactato, succinato, ceto-glutarato, etanol, propanol, L-serina, L-leucina, L-glutamato, L-arginina, L-prolina, L-tirosina, L-alanina y L-histidina.

De igual manera, es incapaz de utilizar fenol, catecol, malonato, oxalato, glutarato, tartrato, p-hidroxibenzoato, butanol, benzoato, β -alanina, ornitina, L-citrulina y espermina (70).

Las características individuales no deben tomarse con demasiada rigidez para la identificación, ya que es común la variabilidad de cepa. Si un aislamiento obtenido del medio ambiente cumple con todos los criterios antes mencionados, puede requerirse una caracterización bioquímica adicional, incluso hibridaciones de DNA, para efectuar una completa separación e identificación. Una caracterización de este tipo diferenciará ocasionalmente entre V. parahaemolyticus y otra bacteria marina similar, pero pobremente caracterizada.

Hugh y Sakazaki (45) propusieron una tabla de características mínimas para efectuar la identificación de V. parahaemolyticus. Sin embargo, deben señalarse las excepciones a dicha tabla. Por ejemplo, la ausencia de fermentación de sacarosa es una característica diferencial primaria y constituye el criterio básico empleado en la mayoría de los métodos de aislamiento recomendados para Vibrio parahaemolyticus; no obstante, se ha reportado que un gran número de cepas examinadas son sacarosa-positivas. Colwell (44) encontró que el 6% de las cepas que examinó eran sacarosa-positivas, Joseph (92) detectó este mismo fenómeno en un alto porcentaje de las cepas que aisló, Fujino (70) observó que el 2% de sus aislamientos marinos eran también sacarosa-positivos, Ayres y Barrow (4) reportaron que, de las 1,484 cepas obtenidas de las aguas costeras británicas, el 6.9% eran sacarosa-positivas y Kampelmacher (95) publicó resultados similares.

Cabe mencionar que la detección del ácido producido durante la fermentación de la sacarosa puede variar de acuerdo al medio y a la concentración del carbohidrato; por ello, Baross (93) recomienda el uso del medio basal OF con una concentración final de 0.5% de sacarosa.

**Características Mínimas para Efectuar
la Identificación de
Vibrio parahaemolyticus**

Bacilo Gram-negativo no esporulado	+
Indofenol oxidasa	+
Glucosa, ácido bajo un sello de petróleo	+
Glucosa, gas	-
D-manitol, ácido	+
Sacarosa, ácido	-
Acetilmetilcarbinol	-
H ₂ S	-
L-lisina descarboxilasa	+
L-arginina dihidrolasa	-
L-ornitina descarboxilasa	+
Crecimiento en caldo triptona al 1%	-
Crec. en caldo triptona al 1% con NaCl al 8%	+
Crec. en caldo triptona al 1% con NaCl al 10%	-
Crecimiento a 42°C	+

Cuadro propuesto por Hugh y Sakazaki (45)

Generalmente, las descarboxilasas para lisina y ornitina están presentes en V. parahaemolyticus, aunque existen muchas excepciones. Fujino (70) reportó que el 4 a 5% de las cepas probadas eran negativas para ornitina y/o lisina descarboxilasa. Por otro lado, se sabe que sólo el 78% de las colectadas en Tokio se han reportado como positivas para la ornitina descarboxilasa (151).

La producción de ácido sulfhídrico se investiga leyendo la reacción que se lleva a cabo en el extremo de un tubo con agar de Kligler (KIA), agar Triple Azúcar (TSI) o en los medios SIM o LIA. Sakazaki (93) reportó que ninguna de las 1,072 cepas examinadas en su estudio fueron positivas para la producción de H₂S utilizando los medios de SIM o TSI. Sin embargo, Colwell (44) encontró que casi todas las cepas de V. cholerae y V. parahaemolyticus que examinó fueron H₂S-positivas al utilizar un medio con acetato de plomo, lo cual comprobó Twedt (189) posteriormente. Por tanto, se ha sugerido analizar la producción de ácido sulfhídrico en el agar de acetato de plomo, cuando se requiera efectuar la identificación de esta especie.

Otras dos características que no están incluidas en el conjunto de caracteres mínimos de Hugh y Sakazaki, pero que son dignas de mencionarse, son el indol y la ureasa. Aunque la producción de indol generalmente es positiva, un gran número de cepas indol-negativas han estado implicadas en brotes de envenenamiento alimentario en la ciudad de Tokio (151). Del mismo modo, V. parahaemolyticus está considerado como ureasa-negativo, aunque varios investigadores han encontrado cepas ureasa-positivas; Colwell (44) observó que el 97% de las cepas examinadas en su investigación eran ureasa-positivas, Sakazaki (93) reportó

un 4% y Kaper encontró 13 cepas ureasa-positivas de las 19 aisladas de camarón.

El aislamiento de cepas ureasa-positivas en infecciones humanas se ha mencionado en los reportes de Lam y Yeo (110) y en los de Oberhofer y Podgore (135). Curiosamente, en ambos casos, las cepas obtenidas, además de ser ureasa-positivas, eran negativas para la prueba de rojo de metilo, hecho que aún no tiene explicación.

6. TIPIFICACION

La clasificación serológica de V. parahaemolyticus se basa en la investigación de dos estructuras antigénicas: el antígeno somático O y el polisacárido capsular K (153,93,24); los antígenos flagelares H son iguales en todas las cepas y, por ello, no se utilizan en la serotipificación.

Los antígenos K son termolábiles, ya que resultan susceptibles a calentamientos de 100°C durante 1 a 2 horas, mientras que los O son termostables, pues soportan durante el mismo tiempo, temperaturas de hasta 121°C (153,93).

El esquema antigénico de V. parahaemolyticus fue sugerido por Sakazaki después de estudiar 2,720 cepas obtenidas de pacientes con gastroenteritis. Su investigación demostró que este microorganismo es serológicamente diferente de otros vibrios (93).

La especificidad de los antígenos fue tema de análisis profundo; Terada (93) encontró que V. parahaemolyticus, V. alginolyticus y V. anguillarum muestran idénticos antígenos H y, por otro lado, Fishbein (66) observó que V. parahaemolyticus y V. alginolyticus comparten algunos antígenos O y K.

Si bien existen 12 antígenos O dentro de los cuales se clasifican 59 antígenos K, Twedt (190) ha demostrado que algunas cepas de V. parahaemolyticus producen reacciones poco específicas debido quizá a la presencia de otros antígenos K o a la reacción cruzada con otros sueros anti-O.

Aunque muchos aislamientos ambientales y algunos clínicos son atípicos para el antígeno K, la mayoría de las cepas clínicas pueden ser clasificadas de acuerdo al tipo O.

ESQUEMA ANTIGENICO DE V. parahaemolyticus

(66,93,153,190)

Antígenos O

Antígenos K

1	1,25,26,32,38,41,56,58
2	3,28
3	4,5,6,7,29,30,31,33,37,43,45,48,54,57,59
4	4,8,9,10,11,12,13,34,42,49,53,55
5	15,17,30,47
6	18,40
7	19
8	20,21,22,39
9	23,44
10	24
11	36,40,50,51
12	52

En 1968, Sakazaki había propuesto un esquema que reconocía sólo 11 grupos O y 41 antígenos K; posteriormente, los antígenos K 2,14,16,27 y 35 se excluyeron del esquema, ya que se encontró que eran idénticos a otros reconocidos con anterioridad. Actualmente, Sakazaki y otros investigadores japoneses, tales como Tokoro, Yamada y Yokota, reconocen 61 antígenos K, colocando los antígenos 60 y 61 en el grupo O5 (153).

El esquema antigénico propuesto por Sakazaki se basa en cepas aisladas de pacientes humanos y no abarca las del medio ambiente, las cuales frecuentemente son atípicas (66,153). Asimismo, el Comité de Serotipia de Vibrio parahaemolyticus ha adoptado la posición de agrandar el esquema sólo con la inclusión de serotipos humanos (93).

Muchos investigadores han mostrado interés por dilucidar la estructura química de los principales antígenos de V. parahaemolyticus. Aunque Terada y Zen-Yoji han descrito la obtención del antígeno K, fue Omori quien logró su purificación a partir de la cepa A55 (O5:K15). La sustancia era característicamente ácida por contener cantidades considerables de hexosamina y grupos acetilo. Posteriormente, Kudoh descubrió la presencia de algunos azúcares y Torii encontró que este antígeno, el K15, poseía dos ácidos: el manosaminurónico y el glucosaminurónico. Cabe señalar que este tipo de ácidos (los hexosaminurónicos), se han aislado como antígenos protectores en otras especies bacterianas (183).

Torii (182), al realizar estudios inmuoquímicos en material celular extraído por el método de fenol-agua, encontró que los antígenos O son polisacáridos que contienen glucosa, galactosa, glucosamina, heptosa, fósforo, ésteres de ácidos grasos y

compuestos nitrogenados. Además detectó galactosamina en 5 muestras.

Las especificidades serológicas de los antígenos de 33 cepas investigadas por medio de la técnica de difusión en agar, coincidieron con las de la aglutinación O. Asimismo, Simouchi reportó la presencia de arabinosa, manosa, ramnosa y xilosa en algunos antígenos O de este microorganismo (182).

Por otro lado, las sero-variedades de V. parahemolyticus pueden determinarse por aglutinación en placa mediante los sueros diagnósticos anti-O y anti-K de los laboratorios Toshiba Kagaku Kogyu Co., Ltd., Tokyo, que se encuentran disponibles en forma comercial. Para la aglutinación O, se eligen colonias translúcidas de cultivos de una noche que se cosechan en solución salina y se someten a 100°C durante una hora. El paquete celular se lava dos veces con solución salina al 1% y con esto se incrementa la aglutinabilidad O del cultivo. Si no hay aglutinación con ningún suero anti-O disponible, se deben probar colonias brillantes o translúcidas de cultivos en agar nutritivo. La aglutinación O puede ocurrir también después de que los cultivos se han tratado en autoclave a 121°C durante dos horas.

Para la determinación del antígeno K, se eligen colonias opacas y suaves, pero no mucoides (109), que se subcultivan en agar nutritivo. Para efectuar la prueba se utiliza una suspensión densa de microorganismos vivos en solución salina al 1%, la cual se aplica en una placa junto con el suero para realizar una aglutinación directa.

En el caso de las colonias mucoides, Lam y Monteiro (109) recomiendan el tratamiento de las células con HCl 0.2N durante

30 minutos, lavándose 4 veces y resuspendiendo en solución salina al 3%.

Estos mismos investigadores (109) determinaron la naturaleza de la sustancia viscosa que proporciona la textura mucóide de este tipo de colonias, mediante un método de coagulación de células formalizadas de Staphylococcus aureus, revestidas de anticuerpos anti-K. Encontraron que esta sustancia viscosa era antigénicamente similar al antígeno capsular de la misma cepa. No se ha encontrado explicación a este fenómeno, aún cuando en el caso de otras especies bacterianas, algunos autores han señalado la influencia de ciertos compuestos en el medio de cultivo, tales como carbohidratos y fosfatos.

Aunque las serovariedades de la mayoría de las cepas aisladas de heces diarreicas pueden determinarse con los sueros anti-O y anti-K existentes, muchos aislamientos obtenidos de fuentes marinas no pueden identificarse con ellos y quizá, posteriormente, se incluyan otros serotipos en el esquema antigénico de Vibrio parahaemolyticus.

7. METODOS DE DETECCION Y RECUESTO

Los dos métodos más utilizados para efectuar el recuento de este microorganismo, tanto en alimentos como en muestras de agua, son: el número más probable (NMP) y la filtración por membrana (FM); ambos pueden emplearse para su aislamiento aunque es factible aplicar el plaqueo directo cuando el número de células en la muestra es relativamente elevado.

La inmovilización en agua destilada propuesta por Chester (55), es una prueba presuntiva que puede aplicarse al inicio de una

caracterización; este investigador observó que los primoaislamientos de V. alginolyticus y V. parahaemolyticus obtenidos en agar sangre al 5%, eran activamente móviles en TSB pero perdían dicha propiedad al colocarse en agua destilada; mientras tanto, 44 especies de bacilos Gram-negativos conservaron su movilidad en ambos fluidos. Concluyó entonces que un bacilo Gram-negativo, oxidasa positivo, móvil en TSB pero inmóvil en agua destilada, puede identificarse presuntivamente como Vibrio.

La técnica de filtración de membrana que se emplea con frecuencia para el recuento de ciertos grupos taxonómicos (coliformes, enterococos, etc.), también puede aplicarse para efectuar el de los microorganismos del género Vibrio (93); en este último caso, después de filtrarse la muestra, se deposita la membrana en el medio AAC (arabinosa-sulfato de amonio-colato) con pH de 8.6 y se incuba a 42°C (técnica de Horie); el crecimiento a esta temperatura es una característica diferencial importante de Vibrio parahaemolyticus, además, otra propiedad que sugiere la presencia de esta bacteria es la coloración amarilla de las colonias fermentadoras de arabinosa, pero como se ha establecido con anterioridad, la fermentación de este carbohidrato es una característica variable en la especie (44,153).

Muchos de los medios en placa descritos anteriormente han sido adaptados para los filtros de membrana; entre los más empleados destaca el TCBS. Sin embargo, Watkins (200) diseñó un medio basándose en la capacidad de V. parahaemolyticus para crecer en presencia de NaCl al 3%, a un pH de 8.6 y a una temperatura de 41°C; en éste, el autor utiliza colato de sodio como agente inhibidor del crecimiento de microorganismos Gram-positivos, galactosa como carbohidrato fermentable y sulfato de cobre para impedir el desarrollo de V. alginolyticus. Por otro lado, realizó varios

intentos para lograr una rápida identificación de este microorganismo; transfería los filtros en los que apreciaba desarrollo a medios de fermentación para galactosa y sacarosa y, como paso final, realizaba la prueba de oxidasa. Según su publicación, este procedimiento requiere de 30 horas y proporciona un 95% de confiabilidad en la identificación.

Kaper (99) desarrolló un medio, el VP, tendiente a lograr una rápida identificación presuntiva de V. parahaemolyticus.

En éste, las fermentaciones de manitol, sacarosa y lactosa, la actividad de la arginina dihidrolasa, la producción de indol, gas y H₂S, pueden registrarse en un solo tubo.

Las colonias sospechosas de ser V. parahaemolyticus pueden elegirse directamente de las placas de aislamiento o de los filtros de membrana e inocularse por picadura y descargando el asa en la parte inclinada. Los cultivos se incuban a 35°C durante 18 a 24 horas, después de las cuales se efectúan las lecturas. Para detectar la producción de indol se agregan 3-4 gotas del reactivo de Kovacs.

Las reacciones del medio VP se basan en los principios de los agares hierro-triple azúcar (TSI) y hierro-lisina (LIA).

La única combinación de reacciones que produce una inclinación alcalina (púrpura) sobre una base ácida (amarilla), la dan las pruebas de manitol (+), sacarosa (-), lactosa (-) y arginina (-), lo cual es típico de V. parahaemolyticus que además es anaerógeno, H₂S (-) e indol (+). No obstante, se recomienda la confirmación, que puede incluir pruebas adicionales tales como la oxidasa, crecimiento en 0% de NaCl, desarrollo a 43°C y producción de lisina descarboxilasa.

Una de las limitaciones del medio VP radica en su incapacidad para manifestar la fermentación del manitol cuando ocurren ade-

más la hidrólisis de la arginina o las fermentaciones de lactosa o sacarosa; sin embargo, ofrece una alternativa rápida y confiable en la detección de Vibrio parahaemolyticus (99).

Reacciones de Bacterias Gram-negativas en VP
Comparadas con Pruebas Convencionales

Especie	Medio VP				Pruebas Convencionales			
	Incl.	Base	H ₂ S	Gas	Sac	Lac	Manitol	Arg
<u>V. parahaemolyticus</u>	K	A	-	-	-	-	+	-
<u>V. alginolyticus</u>	A	A	-	-	+	-	+	-
<u>V. cholerae</u>	A	A	-	-	+	-	+	-
<u>V. anguillarum</u>	A6K	A6K	-	-	V	-	+	+
<u>A. hydrophila</u>	K6A	K6A	-	-	V	V	+	+
<u>Pseudomonas spp.</u>	K	K	-	-	-	-	-	V
<u>Escherichia coli</u>	A	A	-	+	V	+	+	V
<u>K. pneumoniae</u>	A	A	-	+	+	+	+	V
<u>S. typhimurium</u>	K	A	+	+	-	-	+	+
<u>V. natriegens</u>	A	A	-	-	+	-	+	-
<u>Vibrio Grupo F</u>	A	A	-	V	+	-	+	+

K = reacción alcalina (púrpura)

A = reacción ácida (amarilla)

V = variable

IV. PATOGENICIDAD Y PATOLOGIA

Vibrio parahaemolyticus se considera un importante agente etiológico de gastroenteritis en humanos, a raíz del brote epidémico que provocó en Osaka, Japón durante el año de 1950; no obstante, también se le ha asociado con afecciones extraintestinales (24).

Los principales síntomas de la infección gastrointestinal por Vibrio parahaemolyticus son la diarrea y el dolor abdominal (172) y, como se ha establecido, el padecimiento se relaciona esencialmente con la ingestión de alimentos provenientes del mar: este microorganismo habita normalmente en aguas de baja salinidad tales como los estuarios, desempeñando un papel preponderante en la especial ecología de los ambientes marinos costeros (98).

Aunque no se le considera un microorganismo altamente infeccioso, no existe duda de su capacidad para causar enfermedades serias.

En general, las diarreas de origen bacteriano se deben a alguno de los tres mecanismos siguientes:

1. La producción de enterotoxinas proteicas liberadas por microorganismos no invasivos que originan la acumulación de fluidos en el intestino; tal es el caso de Vibrio cholerae, Escherichia coli enterotoxigénica y Clostridium perfringens.
2. La invasión de los tejidos del huésped por bacterias tales como Shigella y E. coli enteroinvasiva, la cual se manifiesta por la aparición de fenómenos citotóxicos que interfieren con las funciones histológicas normales.
3. La combinación de ambos efectos mencionados.

Sin embargo, por la extensa variedad de síntomas detectados en las personas afectadas de gastroenteritis debida a Vibrio parahaemolyticus y los contradictorios datos patológicos publicados, no se ha determinado claramente si la enfermedad es consecuencia de los efectos de una enterotoxina, si se debe a que el agente causal invade el intestino, o bien, si es producto de la acción de componentes tóxicos originados sólo por algunas cepas de esta especie (167).

Considerando la naturaleza del padecimiento, lo más lógico es pensar que una exotoxina sea la substancia responsable. No obstante, el hecho de que la enfermedad sólo se presente cuando se introduce por vía oral al microorganismo vivo, sugiere que éste requiere desarrollar al menos cierto grado de invasividad en el intestino para que se desencadene el proceso lesivo y, al mismo tiempo, descarta la posibilidad de que sea una toxina preformada en los alimentos la que genera la enfermedad (154,185,141).

Otra evidencia en favor de la invasividad se apoya en el hecho de que se requiere un mínimo de 10^5 microorganismos para que el padecimiento ocurra; cabe señalar que en los estados agudos de la enfermedad pueden aislarse entre 10^6 y 10^8 microorganismos por mililitro de heces (53).

Por otro lado, desde hace tiempo se ha asociado la patogenicidad de este microorganismo con su capacidad para causar hemólisis en un agar especial, debido a que dicha característica se ha observado en el 96.5% de los aislamientos clínicos y sólo en el 1% de los obtenidos del medio ambiente (153,122). Consecuentemente, varios investigadores se han dado a la tarea de aislar y analizar a los factores hemolíticos para definir su papel en la patogenicidad de esta especie. Así, se han determinado sus propie-

dades fisicoquímicas y biológicas y la posible relación entre alguno de ellos y la virulencia de la bacteria.

En resumen, hasta el momento son dos los aspectos que se han considerado para explicar la patogenicidad de Vibrio parahaemolyticus:

- A. La relación entre las hemolisinas de este microorganismo y su patogenicidad.
- B. La presencia de factores asociados a la infección.

A. RELACION ENTRE LAS HEMOLISINAS DE Vibrio parahaemolyticus Y SU PATOGENICIDAD.

A.1 Antecedentes

Desde la primera vez que fue caracterizado (Fujino, 1950), Vibrio parahaemolyticus manifestó una clara actividad hemolítica en placas de agar sangre (43,69); posteriormente en 1965, las investigaciones realizadas por Kato en el Laboratorio de Salud Pública de Kanagawa, demostraron que mientras las cepas aisladas de las heces de los pacientes causaban hemólisis, las obtenidas de diferentes fuentes de contagio para el hombre, no lo hacían (153,172). Años más tarde, en 1968, Wagatsuma modificó el medio utilizado por Kato buscando mejorar la visualización de la hemólisis (agar de Wagatsuma); en ese mismo año, durante el 41^o Encuentro General de la Sociedad Bacteriológica Japonesa, Fujino, el descubridor original de V. parahaemolyticus, propuso asignar el nombre de "Fenómeno de Kanagawa" a la peculiar hemólisis mostrada por este microorganismo en el agar de Wagatsuma, debido a que había sido detectado por el grupo de estudiosos de la prefectura del mismo nombre. Desde aquel entonces, muchos autores consideran que existe una estrecha relación entre la enteropatogenicidad del microorganismo y la positividad de la prueba, misma que se caracteriza por la aparición de una clara zona de hemólisis completa (beta), debajo y/o alrededor de las colonias del bacilo (122).

A.2 La Prueba de Kanagawa

Tradicionalmente, para investigar la actividad hemolítica de Vibrio parahaemolyticus, se efectúa la prueba de Kanagawa en el agar de Wagatsuma; éste se prepara de la siguiente manera: el medio basal (extracto de levadura, peptona, manitol, agar, cristal violeta y NaCl al 7%) sin esterilizar se divide en dos porciones iguales que se mantienen a 50°C; en seguida, se agrega a una de ellas una suspensión de eritrocitos humanos frescos y lavados al 20%, en una proporción del 10% V/V y, a la segunda, se le adiciona el mismo volumen de otra, con la misma concentración, de glóbulos rojos de caballo. Por último, las diferentes mezclas se distribuyen en cajas de Petri.

Para realizar la prueba, se descarga una asada de un cultivo líquido incubado durante una noche en una placa de agar con eritrocitos humanos y otra en una caja de agar con hematíes de caballo; los resultados se leen una vez que transcurre un período de incubación de 18 a 24 horas a 37°C.

Una reacción se considera Kanagawa positiva (KP+), cuando aparece una zona clara de hemólisis beta alrededor del crecimiento de Vibrio parahaemolyticus en la placa de agar que contiene los glóbulos rojos humanos y dicho fenómeno está ausente en la zona que circunda el desarrollo de este microorganismo en la caja de agar con eritrocitos de caballo; esto se debe a que otros vibrios marinos son capaces de lisar los hematíes de este animal.

Consecuentemente, la prueba debe leerse como negativa, cuando la hemólisis en el primer medio sea de tipo alfa, o bien cuando ambos medios manifiesten hemólisis (153).

En 1968, Sakazaki aplicó la prueba a 3,370 cultivos de Vibrio parahaemolyticus procedentes tanto de pacientes afectados como de fuentes ambientales y observó que, mientras el 96.5% de los provenientes de humanos eran Kanagawa positivos (KP+), el 99% de los de origen ambiental resultaban KP- (153,172); un estudio similar llevado a cabo por Miyamoto en 1969 proporcionó la misma información (122).

En 1970, Twedt realizó un estudio comparativo cuyos hallazgos parecieron fortalecer las observaciones de Sakazaki y Miyamoto, pero que diferían en la frecuencia de aislamientos KP+ a partir de fuentes ambientales, dado que ésta resultó mayor que la reportada por los investigadores japoneses (187). Esto último fue posteriormente apoyado por Chun, quien llevó a cabo una serie de estudios en los que aplicó la prueba de Kanagawa a 478 cepas de V. parahaemolyticus obtenidas del mar (sedimento, agua, peces, mariscos, etc.) y sus resultados establecieron que el 39.7% de dichas cepas, eran positivas (57). En las mismas fechas, Thomson, en un estudio realizado en Canadá, encontró que el 72% de los aislamientos obtenidos en la costa del Atlántico era KP+, al igual que el 70% de los provenientes de la costa del Pacífico (178).

Como puede constatarse, estos últimos datos difieren considerablemente de los de Sakazaki, cuyos estudios tienden a confirmar la hipótesis de que la positividad en la prueba de Kanagawa, se encuentra relacionada con la enteropatógenicidad para el humano; sin embargo, pese a lo extenso de su trabajo y a la gran aceptación que existe de su planteamiento, otros investigadores se niegan a aceptar a la prueba de Kanagawa como parámetro para clasificar a las cepas como humanas o ambientales y a considerarla

como medida para acreditar patogenicidad a aquéllas que la manifiesten positiva.

Por ejemplo, Thomson (178) comenta que aunque el porcentaje de cepas KP+ obtenidas del medio marino es especialmente elevado en Canadá, la incidencia de la enfermedad en este país es extremadamente baja. Por otro lado, cada vez salen a la luz pública más reportes de casos de envenenamiento alimentario, cuyas cepas responsables son KP-, como pueden constatarlo los estudios de Teramoto en Japón y los de Molenda en los Estados Unidos (124).

Por lo que respecta a la confiabilidad de la prueba, ésta es cuestionable, ya que son muchos los investigadores que establecen variaciones en los resultados de la misma. Por tal motivo, tanto la prueba de Kanagawa como el agar de Wagatsuma se han sometido a numerosos estudios.

Ohun comparó la actividad hemolítica tanto de cepas KP+ como de KP- en función del tiempo de incubación y observó que mientras las primeras mostraban una hemólisis evidente en 16 a 20 horas, las segundas desarrollaban una reacción claramente positiva a las 48 horas. Este resultado sugiere que las cepas KP- también tienen capacidad hemolítica, aunque tardía, comparada con las KP+ (57).

Por otro lado, se ha detectado que la naturaleza de los carbohidratos fermentables contenidos en el medio de cultivo, constituye un factor importante en la aparición de la hemólisis en el agar de Wagatsuma, ya que se obtienen resultados diferentes al variar los azúcares involucrados.

Así, Chun observó cepas que, habiendo resultado KP- en el medio original, llegaban a manifestarse como KP+ al cambiarse el manitol por manosa. Asimismo, encontró que cuando se empleaban carbohidratos no utilizables por V. parahemolyticus, tales como la lactosa y la sacarosa, los microorganismos supuestamente KP+ no desarrollaban hemólisis. Esto también sucedía en presencia de galactosa o arabinosa (56).

Otro hecho que ha atraído la atención de algunos investigadores, es la variación de los resultados por influencia de los cambios en el pH del medio de Wagatsuma: Chun observó que se presentaba una notable disminución en el pH del medio durante las primeras 18 horas de incubación que quizá se debía a la degradación de los carbohidratos; entonces sugirió que esta condición ácida podía favorecer la aparición de halos de hemólisis, toda vez que ésta se detecta normalmente cuando el pH del medio se encuentra en valores cercanos a 6 o más bajos y no se presenta en ausencia de carbohidratos fermentables por el microorganismo (56).

La concentración de NaCl es otro parámetro que origina variación en los resultados de la prueba; la hemólisis de Kanagawa se ha demostrado claramente en el agar de Wagatsuma y en otros medios con sangre que contienen NaCl al 7%, pero no en aquéllos cuyas concentraciones son menores: Chun observó que cuando se adicionaba este compuesto al 5%, la zona de hemólisis no presentaba tan clara definición como la que aparecía en presencia del 7% y, además, cuando se disminuía al 3%, las supuestas zonas de hemólisis eran tan pobres, pequeñas y sin márgenes distintivos, que no podían considerarse como reacciones positivas (56).

En un estudio similar, Vanderzant determinó que es justamente a la concentración de 5%, cuando las zonas de hemólisis comienzan a distinguirse en forma clara (193).

Otro factor que tiene gran influencia en el resultado de la prueba es el tipo de eritrocitos presentes en el medio de Wagatsuma: Vanderzant observó que si bien los hematíes de conejo eran fácilmente hemolizados por V. parahaemolyticus, al utilizar se otro tipo de glóbulos rojos como los de cordero y, sobre todo, los humanos, la lisis era dependiente de la concentración de NaCl (193).

Otra posibilidad es que la hemólisis de Kanagawa dependa de la cantidad de hemolisina producida por V. parahaemolyticus bajo distintas condiciones, pues tanto las cepas KP+ como las KP- producen esta substancia, si bien las primeras lo hacen en mayor proporción; por lo anterior y por el hecho de que está relacionada con el tipo de sangre empleado, la concentración de NaCl, el pH y la fuente de carbono disponible, la prueba aún no puede considerarse como un índice confiable de patogenicidad (56,57, 124,193).

A.3 Hemolisinas detectadas en Vibrio parahaemolyticus

El interés suscitado por la supuesta relación entre el fenómeno Kanagawa y la patogenicidad de V. parahaemolyticus para el humano, motivó que muchos investigadores emprendieran la tarea de aislar al factor o factores responsables de dicha reacción.

Así, en el año de 1966, Kato purificó parcialmente una hemolisina con carácter termoestable que mostraba letalidad para ratones; más tarde, en 1968, Yanagase reportó que la hemolisina principal del microorganismo era una lecitinasa designada como fosfolipasa A; un año después, Fujino puso de manifiesto una hemolisina que, a diferencia de la analizada por Kato, resultaba termolábil.

Debido a la diversidad de los hallazgos publicados, otros investigadores decidieron continuar el mismo trabajo y, de ese modo, Obara en 1971 aisló una hemolisina termoestable a partir de filtrados de cultivos de cepas KP+ y sugirió que esta substancia podría ser la responsable del fenómeno Kanagawa (172); ese mismo año, Zen-Yoji comprobó su existencia aislándola a partir del filtrado de un cultivo líquido de una cepa inductora del fenómeno Kanagawa (203).

En 1973, Sakurai observó que la actividad hemolítica de la hemolisina termoestable producida por cepas KP+ no era activada por la adición de lecitina y propuso denominarla "hemolisina termoestable directa"; cabe señalar que a diferencia de las hemolisinas directas, las indirectas requieren la adición de fosfolípidos tales como la lecitina, para originar zonas de hemólisis más grandes y mejor definidas (156). Dentro de este último grupo se clasifica a la fosfolipasa A reportada por Yanagase (203).

Al año siguiente, 1974, Sakurai obtuvo dos productos de la pre cipitación de los filtrados con ácido acético: uno de ellos provenía de una cepa KP+ y el otro de una KP-, posteriormente comparó algunas de sus características, y encontró lo siguiente:

- Que el suero dirigido contra la hemolisina directa termoestable inhibía la actividad hemolítica del primero y no del segundo (en medios que no contenían alta concentración de NaCl).
- Que mientras el producto que procedía de la cepa KP+ originaba hemólisis en el agar de Wagatsuma, el proveniente de la KP- no lo hacía.
- Que mientras el primero conservaba su actividad hemolítica después de ser sometido a 100°C durante 10 minutos, el segundo la perdía desde su exposición a los 60°C.
- Que el suero antihemolisina directa termoestable, evitaba la aparición de hemólisis beta en el agar de Wagatsuma.

Con todo ello, Sakurai demostró que la hemolisina directa termoestable es la responsable del fenómeno Kanagawa, que sólo la producen las cepas KP+ y que antigénicamente es distinta de la hemolisina termolábil detectada tanto en cepas KP- como en algunas KP+.

En base a sus resultados, Sakurai sugiere la posibilidad de efectuar la identificación de cepas KP+ de V. parahaemolyticus, utilizando un suero contra la hemolisina directa termoestable purificada (157).

En 1978, alentados por los hallazgos obtenidos por otros investigadores en microorganismos tales como Escherichia coli y -- Penicillium notatum, Misaki y Matsumoto decidieron investigar la presencia de otro factor hemolítico (una lisofosfolipasa)

en Vibrio parahaemolyticus; la búsqueda resultó exitosa y, una vez purificada, encontraron que esta enzima hidrolizaba substratos tales como la 1-acil-glicerofosforilcolina, la 1-acil y la 2-acil-glicerofosforiletanolamina y la lisocardiopina; sin embargo, no actuaba sobre el monoacilglicerol, el triacilglicerol ni la fosfatidilcolina; además comprobaron que su actividad no requería la presencia de cationes divalentes (119).

En conclusión, a la fecha se han descrito por lo menos cuatro constituyentes hemolíticos producidos por V. parahaemolyticus: la fosfolipasa A (203), una lisofosfolipasa (119), una hemolisina directa termolábil (157,120) y la hemolisina directa termoestable (84,123,157,156,172,203). La relación de las tres primeras con la patogenicidad del microorganismo no se ha estudiado extensamente, por tanto, su papel en la patogenia (si es que lo tienen) no ha podido aclararse.

En cuanto a la termoestable, algunos autores la señalan como la responsable de los procesos lesivos, además de que origina el fenómeno Kanagawa y se manifiesta como inmunogénica en víctimas de envenenamiento alimentario; esto último ha motivado un gran número de investigaciones tendientes a dilucidar su función en la patología (123).

A.4 La Hemolisina Termoestable Directa

A.4.1. Purificación de la Hemolisina Termoestable Directa

De las sustancias hemolíticas producidas por V. parahaemolyticus, la hemolisina directa termoestable (TDH) ha sido la más estudiada; y tanto su aislamiento como su purificación se han efectuado a partir de sobrenadantes de cultivos líquidos de microorganismos que previamente han manifestado reacciones KP+ (84,156,123,120,203,204).

Uno de los métodos más efectivos para la purificación de la TDH, es el desarrollado por Honda (84); una cepa KP+ se inocula en un medio que contiene NaCl, peptona, fosfato dibásico de sodio y glucosa con un pH final de 7.6 a 7.8. Después de incubar en agitación durante 15 horas a 37°C, se recoge el sobrenadante previa centrifugación y, de éste, se obtiene un precipitado al adicionársele sulfato de amonio al 35.1% que se disuelve en amortiguador de fosfatos y se dializa toda la noche contra el mismo. El producto obtenido en este paso se denomina "hemolisina cruda" y se aplica a una columna de intercambio iónico, DEAE-celulosa, que contiene grupos cargados positivamente a pH de 7.0 (112).

En seguida, las fracciones obtenidas que poseen actividad hemolítica se aplican a una columna de hidroxapatita (una forma de fosfato de calcio cristalino), a la cual se le considera como el adsorbente más efectivo en purificación de proteínas; los grupos cargados negativamente se unen a los iones Ca^{++} presentes (112).

De aquí, las fracciones resultantes que muestren actividad hemolítica se aplican a una columna de Sephadex G-200, donde se lleva a cabo una cromatografía de exclusión molecular (también conocida como filtración en gel), a partir de la cual, la separación de proteínas se logra en base al tamaño de las mismas (112).

Realizado lo anterior, las fracciones hemolíticas se concentran y colectan, examinándose su homogeneidad por electroforesis disc, tanto en gel de poliacrilamida como en gel de poliacrilamida-SDS así como por ultracentrifugación analítica. Cuando en ambos tipos de electroforesis disc la preparación presenta una única banda que puede ser teñida con azul de Coomassie y en la ultracentrifugación analítica sedimenta como un pico simple y simétrico, queda demostrada la alta pureza del producto.

Mediante la aplicación de esta metodología, Honda obtuvo 7.4 mg de TDH a partir de 46 litros de sobrenadante de cultivos líquidos; esto significa que su rendimiento es del 15.5% y se calcula que la técnica logra purificar esta sustancia 540 veces partiendo del sobrenadante.

Otros investigadores han extraído TDH por diversos métodos, obteniendo resultados diferentes. Por ejemplo Zen-Yoji empleó dos procedimientos; en uno de ellos (204) obtuvo dos tipos de TDH que diferían en cuanto a movilidad electroforética en gel de poliacrilamida; esto no lo ha reportado ningún otro analista. En el otro, logró una alta depuración y sin embargo, el producto final no resultó puro.

Sakurai (156), empleando otra técnica, obtuvo rendimientos más bajos; el producto obtenido por Miwatani (120) presentó diferencias importantes comparado con el de Honda y el de Miyamoto (123) manifestó una deficiente purificación.

A.4.2 Propiedades Fisicoquímicas

La TDH purificada no presenta carbohidratos, lípidos ni compuestos fosforilados (84,156,172,174,203); su espectro de absorción en el ultravioleta corresponde al de una proteína típica, con un máximo a 277 nm y un mínimo a 250 nm (172), lo cual se confirma por el hecho de que su actividad hemolítica desaparece al ser expuesta a la acción hidrolítica de la pepsina y la alfa-quitripsina, aunque no por la tripsina (172). En cuanto a su punto isoelectrico, se han publicado varios datos: Sakurai (156) y Miyamoto (123) mencionan valores de 4.93, Zen-Yoji (204) de 5.02 y Honda (84), utilizando el sistema de electroenfoque con un gradiente de pH de 3 a 5, establece valores de 4.2.

Acerca de su peso molecular, se han reportado diferentes valores, dependiendo del sistema o método empleados: Honda (84) y Miyamoto (123) lo calcularon en 42,000 daltons mediante el método de filtración en gel (84,123) y Takeda (174) examinó su estructura molecular por electroforesis disc en gel de poliacrilamida-SDS y en Triton X-100, obteniendo resultados diferentes en cada una de las técnicas: mediante la primera, determinó que su peso era de 21,000 daltons y con la segunda, en la cual interviene el Triton X-100 que es un detergente no iónico y por ello no disocia las proteínas, el resultado obtenido fue de 42,000.

Para complementar el estudio, trató la hemolisina con glutaraldehído para que se formara un enlace cruzado en sus unidades (en el caso de que estuviera constituida por más de una) y posteriormente la sometió a electroforesis disc en gel de poliacrilamida-SDS; así, obtuvo bandas con pesos moleculares diferentes: 21,000, 41,000, 63,000, 87,000, 108,000 y 130,000; estos datos permitieron concluir que la TDH está compuesta por dos subunidades de aproximadamente 21,000 daltons cada una. Zen-Yoji (203), Honda (84) y Miyamoto (123) describieron su composición de aminoácidos (consultar tabla).

A.4.3 Efecto Arrhenius

A principios de siglo se observó que la hemolisina alfa del estafilococo se comportaba de una manera muy peculiar: al calentarse a 70°C perdía su actividad, pero cuando posteriormente se le sometía a un calentamiento de 100°C, la recobraba. A este comportamiento se le denominó "Efecto Arrhenius", debido a que este investigador fue el primero en describirlo en el año de 1907 (121,172,173).

Para explicar la causa del Efecto Arrhenius en la hemolisina alfa del estafilococo, Landsteiner, Von Rauchenbichler, Tager y Mahonar propusieron la existencia de alguna substancia que interactuaba con ella a 60°C. Por su parte, Cooper y Arbuthnott observaron que la alfa hemolisina formaba un agregado insoluble no tóxico cuando se alcanzaban los 60°C, pero a temperaturas más altas se redisolvió, recuperando sus propiedades tóxicas (173).

**COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA HEMOLISINA
TERMOESTABLE DIRECTA**

Aminoácido	Residuos de Aminoácidos (%)		
Lys	6.1 ^a	5.7 ^b	6.1 ^c
His	2.2	2.6	2.5
Arg	1.9	2.0	1.5
Asp	12.1	12.5	12.2
Thr	6.2	6.3	6.6
Ser	8.9	10.8	10.7
Glu	9.4	10.2	10.2
Pro	4.6	5.1	5.1
Gly	5.5	6.3	5.1
Ala	4.7	5.1	4.6
Cys	3.1	0.9	2.0
Val	12.0	10.8	11.7
Met	1.9	2.0	2.0
Ile	3.1	3.1	3.0
Leu	3.9	3.7	3.6
Tyr	6.2	5.4	5.6
Phe	6.6	6.3	7.1
Trp	1.6	1.4	0.5

+ El total de residuos de aminoácidos individuales, se toma como 100%.

a Datos de Honda, 1976 (84).

b Datos de Zen-Yoji, 1975 (172).

c Datos de Miyamoto, 1980 (123).

NH₂-Phe-Glu-Leu-Pro-Ser-Val-Pro-Phe-Pro-Ala-Pro-Gly-()-
-Asp-Glu-Ile-Leu-Phe-Val-Val-()-Gly-Pro-Val-Phe-()-Pro-
-()-Ala-Pro-Val-()-Val-()-Val-()-Val-()-Glu-Phe-

+ Secuencia de aminoácidos N-terminal de la TDH.

+ Datos de Zen-Yoji, 1975 (172).

En 1969, Miwatani (121) detectó que la TDH mostraba el Efecto Arrhenius y junto con Takeda (173), en 1975, decidió investigar el mecanismo del fenómeno en la hemolisina cruda de Vibrio parahaemolyticus; para ello, analizaron la influencia del calor sobre la actividad hemolítica de preparaciones con diferente grado de pureza y encontraron que el grado de inactivación de la hemolisina (al calentarla entre 60 y 70°C), disminuía conforme aumentaba su pureza. Lógicamente, estos resultados les sugirieron que las preparaciones de hemolisina cruda contenían algún factor que inactivaba su efecto hemolítico.

Posteriormente, aplicando el sobrenadante del cultivo de Vibrio parahaemolyticus a una cromatografía en columna de DEAE-celulosa, Takeda (173) logró aislar un factor que inactivaba la acción hemolítica de la TDH, pero sólo bajo ciertas condiciones experimentales: el factor se mezcló con TDH purificada y la combinación se sometió a calentamiento a varias temperaturas. Los resultados fueron los siguientes: mientras que a 50-60°C durante 10 minutos se provocaba una pérdida significativa de la capacidad hemolítica, a 80-90°C durante el mismo tiempo, la actividad era óptima. Lo anterior demostró que el factor responsable del Efecto Arrhenius era termolábil y, en ese mismo trabajo, se estableció que era de naturaleza proteica. Cabe señalar que también se ha reportado el aislamiento de un factor inactivante para la exotoxina A de Pseudomonas aeruginosa, la cual a su vez, presenta el Efecto Arrhenius (172).

A.4.4 Propiedades Biológicas

La hemolisina termoestable directa purificada posee varias actividades biológicas: es hemolítica y citotóxica y, para ratones y ratas, resulta letal.

a. Actividad Hemolítica

En cuanto a su actividad hemolítica, Zen-Yoji (203) estudió el efecto que producía sobre los glóbulos rojos de varias especies animales, encontrando que aquélla decrece en el siguiente orden: rata, perro, ratón, mono, hombre, conejo y cobayo; asimismo observó que la substancia investigada no exhibía actividad alguna sobre los eritrocitos de caballo.

Por su parte, Sakurai (172) analizó su mecanismo de acción con poco éxito; sólo encontró que la actividad en cuestión varía en función de la temperatura; cuando ésta es baja (0 a 4°C), la hemólisis correspondiente no se produce, aunque ocurre la unión de la TDH a los eritrocitos humanos; dicho enlace antecede a la lisis celular y está mediado por cationes divalentes tales como Ca^{++} , Mn^{++} y Mg^{++} .

Motivado por el hallazgo anterior, Sakurai investigó posteriormente la cinética que mostraba la inhibición de la hemólisis con su suero antiespecie homólogo y sólo pudo concluir que el efecto hemolítico se lleva a cabo en dos pasos: en el primero se efectúa la unión de la TDH a los hematíes, pero el segundo es todavía incierto; aún se desconoce si el papel lítico es consecuencia de alguna acción enzimática sobre las membranas citoplásmicas de las células "blanco".

**Actividades Hemolíticas de la TDH
sobre Eritrocitos de Varias Especies**

Fuente de Eritrocitos	Recíproco del Título de Dosis Hemolítica Mínima
Rata	10,240
Ferreo	5,120
Ratón	2,560
Mono	2,560
Hombre	1,280
Conejo	640
Cobayo	640
Pollo	160
Oveja	30
Caballo	0

+ Dosis Hemolítica Mínima; dilución más alta que da una hemólisis completa.

+ Datos de Zen-Yoji, 1971 (203).

b. Citotoxicidad

Referente a la citotoxicidad de la TDH, se ha demostrado que ésta manifiesta dicha actividad en varios tipos de células cultivadas, tales como las HeLa (154), las L (154), las FL (155), las de neuroblastoma (172), las de miocardio y melanoma de ratón (76) y las CCL-6 derivadas del intestino humano (172).

En 1976, Sakurai (155) estudió con detalle el efecto de esta hemolisina sobre células FL derivadas de membrana amniótica humana y observó que, cuando se incubaban 6.6×10^5 células por mililitro con esta sustancia en concentraciones de $5 \mu\text{g/ml}$ a temperaturas de 37°C , la muerte de las células ocurría en 20 minutos; la supervivencia de éstas se analiza por medio de tinciones vitales con azul de tripano o detectando la liberación de fosfatasa alcalina, ya que este evento es paralelo a la muerte celular. Asimismo, encontró que las microvellosidades de las células sufrían cambios morfológicos antes de que ocurriese la muerte; aplicando la microscopía electrónica de barrido demostró que, después de 5 minutos de incubación, el número de microvellosidades de la superficie celular disminuye y la morfología de las que aún persisten, varía considerablemente; en 10 minutos, algunas células mueren, pero casi todas las microvellosidades desaparecen y, por último, transcurridos 60 minutos de incubación, más del 95% de las células mueren, manifestando una marcada degeneración de la superficie celular.

Por lo que se refiere a la morfología intracelular, detectó que a los 5 minutos no se observan grandes cambios en el citoplasma de la célula; sin embargo, en 30 minutos las microvellosidades desaparecen, el citoplasma muestra cambios y el núcleo está desintegrado y, pasados 60 minutos, se manifiesta una degeneración completa del citoplasma y ningún núcleo sobrevive. Es importante subrayar que se observan también trastornos morfológicos en las microvellosidades cuando las células correspondientes se tratan con cantidades subletales de hemolisina.

c. Enterotoxicidad

También existen reportes interesantes sobre la enterotoxicidad de la TDH; Zen-Yoji (204) investigó a la TDH sometiendo a la prueba del asa intestinal ligada de conejo y obtuvo los siguientes resultados: la inyección de 100 µg de la hemolisina no causó acumulación de fluidos, sin embargo al aplicarse 500 µg, se provocó la acumulación de un fluido turbio y sanguinolento y el examen histopatológico mostró lesiones erosivas y descamación necrótica de la mucosa, acompañada por una marcada infiltración de neutrófilos en la pared intestinal. Comparada con el colerágeno (DE₅₀ = 2 µg), la cantidad de TDH requerida para dar una reacción positiva en esta prueba es demasiado alta (84); por tanto, se puede inferir que los cambios observados en los tejidos "blanco" se deben a los ya mencionados efectos citotóxicos de la TDH, más que a su capacidad enterotóxica.

Por su parte, Obara (134) y Miyamoto (123) analizaron los cambios histopatológicos ocurridos en el intestino delgado de ratones lactantes de 5 a 6 días de nacidos cuando éstos se inoculaban por vía oral con TDH (mediante la utilización de un tubo estomacal) y observaron que la administración de 50 μg provocaba diarrea, previa a la muerte de la totalidad de los animales utilizados; en cambio, con dosis de 2.0 a 12.5 μg , sólo algunos de ellos murieron y, los sobrevivientes, aunque sufrieron transitoriamente de diarrea, se recuperaron posteriormente. Mientras la mucosa intestinal de los animales con diarrea provocada con dosis relativamente pequeñas no denotó cambios destructivos, el examen al microscopio de luz mostró que la lámina propia se tornaba edematosa. En disecciones ultradelgadas se observó que las uniones intercelulares en las interdigitaciones se habían perdido y los espacios resultantes entre las células se encontraban enormemente elongados; esto sugería una acumulación de fluidos.

Al aplicarse grandes dosis, se apreciaron cambios destructivos en diferentes partes de la mucosa intestinal, justo antes de la muerte de los animales. Secciones ultrafinas de las vellosidades del intestino delgado de un animal al que administraron 25 μg de la TDH, manifestaron disturbios estructurales en el retículo endoplásmico y mitocondrias hinchadas con crestas indistinguibles; en el citoplasma se detectaron numerosas vacuolas de varios tamaños y los microvellos se encontraron desordenados o degenerados; en algunas células epiteliales el núcleo había llegado a ser menos denso a los electrones, mostrando además cambios degenerativos.

De estos resultados, tanto Obara (134) como Miyamoto (123) concluyeron que la hemolisina directa termoestable purificada, puede ser un factor importante en las gastroenteritis humanas debidas a Vibrio parahaemolyticus.

d. Toxicidad Letal

Desde su aislamiento, se reportaron aspectos acerca de la toxicidad letal de V. parahaemolyticus para ratones y cuyos; por ello, son varios los investigadores que han intentado aislar una toxina letal.

Kuriyama, Akehashi y Yoneda reportaron la existencia de una substancia tóxica en las células de este microorganismo; posteriormente, Ueyama publicó el aislamiento de una toxina letal para ratones, a partir de filtrados de cultivos del microorganismo y reportó que aquélla estaba libre de azúcares y ácidos nucleicos y que presentaba propiedades de proteína (84,172).

Por su parte, Zen-Yoji (204) y Obara (134) demostraron que la hemolisina directa termoestable purificada tenía toxicidad letal para animales pequeños de experimentación; Honda (84) purificó cuidadosamente la toxina letal a partir de filtrados de cultivos líquidos de V. parahaemolyticus y encontró que era idéntica a la TDH en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas y biológicas; empleando sulfato de amonio, obtuvo varios precipitados a partir de los sobrenadantes de los cultivos de una cepa KP+, los cuales purificó posteriormente mediante cromatografías sucesivas en columna de DEAE-celulosa, hidroxapatita y Sephadex G-200.

Cada fracción se sometió a análisis para investigar tanto su actividad hemolítica como sus propiedades letales en ratones y los resultados mostraron que ninguna de ambas características se perdía durante el proceso de purificación, lo cual significa que las supuestas dos sustancias son una misma; desde que la preparación final apareció homogénea tanto en electroforesis disc practicada en gel de poliacrilamida como la efectuada en gel de poliacrilamida-SDS, se comprobó que la hemolisina directa termoestable era, en sí misma, la toxina letal producida en los sobrenadantes de los cultivos de Vibrio parahaemolyticus.

Tiempo después, con el objeto de probar la toxicidad letal de la TDH, varios investigadores realizaron estudios en ratones: Zen-Yoji determinó su dosis mínima letal inyectándola por vía intraperitoneal y obtuvo un valor de 0.62 µg de nitrógeno por ratón (203). Honda estableció que la inyección intravenosa de la toxina mataba a los ratones muy rápidamente, pues 5 µg de la TDH mataban al animal (de seis semanas de edad) en un minuto, e inclusive que una dosis de 1 µg lo hacía, aunque en 20 minutos. Ningún ratón murió durante los tres días siguientes a la inyección de 0.5 µg de toxina. Asimismo, observó que los animales inyectados con la toxina llegaban a quedar inmóviles, mostrando en ocasiones calambres (84).

En 1980, Miyamoto calculó el valor de la DL_{50} para animales desafiados tanto por vía intravenosa como por vía oral y encontró que el valor correspondiente para la primera era de 1.4 µg, mientras que la segunda resultó de 30 µg; por otro lado, descubrió que la administración oral de 6 µg producía

diarrea al 50% de ratones lactantes (123).

Aparte, Zen-Yoji investigó también la toxicidad letal de la TDH en monos observando que los que se inyectaban directamente en el duodeno con 5 y 10 mg de la toxina, desarrollaban diarrea acuosa y lesión catarral acompañadas por la acumulación de un exudado mucoso en el yeyuno; mientras tanto, cuando se aplicaban 25 mg, los monos morían 5 a 10 horas después de la inyección. Asimismo, observó que en el humano se manifiesta un notable adelgazamiento así como una marcada disminución en el tono de la pared del intestino delgado con gran abundancia de exudado mucoso sanguinolento. Tales efectos pudieron detectarse al practicar autopsias a individuos que habían fallecido a causa de la infección por Vibrio parahaemolyticus (204).

e. Respuestas en Piel de Animales

La aplicación intradérmica de la TDH en animales, desarrolla una respuesta característica que presenta una cinética diferente a la del colerágeno.

Histopatológicamente, existen edema, eritema e induración, alcanzándose el máximo 8 horas después de la inoculación. La dosis mínima que provoca respuesta cutánea en los cobayos es de 2.5 µg (204), mientras que el colerágeno presenta su punto máximo hasta las 24 horas y, en ocasiones después, pero con tan sólo 10 ng (123).

Miyamoto, Ohashi y Shimada, empleando conejos, analizaron la actividad de la TDH sobre la permeabilidad capilar. Dicha característica se investigó teniendo lesiones originadas por

la aplicación intradérmica de la toxina y midiendo el diámetro desarrollado por la difusión del colorante (Azul Cielo Pontamina 6B); la dosis mínima resultante en el conejo fue de 0.3 µg y ésta provocó un diámetro de 10 x 10 mm a las 3 horas de haberse efectuado la inoculación. Cabe señalar que esta dosis es 300 veces mayor que la que se requiere de colerágeno para ocasionar el mismo efecto (123).

f. **Cardiotoxicidad de la TDH**

La hemolisina directa termoestable manifiesta capacidad letal en animales de experimentación tales como ratones, ratas y cobayos, los que mueren rápidamente al serles administrada en pequeñas dosis.

Entre las muchas toxinas bacterianas reportadas hasta ahora, la estreptolisina O, la tetanolisina y la hemolisina de Listeria monocytogenes son las que han causado las muertes más rápidas después de ser administradas por vía intravenosa. Los estudios realizados después de efectuada su inyección intravenosa en animales y que involucran pruebas electrocardiográficas y el análisis de sus efectos en corazones aislados perfundidos, han comprobado su carácter cardiotóxico y, al igual que estas toxinas, la hemolisina directa termoestable ha manifestado cardiotoxicidad mediante las mismas pruebas (81,172). Honda (81), inyectó intravenosamente una rata de 445 g con 15 µg de la TDH, registrando simultáneamente el electroencefalograma y el electrocardiograma correspondientes. El primero no manifestó cambios significativos; sin embargo, el electrocardiograma mostró un incremento de volta

je a los 13 segundos y el corazón dejó latir a los 33.5 segundos.

Los electrocardiogramas practicados a una rata de 448 g inyectada intravenosamente con 7.5 μ g de toxina, manifestaron que 15 segundos después de la inyección, la onda P se hacía más ancha y más alta que la normal; ello sugería la aparición de cambios en la conducción de impulsos intra-atriales. En ese mismo tiempo, el voltaje de QRS se incrementó y el de ST-T se alteró; de ésto se desprende que existen cambios en la conducción de impulsos intraventriculares de activación eléctrica. Después de 17 a 18 segundos, los intervalos PQ se hicieron más largos; de ello puede concluirse la posibilidad de una inhibición de la conducción atrio-ventricular. Después de 41 segundos, los patrones mostraron un cambio del foco de excitación en el ventrículo y la velocidad del corazón disminuyó debido a la reducida estimulación del músculo cardíaco. A los 50 segundos se desarrolló una palpitación ventricular acelerada, dejando de latir el corazón a los 148 segundos.

De lo anterior se puede concluir que la reducción existente en la excitación intra-atrial y en la intraventricular, es el efecto más notable en el animal, dando como resultado una enorme alteración tanto en la velocidad como en el ritmo cardíacos. Luego entonces, puede establecerse que la inyección intravenosa de la TDH de V. parahaemolyticus, afecta primariamente el corazón y, como consecuencia, unos cuantos minutos después los animales mueren.

La cardiotoxicidad de la hemolisina directa termoestable se ha demostrado también en cultivos de células de corazón de ratón (81). Si el corazón fetal se disocia en sus células componentes (mediante la aplicación de tripsina) y éstas se cultivan en el medio esencial mínimo de Eagle suplementado con suero fetal bovino al 10%, a 36°C, bajo una atmósfera de CO₂ al 5% y aire al 95%, las células en cuestión laten regularmente en forma espontánea y, al ser sembradas en cajas Petri recubiertas con gelatina e incubadas durante 1 día a 36°C, se obtienen células de miocardio aisladas y separadas por completo de otras sin que impulso alguno se transmite entre ellas; así, cada una late independientemente y a diferentes velocidades, que generalmente van de 10 a 260 latidos por minuto (promedio: 70 latidos/minuto). Posteriormente, cuando en dichas cajas se siembran 1 a 1.5 x 10⁶ células, se obtiene una aglomeración celular con un diámetro de 2 a 4 mm, que contiene más de 10⁵ células al término de un día de incubación. Todas las células de dichos grupos celulares laten regularmente y en forma sincrónica.

Los efectos que la TDH purificada mostró sobre un grupo de estas células de miocardio, se pueden resumir de la siguiente manera: la adición de 0.05 µg/ml de hemolisina al medio, incrementa ligeramente el latido pero éste vuelve a la normalidad en 10 minutos. Al agregarse 0.1 µg/ml, el latido se estimula rápidamente en un principio, pero se detiene súbitamente en 1 minuto y, 5 minutos después, el latido se restablece a la velocidad normal permaneciendo sin cambio. Análogamente, al adicionarse 0.2 µg/ml de la hemolisina, inicialmente el latido se incrementa, luego se detiene y, posteriormente, se restablece; sin embargo, el intervalo

existente entre la detención y el restablecimiento es más largo que cuando se adicionan 0.1 $\mu\text{g/ml}$. Al aplicarse 1 $\mu\text{g/ml}$ o más, nuevamente el latido se incrementa al principio, a continuación se detiene abruptamente pero, por último, se desintegra rápidamente casi la totalidad de las células. Sin embargo, en este último caso, extrañamente, una nueva adición de hemolisina antes de la mencionada desintegración, esta vez de 0.1 a 0.2 $\mu\text{g/ml}$ da como resultado que el latido se restablezca en unos cuantos minutos.

Con respecto a las células aisladas de miocardio, los resultados obtenidos son similares a los observados sobre grupos celulares y, teniendo en cuenta que las células cultivadas están libres de nervios, tejido conectivo y vasos sanguíneos, puede establecerse que la TDH ejerce su acción cardiopéptica directamente sobre las células del miocardio (81).

Goshima (76) estudió el mecanismo de la degeneración celular causada por la TDH y, mediante sus experimentos, encontró que la TDH provoca cambios morfológicos en las células cultivadas de miocardio y de melanoma de ratón (cepa B-16CWI), en presencia de Ca^{++} extracelular.

Las características de dichas transformaciones son:

- Degeneración de la forma celular (aparición de vesículas y posterior conversión en globo) en ambos tipos celulares.
- Contracción total de las células miocárdicas.
- Reducción o desaparición de los cables de actina y las redes de tubulina en las células de melanoma.
- Condensación del nucléolo en ambos tipos celulares.

Algunas observaciones sugieren que la degeneración de la forma celular depende de una ingestión excesiva de Ca^{++} extracelular por parte de las células. En sus estudios, Goshima utilizó el ionóforo A23187 como modelo comparativo; como se sabe, los ionóforos son compuestos de peso molecular moderado (entre 200 y 2000 daltons) que forman complejos de solubilidad lipídica con cationes polares, de los cuales el K^+ , el Na^+ , el Ca^{++} y el Mg^{++} así como las aminas biogénicas, son los más importantes desde el punto de vista biológico. Inicialmente se les consideró como metabolitos de microorganismos, pero en la actualidad existen muchos ionóforos sintéticos. El interés de algunos de estos compuestos reside en su capacidad para transportar iones "clave" a través de membranas biológicas, aumentando la permeabilidad de éstas hacia alguno de ellos; en el caso del A23187, se trata del ión Ca^{++} (142,144).

Resulta interesante observar que la toxina de Vibrio parahaemolyticus muestra la misma acción que el ionóforo A23187 en la degeneración de la forma celular: las células tratadas con la hemolisina toman en exceso el Ca^{++} extracelular mientras que las células de miocardio de pollo empleadas como control, no presentan degeneración en la forma celular y tampoco manifiestan una ingestión excesiva de Ca^{++} . Esto demuestra que la TDH incrementa la permeabilidad de las membranas celulares hacia el ión Ca^{++} y que cuando este catión extracelular está presente en una concentración suficientemente alta (igual o mayor a 10^{-6} M), fluye al interior de las células de acuerdo a su gradiente electroquímico, ya que la concentración de la forma libre intracelular es del orden de 10^{-7} M.

Un cambio morfológico característico en las células de miocardio de ratón es la contracción total de las miofibrillas. Es bien sabido que las miofibrillas cardíacas se encuentran relajadas en el citoplasma, donde existe Ca^{++} en concentraciones menores a 10^{-7} M y se contraen totalmente cuando el citoplasma contiene Ca^{++} a más de 10^{-6} M. Así, la degeneración de la forma celular, tanto de células miocárdicas como de las de melanoma de ratón, inducida por la TDH, podría deberse probablemente a un exceso de ingestión de Ca^{++} extracelular.

g. Receptores de Membrana para la TDH

Uno de los métodos utilizados para estudiar los receptores de membrana para toxinas bacterianas, consiste en examinar la inhibición de las actividades biológicas de las correspondientes toxinas por medio de gangliósidos (172); éstos son glicolípidos constituidos por una parte de ceramida y otra de carbohidrato y la composición de la porción oligosacárida de la molécula es la que distingue a los principales tipos y la responsable de su especificidad para alguna toxina (128). Los receptores de membrana de la toxina tetánica, la enterotoxina termolábil de E. coli y la enterotoxina colérica se han determinado por este método: al determinarse que el gangliósido $\text{G}_{\text{M}1}$ inhibía las actividades biológicas de la enterotoxina termolábil de E. coli y de la enterotoxina colérica (175), se estableció que aquél era su receptor correspondiente.

Los primeros intentos en los que se emplearon gangliósidos para determinar los receptores de membrana para la TDH, fueron realizados por Takeda, quien al utilizar una mezcla de éstos suplementada con colerágeno, pudo descartar al G_{M1} como responsable en la inhibición de las actividades biológicas de esta hemolisina (175).

Posteriormente, mediante estudios más selectivos, Takeda observó que cuando la hemolisina se incubaba con el gangliósido G_{T1} o el G_{D1a} su actividad hemolítica se perdía, lo cual no ocurría cuando se utilizaba el G_{M1} o el G_{M2} (176). Los gangliósidos G_{T1} y G_{D1a} son sensibles a la acción de la neuraminidasa y experimentos complementarios mostraron que, al ser tratados con dicha enzima, se suprimían los efectos inhibitorios de aquéllos sobre la actividad hemolítica de la TDH.

Basándose en el hecho de que la TDH causa hemólisis de los eritrocitos humanos pero no de los de caballo (203), Takeda efectuó un estudio comparativo: utilizó mezclas de gangliósidos obtenidas de membranas de glóbulos rojos humanos y de caballo y las sometió a cromatografía en capa fina; los resultados mostraron que las membranas de los de origen equino no contenían los gangliósidos G_{T1} y G_{D1a} ; por lo tanto, puede concluirse que es la ausencia de éstos la que les confiere resistencia frente a la acción de la TDH.

Otro efecto que se inhibe cuando se incuba la TDH con los gangliósidos G_{T1} y G_{D1a} es la toxicidad letal; los datos de la tabla demuestran que la preincubación de la hemolisina con el gangliósido G_{T1} inhibe significativamente su activi-

**Efectos Inhibitorios de Varios Gangliósidos sobre la
Actividad Letal de la TDH, al aplicarse a Ratones por
Vía Intravenosa**

Gangliósido	Tiempo de sobrevivencia después de la inyección (segundos)	
	25 nmol ^o	50 nmol ^o
G _{M1}	87 ± 10	88 ± 13
G _{M2}	81 ± 14	73 ± 3
G _{D1a}	360 ± 209	1076 ± 187
G _{T1}	926 ± 239	no hubo muertes ^o

- La hemolisina incubada sin el gangliósido mató a los ratones en 76 ± 4 segundos.

- Cantidad de gangliósido.
- Observación continuada por 24 horas.

Tomado de Takeda, 1976 (176).

dad letal en ratones y, aunque el G_{D1a} muestra efectos inhibitorios similares, éstos son menos evidentes. Por otro lado, la preincubación de la hemolisina con los gangliósidos G_{M1} y G_{M2} no afectó su actividad letal.

Por su parte, en 1978, Goshima (76) reportó que el gangliósido G_{T1} bloquea los efectos anteriormente descritos de la hemolisina sobre las células de miocardio de ratón.

De los fenómenos descritos, puede establecerse que los receptores de membrana para la hemolisina directa termoestable de Vibrio parahaemolyticus, son los gangliósidos G_{T1} y G_{D1a}; aunque el primero es el de mayor afinidad y consistencia.

h. Signos Clínicos y su Relación con la TDH

La sintomatología de la infección debida a Vibrio parahaemolyticus incluye los siguientes signos: diarrea, dolor abdominal, dolor de cabeza, vómito, fiebre, lasitud general, escalofríos, tenesmo y náuseas. De los anteriores, los más comúnmente observados son la diarrea y el dolor abdominal y, por lo general, la primera se presenta con una frecuencia menor de 10 veces al día, aunque en ocasiones puede llegar a presentarse en más de 21; generalmente su apariencia es acuosa, aunque eventualmente se presentan descargas de moco y sangre; además, se ha observado que la duración de la diarrea o de heces de consistencia blanda es de 4 a 7 días o más.

Aunque no existe evidencia comprobada de que la hemolisina directa termoestable sea la responsable de la diarrea observada en la infección por V. parahaemolyticus, varios hallagos sugieren que es, por lo menos, una de las principales causas de dicha manifestación.

Los síntomas cardiovasculares no se han señalado con frecuencia como complicación durante la infección por Vibrio parahaemolyticus; sin embargo, existen varios reportes que indican alteraciones a este nivel y, como se ha demostrado en animales, la TDH puede manifestar actividad cardiotoxica.

Takikawa, al administrar células vivas de V. parahaemolyticus a un voluntario, observó un cambio significativo en la presión sanguínea: la sistólica disminuía hasta 77 mm Hg en el primer día de la infección y regresaba a 136 mm Hg después de 4 días; por su parte, Saito observó una disminución significativa de la presión sanguínea en pacientes víctimas de envenenamiento alimentario causado por este microorganismo, durante los dos primeros días de la enfermedad (172).

En otro experimento tendiente a investigar signos cardiovasculares, Honda comparó electrocardiogramas practicados a los pacientes durante la fase aguda de gastroenteritis debida a Vibrio parahaemolyticus y, después de su recuperación, observó que la onda T, que indica la relajación ventricular, era significativamente más baja durante la enfermedad que la exhibida por el individuo al recuperarse. Mientras tanto, la onda P, que representa la propagación de un impulso del nódulo sinatrial sobre la superficie de los dos atrios,

llegó a ser más amplia y alta durante la enfermedad, pero se normalizó al recobrase el paciente (172).

Miwatani, examinando los títulos de anticuerpos contra la hemolisina directa termoestable, encontró un incremento en el título de antihemolisina en un 33% de los pacientes: durante el día de admisión al hospital los títulos eran muy bajos, ya que su incremento comienza 5 días después del ingreso y alcanzan su máximo después de 10 a 15 días (172). Miyamoto reportó observaciones similares (123).

De los datos anteriores puede concluirse que la hemolisina directa termoestable producida por Vibrio parahaemolyticus en la cavidad intestinal, es absorbida durante la enfermedad y circula por la corriente sanguínea originando las alteraciones electrocardiográficas.

Durante los últimos 20 años, se han reportado en Japón 74 casos de muerte por envenenamiento alimentario debido a este microorganismo; este dato representa el 32.3% de todos los casos de defunciones debidas a envenenamiento alimentario bacteriano. En muchos casos, los decesos se deben a insuficiencia cardíaca, pero como no existen estudios histopatológicos acerca de los efectos de la hemolisina directa termoestable en tejidos cardíacos, es difícil concluir que dicha toxina sea la responsable. Sin embargo, es muy probable que la cardiotoxicidad de la hemolisina directa termoestable esté relacionada de algún modo con la mortalidad derivada de la infección originada por Vibrio parahaemolyticus (172).

a.4.5 Métodos de Detección

La detección de la hemolisina de Kanagawa (termoestable directa), se efectúa generalmente en el medio diseñado por Wagatsuma desde 1968; sin embargo, este investigador modificó posteriormente su composición con el fin de facilitar la visualización de la hemólisis producida por las cepas KP+ ; elevó la concentración de eritrocitos de 2 a 5% y, actualmente, a este medio se le conoce como agar modificado de Wagatsuma (122). Otros medios en los que se ha logrado detectar la producción de la hemolisina in vitro, son: BHI, caldo nutritivo, Karunasagar (101) y Chervonogrodzky (54).

Sin embargo, hoy en día se cuenta con métodos serológicos mediante los cuales puede determinarse si una cepa es o no productora de hemolisina termoestable directa (KP+) y éstos son tan sensibles que pueden emplearse, inclusive, para realizar la cuantificación de la sustancia en cuestión y esclarecer casos esporádicos debidos supuestamente a cepas KP-.

Entre los más confiables, se cuenta el de la hemaglutinación pasiva diseñado por Ohashi en 1978 (136); en éste, el autor adsorbió anticuerpos anti-TDH a glóbulos rojos humanos y posteriormente los enfrentó a filtrados de cultivos líquidos de V. parahaemolyticus; cuando las cepas en cuestión producían la lisina correspondiente, se originaba la aglutinación específica de los eritrocitos.

Efectuando un análisis retrospectivo de cepas presumiblemente KP-, tanto de origen humano como provenientes de alimentos del mar, este investigador encontró que la hemolisina podía ser detectada en cantidades tan pequeñas como de 1 ng/ml, a dife-

rencia de la técnica de Kanagawa que requiere cuando menos, de 1 $\mu\text{g/ml}$; ello se reflejó en su trabajo experimental dado que demostró que tanto cepas dudosas KP+ como algunas presumiblemente KP-, daban reacciones positivas.

Con la misma finalidad, Honda diseñó posteriormente otros dos métodos: una prueba de Elek modificada y otra de inmunohalo (83). La primera se emplea generalmente para llevar a cabo la detección de cepas toxigénicas en las especies Corynebacterium diphtheriae y Staphylococcus aureus; normalmente se realiza empleando un medio sólido en una caja de Petri, en la cual se han colocado tiras estériles de papel filtro impregnadas con antitoxina y, una vez solidificado el agar, se siembra por estría recta un inóculo del cultivo bajo estudio en forma perpendicular a las tiras de papel; efectuado lo anterior, se incuban las placas durante 24 horas y si los microorganismos investigados son toxigénicos, se observan bandas de precipitación debidas a la reacción antígeno-anticuerpo en las zonas en que las concentraciones de ambos reactantes son equivalentes (58).

En el caso de la modalidad desarrollada por Honda, las tiras de papel se substituyen por pozos que se practican en el agar después de haberse obtenido el crecimiento bacteriano (a 5 mm de éste); en dichos pozos se añade el suero antihemolisina. La placa se mantiene a temperatura ambiente durante toda una noche y, al cabo de este período, se examina para observar la formación de una línea de precipitación cuando el microorganismo produce la hemolisina en cuestión.

Por su parte, la prueba del inmunchalo se realiza inoculando a la bacteria en un medio con agar al que previamente se le ha incorporado el suero antihemolisina o bien la IgG correspondiente. La placa se incuba a 37°C durante toda la noche y, al término de ésta, se observa un halo de precipitación en el caso de que las colonias resulten productoras de hemolisina directa termoestable (80).

Si bien esta metodología es análoga a la de RID, no puede realizarse en forma cuantitativa, pues no es posible estandarizar el inóculo, debido a que dentro de la misma especie bacteriana se han detectado grandes diferencias en los tiempos de generación (191).

Aunque la sensibilidad de los dos últimos métodos descritos no es tan elevada como la mostrada en la hemaglutinación pasiva, ambos se consideran reproducibles y más fáciles de efectuar y leer que la técnica rutinaria llevada a cabo en el agar de Wagatsuma (172).

Más recientemente, Honda propuso el empleo de dos medios de cultivo modificados para la aplicación de las dos pruebas serológicas que diseñó: el agar azul de bromotimol-Teepol y el agar arabinosa-sulfato de amonio-colato. Estos medios son selectivos para el aislamiento de V. parahaemolyticus, pero al serles aplicadas pequeñas variantes en cuanto a composición, se logró que el microorganismo incrementara la producción de hemolisina; por tanto, con estos medios modificados es posible aislar V. parahaemolyticus e investigar su reactividad al fenómeno Kanagawa en la misma placa, disminuyéndose el tiempo de identificación (83).

B. FACTORES ASOCIADOS A LA INFECCION

La principal alteración causada por Vibrio parahaemolyticus es la diarrea, la cual generalmente es acuosa y, en ocasiones, presenta moco y sangre (172); aún no se ha determinado el mecanismo mediante el cual este microorganismo la causa; sin embargo, se ha comprobado que dependiendo de la cantidad de bacterias ingeridas con los alimentos, aquéllas se multiplicarán rápidamente en el intestino después de que un número considerable haya sobrevivido a la acción de los jugos gástricos.

A efecto de analizar la sobrevivencia de V. parahaemolyticus frente a la acción de estos fluidos gástricos, Vanderzant (194) llevó a cabo un estudio en el que empleó el contenido del tracto gastrointestinal de cerdo, dada su estrecha similitud con el del humano; en mezcladores separados, colocó el contenido del estómago así como el de los intestinos delgado y grueso, inoculando en cada uno de ellos 10^6 microorganismos por mililitro; posteriormente, determinó el número de sobrevivientes en intervalos similares a los que el alimento permanece en cada una de estas secciones.

Una vez obtenidos sus resultados, concluyó que la efectividad inhibitoria de la acidez estomacal sobre V. parahaemolyticus dependía del tipo de proteína presente en la dieta, ya que el pH del contenido gástrico se incrementa considerablemente cuando el órgano contiene alimentos. En el experimento, el pH del contenido estomacal era de 6.0 y, bajo estas condiciones, es claro que V. parahaemolyticus puede vencer el efecto inhibitor de las secreciones existentes.

Aún cuando inmediatamente la población viable se disminuye en una magnitud de 100 veces, seguida a los 30 minutos por otra de 10, en la siguiente hora y media permanece todavía una población viable de 10^3 ; el alimento empieza a abandonar el estómago humano en 30 minutos y se completa su eliminación en 4 a 5 horas. Los microorganismos vivos que superen el estómago, pueden multiplicarse en el intestino delgado.

Ordinariamente, la patogenicidad del microorganismo se asocia con su capacidad de multiplicarse en el tracto intestinal y con su reactividad al fenómeno de Kanagawa. Los experimentos con voluntarios humanos, así como los efectuados en animales, parecen apoyar este punto de vista.

Sanyal y Sen (158), confirmaron las propiedades enteropatógenas de las cepas KP+ mediante experimentos realizados en voluntarios humanos; las personas sometidas al análisis se dividieron en dos grupos y, mientras a uno de ellos se le suministraron cepas de V. parahaemolyticus KP+ por vía oral, al otro se le administraron cepas KP-; los resultados obtenidos fueron los siguientes: en el primer grupo, los sujetos que habían ingerido entre 2×10^5 y 3×10^7 UFC desarrollaron rápidamente los síntomas de la gastroenteritis; en el segundo grupo, aún individuos que recibieron cantidades entre 4×10^9 y 1.6×10^{10} UFC no presentaron signo alguno de la enfermedad.

En 1968, Sakazaki (154) reportó que un laboratorista desarrolló la sintomatología luego de la ingestión accidental de 3×10^5 células de una cepa de V. parahaemolyticus KP+ y, por el contrario, experimentos realizados con quince cepas KP- en voluntarios humanos, a quienes se les administraron por vía oral más de 10^9

células, no manifestaron aparición alguna de gastroenteritis.

Si bien la capacidad enteropatógena parece propia de las cepas KP+, también se ha comprobado que las cepas KP- comprenden una pequeña aunque significativa proporción (3.5 a 11.6%) del total aislado de muestras de pacientes durante los brotes de gastroenteritis; inclusive, ocasionalmente es el único tipo de cepa aislado de los pacientes afectados (29,188).

Barrow y Miller (10), durante un estudio tendiente a analizar la relación existente entre el crecimiento de V. parahaemolyticus y su patogenicidad, encontraron que las cepas KP+ desarrollaban mejor a 37°C y en condiciones ácidas, mientras que las KP- lo hacían en forma óptima a 25°C y sobrevivían más tiempo en condiciones alcalinas.

Con respecto a la investigación de la patogenicidad de Vibrio parahaemolyticus en animales de laboratorio, las publicaciones aportan informaciones muy interesantes, siendo el ratón y el conejo los modelos analizados más frecuentemente.

B.1 Inoculación en Ratones

Los estudios que aplican la inoculación de V. parahaemolyticus, tanto en ratones adultos como en lactantes, confirman que se requiere un gran número de microorganismos para manifestar letalidad.

En los experimentos realizados por Fujino (141), se comprobó que los ratones alimentados con V. parahaemolyticus desarrollaban una septicemia que los conducía a la muerte.

Zen-Yoji (93), utilizando como modelo el cojinete plantar del ratón, demostró que ambos tipos de microorganismos (KP+ y KP-) eran uniformemente tóxicos y causaban reacciones altamente edematosas; en contraste, las cepas de V. alginolyticus utilizadas con fines comparativos, resultaron relativamente benignas, ya que produjeron procesos inflamatorios significativamente menores. Por otro lado, se detectó que mientras los filtrados concentrados (de cultivos libres de células) manifestaban letalidad al ser inoculados en las patas de ratón, los lisados celulares del microorganismo sólo provocaban respuestas levemente edematosas.

En los trabajos realizados por Pickar, la vía oral no se mostró tan efectiva en lo que respecta a letalidad; esto quizá se debió al empleo de cepas diferentes, o bien a que la edad del cultivo utilizado no era la óptima. Sea cual fuere la razón, el hecho es que este autor utilizó como ruta de inoculación la vena caudal del ratón y, en tal modelo, la DL_{50} resultó del orden de 10^8 microorganismos (141).

En los experimentos antes descritos, se encontró que la piel de los ratones inyectados se hallaba generalmente arrugada, la respiración era rápida e irregular y los animales se evitaban el uno al otro; dichos efectos no se observaron en los animales utilizados como control.

Por otro lado, Pickar (141) aduce que, en cuanto a patogenicidad, la producción de alguna exotoxina es una posibilidad que no puede ser excluida, ya que los niveles de ésta(s) substancia(s) pueden ser tan bajos que su concentración y purificación sean indispensables para que sus efectos fisiológicos puedan demostrarse en

animales de laboratorio. Además, encontró que los ratones inyectados con filtrados de cultivos líquidos mostraban una débil respuesta tóxica, lo cual le hizo pensar que algún material de la pared celular (quizá una endotoxina) liberado en el medio por los cultivos más viejos, pudiera ser la substancia responsable.

B.2 Inoculación en Conejos

Entre los diferentes modelos experimentales desarrollados en conejos, existe uno que destaca por su difusión: el asa intestinal ligada.

Esta técnica la diseñaron inicialmente S.N. De y D.N. Chatterjee para estudiar el mecanismo de acción de Vibrio cholerae sobre la membrana mucosa del intestino y, posteriormente, varios grupos de investigadores la han aplicado con el fin de describir el carácter enteropatógeno de un gran número de bacterias, incluyendo a Vibrio parahaemolyticus.

Para realizar la prueba del asa ligada, se emplean conejos blancos de raza Nueva Zelanda (cuyo peso varía entre 2 y 2.5 Kg), los cuales, antes del inicio del análisis, se mantienen en ayuno durante 48 horas, así como sin suministro de agua por un lapso de 24 horas.

Para dar comienzo al experimento, los animales se anestesian con nembutal (utilizándose una dosis de 100 a 150 mg por vía intravenosa), se depila el área abdominal y en seguida se practica una laparotomía. Posteriormente, bajo condiciones asépticas, se deja expuesto el fleón y 30 cm por arriba de la unión ileocecal,

se ligan entre 6 y 8 asas de 12 cm cada una con sutura de seda, dejando entre ellas segmentos de 2 cm.

Las muestras bajo investigación (células, lisados, sobrenadantes, etc.) se inyectan en volúmenes de 1 ml en cada asa y el sitio de inoculación debe quedar aislado del resto del asa de prueba al ligarse un nuevo segmento de 2 cm; con esto, el asa final de prueba queda de tan sólo 10 cm.

Además de las substancias probadas, cada animal debe recibir inyecciones de cepas conocidas (tanto reactivas como no reactivas), suspensiones control y soluciones blanco en el resto de las asas ligadas, variando la región (posición), de acuerdo al criterio del investigador.

Durante la prueba, se les permite a los animales tomar agua mas no ingerir alimentos y, a las 24 horas, los conejos se sacrifican y el asa intestinal se separa eliminándose el exceso de mesenterio y tejido graso.

Las reacciones positivas se manifiestan como una gran distensión del intestino, debido a la cantidad de fluido acumulado, pero los resultados se consideran válidos sólo en aquellos casos en los que el fluido intraluminal se encuentra presente en el asa control positiva y ausente en todas las asas que hacen las veces de blanco y controles negativos.

Así, se obtiene un índice de acumulación de fluidos, proveniente del cociente obtenido del volumen de fluidos acumulados en el asa (ml) entre la longitud de la misma (cm). Una prueba se considera positiva si el índice que origina es 3 veces mayor que el de los controles negativos (90,167,183,185).

Los numerosos trabajos realizados con V. parahaemolyticus en los que se ha empleado el modelo del asa ligada de conejo (RIL), han proporcionado interesantes resultados:

Twedt comprobó que ambos tipos de cepas (KP+ y KP-) son capaces de causar acumulación de fluidos en el RIL, si bien las KP+ lo hacen con mayor frecuencia (185). Asimismo, al comparar la reactividad entre lisados celulares, suspensiones de células vivas, células muertas por calor, extractos de paredes celulares y filtrados de cultivos, encontró que sólo las células vivas y los lisados celulares eran capaces de originar la acumulación de fluidos. Por ello concluyó que la reactividad en el RIL, es un atributo de la materia particulada y que, además, la(s) sustancia(s) reactiva(s) es(son) termolábil(es) de acuerdo a los resultados obtenidos al emplearse células expuestas al calor.

Del mismo modo, observó que, mientras el material obtenido de cepas que habían crecido en medio BHI daba reacciones positivas, el proveniente de cepas desarrolladas en TSA era negativo.

Por su parte, Sakazaki (154) obtuvo resultados similares al observar que mientras las células vivas producían dilatación en el RIL, las muertas con acetona, cloroformo y calor, no lo hacían. Sin embargo, al ensayar con filtrados de cultivos, encontró que éstos también producían dilatación en dicho modelo (resultado diferente al reportado por Twedt). La interesante explicación de este singular fenómeno tuvo lugar cuando Johnson revisó la metodología empleada: los sobrenadantes, después de ser filtrados, se liofilizaban y, antes de la inoculación, se reconstituían con 1/10 del volumen original de agua destilada estéril suplementada con antibióticos. Johnson y Galia (90) demostraron que durante el proceso de liofilización se provocaba la retención de

compuestos de bajo peso molecular, los cuales se perdían al aplicar un método de concentración por diálisis en frío contra Carbowax al 30% (tal como lo hacía Twedt pero no Sakazaki). Debido a la naturaleza hipertónica del medio de cultivo en el que generalmente se cultiva V. parahaemolyticus, se obtienen altos niveles de NaCl (más del 20%) durante la liofilización y, además, la concentración mencionada se incrementa en una magnitud de 10 veces al reconstituir con tan sólo 1/10 del volumen original; con ello se crean soluciones hiperosmolares que pueden producir reacciones falsas positivas en el RIL.

Consecuentemente, es importante determinar y controlar la concentración de NaCl o la osmolaridad de todas las preparaciones que vayan a probarse en este modelo.

Brown (34) llegó a resultados similares a los de Johnson y Calia y, de igual manera, confirmó hallazgos anteriores de Twedt (185) respecto a la influencia ejercida por las condiciones de crecimiento del microorganismo sobre la capacidad de dilatar al RIL: al ensayar el material obtenido a partir de cepas desarrolladas en medio BHI (lisados celulares, sobrenadantes, células lavadas), las respuestas eran positivas, pero al hacerlo con el proveniente de TSA, los resultados fueron negativos. Por tal motivo, al igual que Sakazaki, propone la existencia de un factor tóxico asociado probablemente a la pared celular y sugiere, al igual que Twedt, que su formación se ve favorecida en el medio BHI y no en el TSA.

Si bien dicho factor no se ha encontrado aún, Johnson y Calia sugieren que las posibilidades de que exista no deben excluirse ya que quizá este microorganismo produzca sustancias que son

reactivas en el intestino humano pero no en los sistemas estándar de ensayo para enterotoxinas; por otro lado, también es probable que Vibrio parahaemolyticus produzca alguna enterotoxina in vivo pero no in vitro (90).

Posteriormente, Twedt (188) realizó un estudio para determinar la dosis efectiva en el modelo del asa ileal ligada de conejo y demostró que, para lograr una respuesta eficaz (50% de positividad en las asas de prueba), se requiere la inyección de un número considerable de células KP+; en este punto, cabe señalar que el mismo autor descubrió que no siempre las cepas KP+ dan respuestas positivas en el modelo del RIL (185).

La dosis efectiva mínima (DE₅₀) que encontró para las cepas probadas fue de 10⁵ células, cantidad comparable con la dosis infectiva reportada para voluntarios humanos: 2 x 10⁵ a 3 x 10⁷ células (158,154).

Los datos obtenidos tanto en voluntarios humanos como en modelos animales, demuestran que, para que V. parahaemolyticus desencadene la enfermedad, requiere ser ingerido en gran número; entonces, la infectividad de este microorganismo es comparable con la que generalmente se reconoce para Salmonella: estudios con voluntarios humanos (Mc Cullough y Eisele, 118) demostraron que la dosis infectiva oral para varias especies de Salmonella iba de 125,000 a más de 10⁹ células, aunque existen reportes ocasionales de brotes esporádicos de salmonelosis en los que se citan cifras tan bajas como de 1000 células (D'Aoust, 59), cantidad análoga a la obtenida por Twedt para una cepa de Vibrio parahaemolyticus que sólo requirió 100 UFC para provocar una respuesta positiva en el modelo del RIL.

En otro experimento realizado por Twedt (188), el inóculo para el RIL estaba constituido por una mezcla de V. parahaemolyticus y V. alginolyticus y, como resultado, se obtuvo un significativo aumento en las DE₅₀ de algunas cepas (de 17 a 42 veces mayores que cuando se empleaba a la primera especie en forma pura). Lo anterior sugiere que pueden existir efectos inhibitorios por competencia en etapas anteriores a las de virulencia, posiblemente en la adherencia.

B.3 Adherencia de Vibrio parahaemolyticus

Aunque los microbiólogos marinos han demostrado el hecho de que las bacterias deben unirse a las superficies para evitar ser arrastradas por las corrientes acuáticas, hasta sólo recientemente se ha reconocido en forma amplia que la adherencia es una determinante ecológica importante en la colonización de sitios específicos en plantas y animales y, en particular, que constituye un evento relevante en la patogénesis de las enfermedades infecciosas.

Si bien los primeros reportes sobre adherencia bacteriana se remontan al año 1908 con los trabajos realizados por Guyot, el estudio formal sobre los mecanismos que la regulan data de poco más de 10 años.

El proceso de unión de la bacteria a la célula huésped y la importancia de este evento durante la infección y la prevención de las enfermedades infecciosas bloqueando la adherencia, son algunos de los puntos más estudiados acerca de este fenómeno. En este sentido, es necesario definir dos términos: adhesina y receptor. Las adhesinas son las estructuras adhesivas que se en-

cuentran en la superficie de los microorganismos, mientras que los receptores son las estructuras adhesivas complementarias que se localizan en la superficie de las células huésped.

El término adhesina (acuñado por Duguid en 1955) se prefiere al concepto de "ligando", ya que este último comúnmente se aplica a una molécula pequeña y las estructuras adhesivas bacterianas con frecuencia se componen de grandes arreglos poliméricos, como sucede con los apéndices filamentosos de muchas bacterias Gram-negativas denominados fimbrias, al igual que en las proyecciones pilosas de un buen número de microorganismos Gram-positivos que se han denominado fibrilas.

Los receptores para las bacterias Gram-negativas en las membranas celulares están compuestos, en general, de carbohidratos. En muchos casos, como sucede para varias especies de enterobacterias, su recepción parece residir en la existencia de un solo azúcar, principalmente manosa. Así, se ha observado que este carbohidrato, entre los muchos analizados, es capaz de bloquear la unión de estos microorganismos a las células huésped. En otros casos, dichos receptores parecen estar compuestos por polímeros de azúcares más complejos y, a diferencia de los anteriores, el receptor para algunos microorganismos Gram-positivos parece residir en una proteína de membrana.

Normalmente, las superficies mucosas del huésped sano son impenetrables para los microorganismos patógenos debido al considerable número de mecanismos de limpieza que operan en ellas; son bañadas constantemente por secreciones cargadas con enzimas antibacterianas y anticuerpos que impiden los intentos de los patógenos por colonizarlas. Así, los que no se adhieren son arrastrados hacia

el contenido luminal por medios mecánicos tales como la tos, el estornudo, la acción de cilios, deglución, peristalsis y excreción.

Así las cosas, los patógenos exitosos son aquéllos que no sólo cuentan con la capacidad de penetrar las defensas locales y adherirse a las células mucosas, sino que también se procuran nuevas superficies conforme las células colonizadas van siendo desmenuadas y, eventualmente, penetran la barrera celular del epitelio o excretan alguna toxina.

Aunque respecto a Vibrio parahaemolyticus las investigaciones de esta naturaleza son limitadas, existen algunos reportes sobre la actividad de la bacteria entera y de los filtrados correspondientes en sistemas de cultivo de tejidos.

Sakazaki (154) observó la destrucción de monocapas de células HeLa después de 3 horas de exposición a vibrios vivos KP+; el mismo efecto, sólo que en dos horas, fue provocado por filtrados de cultivos, sin que en este último caso influyera el tipo de reacción KP.

Al ensayar los mismos modelos en células L, éstas manifestaron falta de reactividad de sus núcleos a la tinción de Giemsa después del contacto con cepas KP+ y con filtrados de cultivos; sin embargo, estos últimos no destruyeron las células. Al aplicarse TDH, se puso de manifiesto una clara destrucción celular que afectaba tanto a células HeLa como a las L, si bien las propiedades tintoriales de los núcleos de estas últimas permanecieron sin cambio.

A diferencia de Sakazaki, Ghosh (71) no encontró efecto citotóxico alguno sobre células de riñón de mono, al serles aplicados filtrados de cultivos y lisados de V. parahaemolyticus.

Posteriormente, Carruthers (38) comprobó la citotoxicidad de células vivas de V. parahaemolyticus frente a células HeLa y, aunque observó cambios celulares con ambos tipos de cepa (KP+ y KP-), el efecto se presentó más rápido y completo cuando empleó KP+; las variaciones en cuestión consisten inicialmente en la vacuolización del citoplasma, seguida por su contracción y, poco después, por cambios picnóticos.

Poco después en 1977, Carruthers (40), al ensayar un modelo de adherencia con células HeLa y células de intestino fetal humano (HFI), pudo notar que las cepas KP+ se adherían rápidamente a las HeLa en suspensión así como a las HFI en monocapa; en contraste, las KP- no se adherían a las células HeLa y lo hacían pobremente con las HFI. Asimismo, observó que en el sistema de células HFI, la adherencia era dependiente del Ca^{++} presente en la mezcla de incubación y que se veía afectada por el pre-tratamiento de las bacterias con peryodato; en base a estos datos, la autora sugirió que las glicoproteínas o los glicolípidos de la superficie celular y/o el sitio de inserción lipopolisacárida en la membrana externa de la pared celular, son esenciales para la adherencia.

Durante un estudio complementario en 1979, Carruthers (39) encontró que el material polisacárido de la cápsula, parcialmente purificado, inhibía la adherencia de V. parahaemolyticus al sistema de células HFI. Esta observación del efecto inhibitorio de una fracción bacteriana que contenía un polisacárido cargado

negativamente, la condujo a analizar el efecto de otros carbohidratos polianiónicos sobre la adherencia de este microorganismo. De este modo, se probaron muchos compuestos, entre ellos la manosa, pero no mostraron efecto alguno sobre la adherencia; así, se descartó a la manosa como posible receptor de la(s) adhesina(s) de V. parahaemolyticus. Sin embargo, muchos otros polianiones de diferente composición bioquímica, configuración estructural y peso molecular, manifestaron un marcado efecto inhibitorio. La autora sugirió para esta aparente discrepancia una explicación en términos fisicoquímicos: bajo condiciones fisiológicas, el Ca^{++} puede unirse a los grupos aniónicos disponibles en una o ambas superficies, disminuyendo así las fuerzas de repulsión y permitiendo la unión de la bacteria y la célula epitelial mediante fuerzas de Van der Waals; alternativamente, los iones Ca^{++} pueden formar un puente iónico entre ambas superficies celulares. Del mismo modo, pueden formarse enlaces electrostáticos entre los polianiones agregados experimentalmente y la bacteria o la célula, produciendo así la oportunidad de interacción entre ellas.

La carga negativa neta de la bacteria se ve afectada por la composición capsular; así, se ha encontrado que la composición bioquímica de la cápsula de bacterias bien estudiadas tales como S. pneumoniae y N. meningitidis, varían notablemente de cepa a cepa. De V. parahaemolyticus se ha reportado el análisis bioquímico de un solo antígeno capsular, el K15 de la cepa A55, el cual está constituido por ácido 2-amino-2-desoxiheurónico (183) y no contiene ácido siálico; en su trabajo, Carruthers observó la liberación de ácido siálico por una de las cepas examinadas y, de este modo, estableció que la carga superficial de este microorganismo variará considerablemente dependiendo de la cepa

que se ensaye, influyendo en forma directa sobre sus propiedades adhesivas.

Joseph y Sochard (93), al emplear cepas clínicas de Vibrio parahaemolyticus, tanto KP+ como KP-, fueron incapaces de distinguir alguna diferencia entre ellas en cuanto a sus propiedades adhesivas al ensayarlas sobre células HeLa.

De manera similar, Gingras y Howard (73) no encontraron correlación entre la reactividad KP y la adherencia, al analizar un sistema de células intestinales humanas por medio de radioensayo y microscopía de luz. En el primer caso se pusieron en contacto células intestinales 407 y vibrios marcados con valina-C¹⁴; el sistema se lavaba a intervalos definidos, eliminándose así los vibrios que no se adherían y la adherencia se medía por medio del centelleo proporcionado por los vibrios adheridos. En el segundo caso la preparación se fijaba con metanol, se teñía con cristal violeta y se observaba en objetivo 100X a inmersión. No obstante los resultados obtenidos, los autores coincidieron en señalar que dicha observación no excluye la posibilidad de que la hemolisina juegue algún papel en la virulencia, una vez que la bacteria se haya adherido a la célula huésped.

Poco después, Hackney (78) investigó la adherencia de Vibrio parahaemolyticus a células HFI, encontrando que todas las cepas probadas manifestaban adhesión, si bien el grado de la misma dependía de varios factores: la edad del cultivo, la reacción KP, el tiempo de exposición del microorganismo a dichas células y la composición del medio de crecimiento. Así, observó que las bacterias cosechadas hacia el final de la fase log se adherían más intensamente que las probadas durante la fase estacionaria.

Las cepas virulentas, es decir, las implicadas en casos de envenenamiento alimentario, mostraban una alta capacidad adherente sin que en ello influyera la reacción KP; sin embargo, las cepas KP- obtenidas a partir de alimentos marinos, exhibieron débiles propiedades adherentes, mientras que las KP+, aisladas también de alimentos, se adherían fuertemente. En este trabajo, el autor pudo notar que la diferencia entre cepas patógenas y avirulentas es de naturaleza cuantitativa, detectándose las variaciones más grandes en los primeros 10-15 minutos de exposición a las células de ensayo. Además, encontró que la presencia del ión férrico en el medio de crecimiento, favorecía la adherencia de V. parahaemolyticus a las células HFI. Quizá esto se deba a que dicho catión disminuye la carga negativa existente entre ambos tipos celulares.

Basándose en estos resultados, Hackney propone analizar la adherencia como un posible método de diferenciación entre cepas virulentas y avirulentas, aunque sugiere que antes debe efectuarse un gran número de pruebas con aislamientos del ambiente marino. Además, formula una hipótesis en la que postula que, dentro de la población de V. parahaemolyticus presente en el ambiente marino, existe un espectro de estados de virulencia que va desde los que lo son en extremo (KP+), hasta los completamente avirulentos. Las cepas virulentas KP- podrían representar grados intermedios en dicho espectro.

Una forma de detectar estas cepas virulentas KP- presentes en alimentos, sería examinar su intensidad adhesiva; en consecuencia, la adherencia, junto con la reacción de Kanagawa, pueden constituir una forma más confiable de valorar el potencial patógeno de una determinada cepa.

En 1981, Iijima (87), investigó la adherencia de Vibrio parahae-
molyticus a células HeLa y a las de epitelio intestinal (CCL-6)
y su relación con la reacción KP, con su capacidad de coloniza-
ción en cobayos y con su actividad letal en ratones. Su estudio
no proporcionó datos de que existiera asociación alguna entre
adherencia y reacción KP ya que para ambos tipos de cepa (KP+ y
KP-) encontró algunas adherentes y otras que no lo eran. Para
complementar el estudio, antes de analizar la adherencia, trató
las células HeLa con TDH, en espera de verificar si aquella se
favorecía con la presencia de la hemolisina, pero tampoco en
este caso se afectó la adherencia. Del mismo modo, utilizó suero
anti-TDH obteniendo los mismos resultados. Por otro lado, com-
probó el hecho de que la adherencia es dependiente de la viabi-
lidad del microorganismo.

Seis horas después de inyectar distintas cepas en el intestino
delgado de cobayos, encontró que las cepas "adherencia (+)"
estaban colonizando el epitelio intestinal en números similares
y aún superiores al inoculado; en cambio, en el caso de las
cepas "adherencia (-)", los números hallados eran inferiores al
aplicado.

Además este investigador observó que las cepas KP+ adherencia
(+), resultaban letales para el ratón seis horas después de su
inoculación; en ese mismo tiempo, sólo 1 de 10 ratones moría
al utilizar cepas KP+ adherencia (-). La actividad letal de las
cepas KP-, tanto las adherencia (+) como las que no lo eran,
fue la misma que la de las cepas KP+ adherencia (-).

Los resultados de los estudios de Iijima indican que la adherencia de Vibrio parahaemolyticus a células epiteliales cultivadas, se relaciona con la colonización; por tanto, estos modelos pueden utilizarse para estudiar el(los) factor(es) adhesivo(s), aún no identificado(s) de este microorganismo.

Por otra parte, tanto el grupo de investigación de Iijima, como el de Joseph, han sugerido que el flagelo L de V. parahaemolyticus es un factor de virulencia, ya que las cepas que no lo poseen muestran una adherencia negativa o débil; sin embargo, el flagelo L, por sí mismo, no es el factor adhesivo puesto que algunas cepas que lo poseen, no se adhieren a las células epiteliales. Por tanto, estas cepas deben carecer de algún otro factor adhesivo y, en consecuencia, es posible que el flagelo L sea sólo un accesorio en la adhesión (87).

En 1983, Reyes (145) estudió la hemaglutinación y la adhesividad de cepas de V. parahaemolyticus epidemiológicamente distintas, empleando células del epitelio de la mucosa bucal; éstas se vienen utilizando mucho recientemente para investigar la adherencia en patógenos entéricos, ya que facilitan el estudio de los primeros eventos de este fenómeno. Se trata de células mucosas de origen humano, fácilmente accesibles, que comparten algunas similitudes con el epitelio mucoso gastrointestinal. La conclusión de que existe una gran relación entre el sistema celular bucal y el gastrointestinal, proviene de la evidencia clínica de que la colonización de la cavidad oral puede ocurrir en forma simultánea con la gastrointestinal durante el proceso infeccioso natural ocasionado por patógenos entéricos; también se ha observado cierta asociación entre estos estudios y ciertos patrones de hemaglutinación (HA), en la que participan eritrocitos humanos

y de otras especies animales, tanto en presencia como en ausencia de L-manosa; como se recordará, la D-manosa interfiere los procesos adhesivos de un gran número de enterobacterias (145, 137).

En el trabajo de Reyes se hizo manifiesto que, en la mayoría de los casos, la HA era manosa-resistente (no se inhibía por la adición de este carbohidrato), con excepción de la que se verificaba con hematíes de conejo, la cual resultó manosa-sensible, en el caso de cepas KP+. La diferenciación parcial entre cepas KP+ y KP- efectuada por medio de la reacción manosa-sensible en glóbulos rojos de conejo, puede resultar de particular interés con base en el modelo largamente usado para discriminar entre cepas patógenas (KP+) y no patógenas (KP-): el asa ligada de conejo. En consecuencia, el autor propone revisar ampliamente los parámetros de la HA con eritrocitos de conejo, para optimizar la técnica y, con ello, su confiabilidad como criterio de selección entre las diferentes cepas de este microorganismo.

Este mismo investigador encontró que todas las cepas probadas se adherían a las células epiteliales de la mucosa bucal, tanto en presencia como en ausencia de manosa, si bien el grado de adhesión variaba. Sin embargo, no pudo establecer una correlación entre los datos obtenidos, aún cuando complementó su estudio probando las cepas en el modelo del asa ligada de conejo. En este sentido, explica que ésto puede deberse a que las células escogidas tenían un inadecuado arreglo de sitios "blanco" y concluye que la adherencia exhibida por V. parahaemolyticus para las células del epitelio bucal humano, no puede tomarse como un medio de predicción de patogenicidad.

Los datos aportados por los estudios hasta ahora realizados, no establecen una posible relación entre el proceso de adhesión y el fenómeno de Kanagawa; sin embargo, la hipótesis formulada por Hackney (78) sobre el espectro de estados de virulencia dentro de esta especie bacteriana, podría explicar algunos puntos discordantes entre los trabajos publicados, sobre todo si se consideran los hallazgos de Chashi (136) mediante su método de hemaglutinación pasiva. Por otro lado, puede suponerse que las líneas celulares empleadas no son las más apropiadas para examinar la adherencia o tal vez que no se están considerando algunos otros factores, como la variación entre cepa y cepa, que son determinantes en los sistemas de ensayo utilizados.

B.4 Invasividad de Vibrio parahaemolyticus

En 1967, Yahagi reportó la localización de una cepa de Vibrio parahaemolyticus KP+ tanto en el tejido epitelial como en la lámina propia de asas ligadas de conejo; el método utilizado para su detección fue la inmunofluorescencia, mediante la cual se encontró que dicha cepa ni aumentaba en número ni se extendía a tejidos más profundos del intestino (29).

Posteriormente, analizando el mecanismo de patogenicidad de V. parahaemolyticus, Ghosh encontró que algunas secciones de las asas ligadas de conejo que manifestaron una reacción positiva con microorganismos viables, mostraban una notable pérdida de células epiteliales y una marcada infiltración de linfocitos y células mononucleares en la lámina propia.

Todos estos datos sugerían una capacidad invasiva por parte de este microorganismo, por tanto, para complementar su estudio,

el autor llevó a cabo la prueba de Sereny, que se utiliza para poner de manifiesto las propiedades invasivas de bacterias tales como Shigella y algunas cepas de E. coli; se basa en la aparición de queratoconjuntivitis, 18 a 72 horas después de haber instilado una suspensión de 1×10^8 células en 0.05 ml, en el saco conjuntival de cobayos adultos. La prueba, en el caso de V. parahaemolyticus, resultó negativa; en consecuencia, este investigador concluyó que aunque este microorganismo no es invasivo, sí es capaz de causar daño celular (71).

En 1975, con los mismos fines, Calia utilizó uno de los modelos experimentales más ampliamente utilizados: el desafío oral en conejo lactante. En éste, se utilizan conejos lactantes blancos Nueva Zelanda de 46 a 173 g, los cuales se tienen en ayuno 24 horas antes del experimento; transcurrido ese tiempo, se anestesian levemente con metofano y en seguida, se les inserta en el estómago un catéter de polietileno a través de la boca por el cual se inyectan 2 ml de un cultivo obtenido en el lapso de una noche; realizado lo anterior, el tubo se retira y los animales se mantienen separados.

Siete horas después del desafío, los animales se sacrifican con cloroformo, se pesan y sus paredes torácica y abdominal se tratan con etanol al 70%; la pared abdominal se abre para obtener bazo e hígado en condiciones de esterilidad y cada órgano se coloca en una caja de Petri, donde se disgrega con tijeras estériles. Aparte, una porción de tejido de cada órgano se cultiva en un caldo apropiado.

Una vez retirados el hígado y el bazo, se separa el intestino desde el píloro hasta el recto y se pesa: el peso del intestino, dividido entre el del resto del cuerpo, se considera como un índice de la cantidad relativa de fluido en el lumen intestinal.

Posteriormente se practica una punción transtorácica para obtener 1 ml de sangre cardíaca, que se siembra en 10 ml de un caldo de cultivo idéntico a aquél del que procede el microorganismo de prueba, con el fin de investigar si hubo diseminación hematogena.

Calia (36) aplicando este modelo, trató sin éxito de poner de manifiesto alguna actividad enterotóxica por parte de Vibrio parahaemolyticus y, en un intento por detectar invasión, analizó cultivos de sangre, hígado y bazo, comprobando que sólo las cepas KP+ de este microorganismo producían bacteremia a los conejos.

Estos hallazgos sugieren que Vibrio parahaemolyticus, al igual que Salmonella y Shigella, es capaz de penetrar el epitelio intestinal del conejo lactante; la posibilidad de que la diseminación hematogena del microorganismo se deba a traumas provocados por la sonda gástrica es improbable debido a que las cepas bacterianas utilizadas como control nunca se recobraron mediante hemocultivos. Por otro lado, tampoco la dosis empleada parece ser un factor de confusión, ya que la utilizada en el estudio cae dentro del rango de la establecida para otros microorganismos. No obstante, no se pudo determinar el sitio exacto de penetración.

En 1978, a diferencia de lo que Galia estableció para una cepa KP+, Joseph (93) encontró que un aislamiento humano KP- inyectado directamente en el ileon externalizado de conejos lactantes anestesiados, provocaba diarrea y bacteremia a las 5 horas de la inoculación. El examen correspondiente efectuado mediante microscopía electrónica, tanto de transmisión como de barrido, reveló una necrosis focal observándose adhesión de vibrios sólo en áreas dañadas. Este hallazgo condujo a formular la hipótesis de que el tejido dañado, la adherencia y la invasividad se encuentran interrelacionados con la toxicidad.

En 1979, Boutin (29) llevó a cabo un estudio sobre la posible interacción entre V. parahaemolyticus y el órgano huésped, empleando un método de inmunofluorescencia; se utilizó el modelo del asa ligada de conejo y, transcurrido el tiempo de prueba, las asas se colocaron en bandejas con amortiguador helado de fosfatos. El tejido helado se cortó en secciones de 1 x 1 cm, las cuales se congelaron al ponerse en un baño de hielo seco-acetona; por medio de un criostato, de estas últimas se obtuvieron nuevas secciones de 4 μ que se fijaron en portaobjetos y tificaron con anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína, dirigidos contra la cepa aplicada. Realizado lo anterior, se procedió a efectuar el examen microscópico.

Por otro lado, se investigó la diseminación de V. parahaemolyticus por vía hematogena al cultivar muestras de bazo, hígado, páncreas, corazón y sangre cardíaca.

Todas las cepas probadas, tanto KP+ como KP-, penetraron la lámina propia y la muscular externa, aunque a diferencia de las primeras, las segundas no provocaron la acumulación de fluidos

en las asas intestinales. Si bien la mayoría de las cepas se aislaron mediante cultivos de los diferentes órganos, hubo uno de ellos del que se obtuvieron todas las cepas: el bazo, ya que éste es un órgano secuestrante de macrófagos. Esto sugiere que la propagación de V. parahaemolyticus puede ser por el sistema circulatorio; sin embargo, la ruta exacta de diseminación, a partir del tracto intestinal, todavía no se ha determinado.

La contaminación del peritoneo por un error quirúrgico es una posibilidad que no puede descartarse totalmente y, en ese caso, las cepas invasivas infectarían todas las vísceras abdominales; no obstante, no se encontró tal patrón de infección. Además, ninguna cepa se aisló de los órganos de aquellos animales que no mostraron alguna evidencia de invasión por medio de microscopía de fluorescencia. Por otra parte, las asas hinchadas y sanguinolentas inoculadas con cepas KP+, exhibían un aspecto comparable al manifestado en severas gastroenteritis humanas.

La enfermedad producida por Vibrio parahaemolyticus se asoció durante mucho tiempo con la producción de hemolisina termoestable directa, aún cuando un buen número de cepas KP- se han aislado de personas clínicamente enfermas. Ahora bien, los hallazgos obtenidos que muestran que todas las cepas probadas pueden penetrar la mucosa ileal y multiplicarse ampliamente en la lámina propia y en la muscular externa, sugieren que, junto con la capacidad de producir hemolisina, debe considerarse la capacidad invasiva de este microorganismo; además, debe tenerse en cuenta que en la patogénesis de la vibriosis puede desarrollarse el establecimiento de una infección generalizada del fleon que, como consecuencia, puede extenderse por vía hematogéna hacia hígado, bazo y páncreas.

Pese a todo, el autor sugiere que la invasión es un evento raro en el huésped humano saludable. Si el vibrio puede sobrevivir lo suficiente como para multiplicarse en el intestino y producir cantidades significativas de hemolisina o algún otro factor desconocido que cause gastroenteritis y, al mismo tiempo, el huésped sano puede resistir la invasión tisular (como lo demuestra el hecho de que existen portadores sanos), entonces la penetración por parte del microorganismo puede no estar relacionada con la enfermedad resultante; por el contrario, cuando la hemolisina cardiopática y citotóxica puede causar la muerte a una persona comprometida, menos resistente, entonces la invasión y la infección pueden llegar a significarse como aspectos importantes en el cuadro total de la enfermedad.

C. PATOLOGIA

El mecanismo exacto por el cual Vibrio parahaemolyticus ejerce su papel patogénico, no se ha aclarado. Sin embargo, se han realizado numerosas observaciones de la sintomatología exhibida por las víctimas de la infección.

Las manifestaciones clínicas incluyen diarrea (98%), dolor abdominal (82%), náusea (71%), vómito (52%), cefálea (42%), fiebre (35%), escalofrío (24%) y tenesmo (17%) (24,93,172).

El fluido diarreico presenta un color café característico y un aspecto de "heces en arroz"; pero, en casos severos, exhibe además descargas de moco y sangre (24,86,147,68,72,89,181).

En base al espectro de manifestaciones clínicas que presentan los afectados por este microorganismo, Ghosh (71) estableció dos grupos de enfermos: el primero, constituido por aquellos individuos que manifiestan una "forma mediana de cólera" pues exhiben sólo una fuerte diarrea acuosa y, el segundo, integrado por aquéllos en los que se advierte un cuadro similar al de la shigelosis.

Ya que la manifestación observada más frecuentemente en la enfermedad es la diarrea acuosa, se ha pensado que Vibrio parahaemolyticus pudiera producir una toxina con acción similar al colerágeno. Esta, es una enterotoxina típica que activa la adenilato ciclasa originando, de esta manera, un aumento en la secreción de fluidos a nivel de intestino delgado (64a, 82, 101a,128,161a). Ahora bien, la adición de monofosfato de dibutil adenosina cíclica a células de ovario de hámster chino

(CHO), provoca cambios en su morfología. En consecuencia, estos cambios se han utilizado para ensayar la actividad de enterotoxinas (82).

Honda (82) aisló un factor que provoca cambios morfológicos en las CHO, a partir de un filtrado de un cultivo de V. parahaemolyticus y lo comparó con el colerágeno, observando efectos similares, si bien los de este último resultaban más intensos. Honda sugirió que este factor podría ser el responsable de la diarrea acuosa en el humano.

Por otro lado, la diarrea con descargas de moco y sangre, sugiere una invasión tisular. En algunos casos se han observado gran cantidad de eritrocitos y células polimorfonucleares en este tipo de heces. En ciertas ocasiones el examen con sigmoidoscopio ha revelado mucosas hiperémicas que muestran de 6 a 8 ulceraciones por cm² y manifiestan puntos sangrantes en la región del rectosigmoides; en tales pacientes se han detectado hematocritos de 30 a 40% y leucocitosis de hasta 34,900 (86,24).

Además, existen algunos estudios interesantes en los que, curiosamente, los pacientes afectados en forma severa por la enfermedad, no excretan coliformes, tal como si hubiesen sido "lavados"; en dichos casos se han obtenido cultivos puros de vibrios; este hecho permanece sin explicación (166).

Vibrio parahaemolyticus se ha encontrado también ocasionando infecciones extraintestinales.

Roland (148) reportó un caso de una pierna gangrenada donde se aisló V. parahaemolyticus; el arteriograma reveló obliteración en la porción media de la tibia y el examen patológico mostró

una inflamación supurativa con necrosis masiva de tejido adiposo y muscular así como inflamación necrosante de grandes venas y arterias del espacio posterior de la tibia. Se procedió a la amputación del miembro.

Tacket (171) detectó un caso de panoftalmitis por V. parahaemolyticus como resultado de la contaminación de una herida con agua de estanque.

Olsen (139) aisló V. parahaemolyticus a partir de una descarga del oído de una persona que había estado expuesta al agua de mar.

Forres (24) obtuvo al microorganismo del líquido sinovial de un paciente con sinovitis que había sufrido una herida en la rodilla. Asimismo, se reportó un caso de septicemia (181).

Con todo ello, el mecanismo patogénico de Vibrio parahaemolyticus continúa sin elucidarse y se siguen requiriendo estudios más completos encaminados a explicar tanto las diferentes manifestaciones clínicas exhibidas por numerosos pacientes, como las extrañas observaciones registradas en tan sólo algunos de ellos.

V. DIAGNOSTICO

1. Aislamiento

El diagnóstico de la gastroenteritis debida a Vibrio parahaemolyticus, requiere el aislamiento del microorganismo a partir de muestras de heces o vómito de pacientes, así como de alimentos sospechosos de contenerlo.

La detección de Vibrio parahaemolyticus puede resultar difícil en el caso de muestras de heces obtenidas durante las últimas etapas de la diarrea ya que el número de vibrios disminuye rápidamente conforme el paciente se recupera del padecimiento.

Las muestras pueden estar constituidas por heces evacuadas recientemente o, en su defecto, obtenerse por medio de hisopos rectales. En ambos casos, deben cultivarse una vez que haya finalizado su recolección. Si el cultivo no ha de realizarse en forma inmediata, las muestras deberán colocarse en un medio de transporte como el de Cary-Blair, el cual, sin NaCl adicional, ha resultado adecuado en la preservación de este tipo de muestras.

Asimismo, el agua peptonada alcalina es otro medio que ha demostrado ser útil en la conservación de tales especímenes, cuando éstos han de cultivarse dentro de las primeras 8 horas de su obtención.

Por otro lado, en el caso de los alimentos que han de someterse a la investigación de este microorganismo, las muestras colectadas de peces deben obtenerse a partir de la superficie del cuerpo, del intestino y de las branquias; si se trata de mariscos, éstos se homogeneizarán en un mezclador que no forme aerosoles.

Vibrio parahaemolyticus crece en un buen número de medios empleados en forma rutinaria, si se encuentran suplementados con NaCl al 2-5%; incluso, puede desarrollar en manitol-sal-agar, utilizado originalmente para el aislamiento de estafilococos. Sin embargo, el agar TCBS facilita el aislamiento de los vibrios.

Las colonias de Vibrio parahaemolyticus en el agar TCBS, después de una incubación de 18-24 horas a 37°C, presentan una forma redonda, aspecto húmedo, con un diámetro de 2-3 mm y centros verdes o azules, originados por la ingestión de azul de bromotimol alcalino. Por su parte, las de Vibrio alginolyticus son de mayor tamaño y exhiben una coloración amarilla debida a la fermentación de la sacarosa.

Algunas bacterias que no se encuentran habitualmente en las heces humanas pueden dar lugar a la formación de colonias amarillas y en ocasiones azules, si bien la mayoría de las veces, este medio inhibe su crecimiento.

Cuando las muestras de heces pueden cultivarse en seguida de haberse colectado, las técnicas de enriquecimiento no son necesarias; sin embargo, son recomendables en el caso de heces provenientes de pacientes convalecientes. A este respecto, cabe mencionar al medio de Monsur, así como al agua peptonada alcalina, como medios adecuados para el enriquecimiento selectivo de Vibrio parahaemolyticus. Del mismo modo, se ha observado que es útil aplicar un segundo enriquecimiento en el caso de pacientes que han recibido un tratamiento antimicrobiano.

Por otro lado, cuando el aislamiento ha de realizarse a partir de alimentos o de fuentes ambientales, es esencial la aplicación de un enriquecimiento selectivo, encaminado a inhibir el crecimiento de otros microorganismos marinos presentes en la muestra.

Para tal fin, uno de los medios más ampliamente utilizados es el caldo Sal-Polimixina, que inhibe no sólo a enterobacterias, pseudomonas y microorganismos Gram-positivos, sino también a vibrios marinos que guardan una estrecha relación con Vibrio parahaemolyticus.

Cuando este medio se emplea en el cultivo de especímenes marinos, generalmente se obtienen cultivos casi puros de Vibrio parahaemolyticus, ya que otros vibrios, incluyendo a Vibrio alginolyticus, no desarrollan en él dentro de las 8 horas de incubación recomendadas, a 37°C.

Una vez realizado el enriquecimiento selectivo, es necesario subcultivar la muestra en un medio apropiado. En este caso, el medio que mejores resultados ha mostrado es el TCES, ya que al emplear otros medios menos selectivos, las colonias resultantes pueden ser difíciles de identificar.

Varios investigadores han establecido que Vibrio parahaemolyticus puede ser detectado fácilmente en alimentos, empleando para ello la combinación del caldo Sal-Polimixina y el agar TCES, ya que de esta manera, no hay necesidad de identificar bioquímicamente las colonias resultantes, si bien, no recomiendan esta táctica para aquéllos cuya experiencia en Vibrio parahaemolyticus no sea amplia.

2. Identificación

De los bacilos fermentativos Gram-negativos presentes en las heces humanas, sólo Vibrio parahaemolyticus produce colonias verdes o azules en el agar TCBS.

Las colonias que exhiban este patrón de crecimiento pueden considerarse como sospechosas de ser Vibrio parahaemolyticus y someterse a pruebas diferenciales.

Este tipo de colonias se subcultivan en el agar de Hierro-Triple Azúcar (TSI) y en el caldo MR-VP, los cuales deben estar suplementados con NaCl al 2%. El TSI se incuba toda la noche a 37°C y el MR-VP a 25-30°C durante 15-18 horas.

Un cultivo de Vibrio parahaemolyticus en el agar de TSI, exhibe un plano inclinado alcalino y una base ácida; no produce gas y no presenta ennegrecimiento.

Por otra parte, produce una reacción negativa en la prueba de Voges-Proskauer. Asimismo, la prueba de oxidasa puede realizarse sobre el crecimiento obtenido en el plano inclinado del agar TSI.

En el caso de aislamientos obtenidos en medios diferentes del TCBS, será indispensable llevar a cabo pruebas adicionales tales como la lisina descarboxilasa y el crecimiento en medios con NaCl al 0% y al 8%.

Cabe señalar que de las pruebas establecidas para la identificación de Vibrio parahaemolyticus, aquellas como son el indol, las descarboxilasas de aminoácidos y las fermentaciones de azúcares, se llevan a cabo en los mismos medios empleados en el caso de enterobacterias pero suplementados con NaCl al 2%.

Las pruebas para halofilismo, tolerancia a la sal y capacidad de crecimiento a 42°C, son indispensables en la diferenciación de Vibrio parahaemolyticus cuando se trata de distinguirlo de otros microorganismos marinos similares a él. Estas pruebas deberán realizarse con cuidado extremo para evitar confusiones.

Prueba para Halofilismo y Tolerancia a la Sal.

Una asada de un cultivo líquido de una noche, se siembra en una serie de tres tubos de caldo nutritivo, conteniendo NaCl al 0%, 8% y 10% respectivamente. Se incuban durante 12-18 horas a 37°C. El carácter halofílico de Vibrio parahaemolyticus se pone de manifiesto al no desarrollar en el tubo sin sal; por otro lado, su halotolerancia no rebasa el 8%.

Prueba para Capacidad de Crecimiento a 42°C.

Una asada de un cultivo líquido de una noche, se inocula en caldo nutritivo con NaCl al 2% y se incuba en un baño con agitación a 42°C durante 24 horas. La aparición de un crecimiento escaso se considera negativo.

El criterio utilizado para la diferenciación de Vibrio parahaemolyticus con Vibrio alginolyticus, se basa en la halotolerancia, la fermentación de la sacarosa y la prueba de Voges-Proskauer, ya que el segundo resiste NaCl al 10%, utiliza el azúcar mencionado y produce acetofina.

Por su parte, Vibrio sp. biovar 6330 puede confundirse frecuentemente con Vibrio parahaemolyticus al emplear procedimientos de rutina ya que muchas cepas de este vibrio sin nombre, no fermentan la sacarosa ni producen acetofina y, además, reaccionan positivamente en las pruebas de descarboxilasas. Sin embargo, no desarrollan en agua peptonada con NaCl al 8%. Su ocurrencia se circunscribe a los ambientes marinos (153).

VI. TRATAMIENTO

Si bien la diarrea asociada a Vibrio parahaemolyticus en muchas ocasiones resulta autolimitante, existe un buen número de casos en los que el padecimiento es tan severo, que es preciso establecer una terapia con antibióticos.

Por tanto, una vez que se ha efectuado el diagnóstico microbiológico, existe la necesidad de determinar el antibiótico que debe utilizarse para eliminar al microorganismo que está provocando la enfermedad. Así, el primer paso a seguir es investigar la susceptibilidad de la bacteria in vitro, ya que ello será de gran ayuda para establecer la terapéutica adecuada.

Varios investigadores han realizado diferentes estudios tendientes a analizar la sensibilidad de Vibrio parahaemolyticus a diversos agentes antimicrobianos. Los dos métodos que más se han utilizado para este fin son: la difusión en gel a partir de discos impregnados y el de diluciones seriadas en tubo.

Bonang (28) determinó las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de cinco antibióticos según el método de dilución seriada en tubo, empleando medio de peptona con NaCl al 3%; las CMI fueron las siguientes: josamicina 50-200 $\mu\text{g/ml}$, eritromicina 12.5-50 $\mu\text{g/ml}$, bactrim 0.78-25 $\mu\text{g/ml}$, tetraciclina 0.195-6.25 $\mu\text{g/ml}$ y doxiciclina 0.098-1.56 $\mu\text{g/ml}$. Es interesante señalar que sus resultados son similares a los obtenidos anteriormente por Sakazaki y Hak quienes utilizaron discos de papel.

Por su parte, Joseph (92), aplicando el método de discos de papel sobre medio Mueller-Hinton (con NaCl al 3%), observó que Vibrio parahaemolyticus era sensible a cloramfenicol, fureadantina, gentamicina, ácido nalidixico y tetraciclina; en cambio era resistente a ampicilina, kanamicina, neomicina, novobiocina, polimixina B y estreptomycin.

Posteriormente, Joseph (94) determinó las CMI de algunos antibióticos aplicando el método de dilución seriada en tubo y utilizando medio BHI con NaCl al 3%, la CMI obtenida para cloramfenicol fue de 3.1 $\mu\text{g/ml}$, al igual que en el caso de tetraciclina; sin embargo, la gentamicina exhibió una CMI muy superior a los niveles séricos permisibles que no correspondía con los valores obtenidos al emplearse discos de papel filtro. Probablemente esto se deba a que la actividad de la gentamicina disminuye conforme aumenta la concentración de Na^+ . En el mismo trabajo, se ensayó la producción de β -lactamasa mediante un método yodométrico, encontrándose una buena correlación entre la actividad de esta enzima y la resistencia a ampicilina.

Por otro lado, Beuchat (17) llevó a cabo un estudio comparativo entre las actividades anti-Vibrio de ésteres de ácidos grasos y dos sales preservadoras de alimentos: sorbato de potasio y benzoato de sodio, utilizando una cepa de Vibrio parahaemolyticus como microorganismo de ensayo. Observó que a un pH de 6.7, la monolaurina, la monocaprina y el moncaprila to de sacarosa, exhibían una actividad similar a la mostrada por el sorbato de potasio y superaban el grado de acción del benzoato de sodio a concentraciones semejantes.

No obstante, cabe mencionar que existe controversia sobre el uso de antimicrobianos en los padecimientos diarreicos, pues con frecuencia conducen a iatrogenia y alteración de los ecg sistemas bacterianos. No existen, por otra parte, suficientes estudios clínicos con pacientes testigos que apoyen la eficacia de estos fármacos.

Por otro lado, el padecimiento diarreico es una enfermedad "sistémica" en la cual la diarrea es un síntoma fundamental. El trastorno básico del padecimiento diarreico es la deshidratación, que corresponde a un balance hídrico negativo condicionado tanto por las pérdidas por aparato digestivo como por la falta de aporte hídrico para llenar los requerimientos mínimos del sujeto correspondientes a pérdidas insensibles y a excreción urinaria. Aunque la naturaleza exacta de las alteraciones bioquímicas en cada paciente en particular dependen de la intensidad y característica de las pérdidas por las evacuaciones, del aporte líquido por vía oral y parenteral, del funcionamiento renal y de las condiciones nutricionales, en todos los casos hay pérdida de agua y de determinados iones como sodio, cloro, potasio, magnesio, fosfato y calcio.

El déficit hídrico es tanto intracelular como extracelular, pero en la deshidratación leve o moderada la disminución es sobre todo a partir del compartimiento extracelular, mientras que en la deshidratación grave abarca tanto el intra como el extracelular.

Estas alteraciones originan modificaciones en los volúmenes circulatorios (hipovolemia); modificaciones en la osmolaridad de los líquidos intracelulares (generalmente hiperosmolaridad); alteraciones de los iones específicos en los compartimientos

intra y extracelular (desplazamiento de K^+ por Na^+ , incapacidad de la célula para retener Ca^{++}); modificaciones en el equilibrio ácido básico (acidosis metabólica) fundamentalmente por pérdida de Na^+ y K^+ en las evacuaciones, por acúmulo de productos ácidos del metabolismo debidos a deshidratación e insuficiencia renal; por cetosis debida al ayuno, por incapacidad para metabolizar ciertos ácidos (láctico) y por transferencia de las bases hacia el interior de la célula.

El desequilibrio hidroiónico repercute en el funcionamiento de diversos órganos como glándulas suprarrenales, hígado, cerebro y, de muy especial manera, sobre riñón cuya función tiende a mantener un volumen sanguíneo normal y una presión osmótica apropiada, conservando agua y sodio a través de una reabsorción tubular aumentada, e intenta asimismo corregir la acidosis por la secreción de orina ácida. La deshidratación y el acúmulo de diversos productos metabólicos tiende a reducir la habilidad renal para cumplir estas funciones, abatiendo la filtración glomerular y la reabsorción tubular de agua.

Cualquier programa terapéutico deberá tender a la reparación del desequilibrio hídrico, mejorando automáticamente la hipovolemia y la osmolaridad alteradas; a la reparación de los déficits iónicos: hiponatremia, hipocloremia, hipopotasemia e hipocalcemia; y lograr la mejoría del funcionamiento renal.

Es evidente que la forma de tratamiento podrá variar según el grado de la afección; así en los casos de deshidratación ligera en los cuales la pérdida de peso ha sido inferior al 5%, en que no hay signos importantes de deshidratación y en que la excreción urinaria es buena, el tratamiento podrá hacerse en el hogar a través de la administración de líquidos por vía oral.

Si la deshidratación es moderada con pérdida de peso del 5 al 10%, con oliguria y dificultad para retener líquidos por las vías normales, el lugar de tratamiento deberá ser de preferencia el hospital, recurriendo a la ingestión oral si se controla el vómito, o en caso contrario o de peligro mayor, a la endovenosa. Finalmente en la deshidratación grave, con pérdida de peso de más de 10%, con oliguria marcada o aún anuria, con pérdidas anormales continuas y con intolerancia gástrica completa, la hospitalización es obligatoria y la forma de tratamiento debe ser el empleo de soluciones endovenosas.

Los resultados que se buscan en la terapéutica del desequilibrio hídrico y electrolítico son de dos órdenes: el inmediato, que se impone con urgencia y es el de corregir, mejorar o evitar, el estado de choque y facilitar la función renal a través del restablecimiento de un volumen circulatorio adecuado y el de recuperación gradual bioquímica, que se consigue en el transcurso de días o semanas.

Desde el punto de vista práctico en la terapéutica se distinguen dos etapas: el tratamiento reparador en el que se corrigen los déficits preexistentes y en el que se lleva el organismo a un estado de equilibrio y, el tratamiento subsecuente, con el que se trata de evitar que el paciente caiga nuevamente en desequilibrio hidroelectrolítico, manteniendo para ello los requerimientos normales y reemplazando las pérdidas anormales.

La reparación compensa los déficits de agua y de ciertos electrolitos y es el primer paso de la terapéutica. Se lleva a cabo

por la administración, en un lapso de 30 a 60 minutos, de solución glucosada al 5% y solución fisiológica de cloruro de sodio, a partes iguales, en cantidad equivalente al 5% del peso corporal, siendo seguida de la aplicación de 10 ml por kilogramo y por hora de la misma solución hasta lograr que el paciente orine más de una vez y que la orina tenga una gravedad específica de 1,010 o menos.

Tan pronto como la excreción urinaria es satisfactoria, se procede al tratamiento de mantenimiento y de reemplazamiento. El mantenimiento llena los requerimientos normales de agua de ciertos electrolitos y proporciona suficientes carbohidratos para evitar la cetosis y reducir al mínimo la ruptura de las proteínas del propio organismo. El reemplazamiento es la corrección de las pérdidas anormales que han tenido lugar por vías normales.

Ahora bien, en muchos casos, aunado a la terapia dietética, es necesario el establecimiento de un tratamiento con agentes antimicrobianos en donde el antibiótico de elección es la tetraciclina, aún cuando su acción no ha sido cabalmente evaluada (183a).

VII. EPIDEMIOLOGIA

1. ASPECTOS ECOLOGICOS

1.1 Distribución Geográfica

Tanto la distribución como la frecuencia de Vibrio parahaemolyticus pueden considerarse elevadas; reconocido inicialmente en Japón (43,69,166,153), se le ha encontrado posteriormente en otros países asiáticos tales como Corea (57), Tailandia (3), Indonesia (28,92), Vietnam (177), Malasia (89), China (93,24), India (51,24,159,158) e Irán (93). Asimismo se le ha detectado en Australia (170), la Unión Soviética (114) y en varios países del continente europeo entre los que cuentan Holanda (75,95), Gran Bretaña (10), Dinamarca (107,139), Alemania (113), Yugoslavia (129), Italia (150), Escocia (93) y España (1); de la misma manera, se le ha puesto de manifiesto en el Mar Negro, el Mar Báltico, el Mar del Norte y el Mar Mediterráneo (113).

Los reportes de Africa incluyen aislamientos en Togo (25), Madagascar (93) y Kenia (23) y, en cuanto al hemisferio occidental, esta bacteria se ha aislado en Canadá (178), los Estados Unidos (24,5,12,6,43,47,48,44,67,74,91,93,98,96,100,115,124,141,169,166,160), México (131,125,5), Argentina (42), Brasil (68) y Panamá (105,5).

Este microorganismo se ha aislado frecuentemente a lo largo de todo el ambiente estuarino a partir de sedimento, agua, partículas suspendidas, plancton, peces y mariscos. Los principales factores que influyen sobre su existencia son la salinidad, la

variación estacional y su asociación con organismos superiores. Vibrio parahaemolyticus es un habitante común de los estuarios y es poco frecuente encontrarlo en agua dulce o en mar abierto. Su incidencia es dependiente de la temperatura y, por ende, del ciclo estacional, encontrándose su ocurrencia más alta en los meses más cálidos del verano (43,98,96).

1.2 Variación Estacional

En la mayoría de las áreas geográficas donde este microorganismo habita, su incidencia sigue un determinado ciclo estacional, registrándose las cuentas más altas en el verano y en el otoño y, las más bajas, durante el invierno.

Miyamoto (93) detectó por vez primera este fenómeno en Japón y, posteriormente, otros investigadores como Nishio y Shin (93) lo confirmaron. Consecuentemente, se ha registrado tal influencia estacional en otros países como Australia (170), varios del continente europeo (113) y los Estados Unidos (12,98,6,67). Sin embargo, es interesante señalar el hecho de que Thompson y Vanderzant (180) no pudieron detectar dicho fenómeno en el Golfo de México, pero observaron que las temperaturas en este lugar fueron más altas durante todo el año (la más baja fue de sólo 11.6°C) que las de otros ambientes estudiados.

Aunque en la bahía de Chesapeake y áreas aledañas el microorganismo está ausente de la columna de agua durante los meses de invierno, se le puede aislar del sedimento durante todo este tiempo (98). En otros ambientes permanece en dicha columna pero en números muy reducidos (4).

En países tropicales, el ciclo estacional de Vibrio parahaemolyticus tiene correlación con las temporadas de lluvias y secas; en Vietnam (133), los números más altos se obtienen en los meses de lluvias (Marzo y Abril) y los más bajos en la temporada de secas (Diciembre a Febrero). Curiosamente, un fenómeno contrario se observó en Togo (25) y en Indonesia (92), donde las cuentas más altas se obtuvieron al final de la temporada de secas (Abril) y las más bajas en la temporada de lluvias (Junio). Los valores de salinidad, no registrados en los estudios de Vietnam e Indonesia, fueron tomados en cuenta en las investigaciones de Togo, en las que se observó que la concentración de sal era más alta en la época de secas (más del 12 por millar), período en el que las cuentas del microorganismo no fueron también más elevadas. Durante la época de lluvias se registró una salinidad de 1.6 a 4.2 por millar, la cual es menor que la óptima para V. parahaemolyticus; por ello, se lograron pocos aislamientos en esas fechas (25).

Si bien la salinidad parece ser la causa de los datos obtenidos en Togo y en Indonesia, no sucede así en el caso de Vietnam, donde no existe aún explicación para dicho fenómeno.

Además de la temperatura y la salinidad, la variación estacional de este microorganismo está influenciada por interacciones con el plancton y organismos superiores.

Kaneko y Colwell (98,96), al estudiar el ciclo estacional de esta bacteria en la bahía de Chesapeake, observaron que durante los meses de verano su incidencia era mayor en las muestras de plancton que en las de agua o sedimento marinos.

Vibrio parahaemolyticus y otros vibrios estrechamente relacionados son quitinoclasticos y es un hecho ampliamente comprobado que existe una sólida asociación de este tipo de bacterias con el zooplancton.

En el río Rhode, la flora bacteriana aerobia heterótrofa asociada con plancton resultó específica, predominando Vibrio spp. en la cuenta viable total; a la mitad del verano, Vibrio spp. comprendió el 100% correspondiendo el 9.5% a V. parahaemolyticus.

La asociación de Vibrio spp. al plancton, sugiere que estos microorganismos juegan un papel importante en el ciclo de elementos del ambiente marino, probablemente en la mineralización del copépodo.

Varios investigadores han demostrado que la flora bacteriana del plancton no es la misma que la del ambiente donde generalmente se toman las muestras.

Shimidu (98) reportó que más del 70% de las bacterias heterótrofas aisladas del plancton eran Vibrio y Aeromonas; pero, por otro lado, encontró una flora específica localizada en el interior del plancton.

Las superficies del plancton están revestidas con un exudado viscoso al que se adhieren las bacterias y del cual toman compuestos que utilizan como fuentes disponibles de alimento y energía. Además, cuando los microorganismos asociados con el plancton son quitinoclasticos, serán capaces de descomponerlo y reciclar su materia orgánica. De hecho, las células libres de V. parahaemolyticus que se encuentran en la columna de agua, provienen del plancton, del que se liberan durante el proceso de mineraliza-

ción; tal es el caso de las que se detectan en la columna durante los primeros días de junio (96,48).

Vibrio parahaemolyticus sobrevive en el invierno asociado a mariscos y peces propios del fondo, lo cual no es del todo sorprendente si se considera que los animales bénticos están siempre en contacto con la flora microbiana de esta región. Además, los mariscos se alimentan por filtración y, por ello, concentran microorganismos. Se ha visto que el número de bacterias encontrado en los mariscos, se correlaciona con la temperatura ambiente; así, se ha comprobado que en invierno, las cuentas de V. parahaemolyticus son bajas, pues sobrevive a bajas temperaturas en el sedimento marino, el cual, de alguna manera aún indeterminada, lo protege.

Asakawa (98) observó que V. parahaemolyticus sobrevive en tubos de agua peptonada con NaCl al 3% colocados en sedimento aunque se presentes cambios ambientales extremos. Sin embargo, su sensibilidad depende de la edad del cultivo y de otros factores, tales como la concentración de materia orgánica e inorgánica en el medio. Conforme la temperatura se incrementa, los vibrios proliferan y Vibrio parahaemolyticus puede aislarse fácilmente de la columna de agua.

Otra interacción interesante en la que participa Vibrio parahaemolyticus es la que mantiene con Bdellovibrio, para el cual Miyamoto y Kuroda (197) sugieren un papel importante en el ciclo estacional del primero. Estos investigadores encontraron que Bdellovibrio puede lisar a V. parahaemolyticus en una proporción 2 a 3 veces mayor que a otros vibrios marinos, cuando las temperaturas son de 5°C pero no a temperaturas más altas (35°C).

Así, durante los meses de otoño e invierno, cuando las temperaturas son bajas y Bdellovibrio lisa activamente al huésped, V. parahaemolyticus no prolifera fácilmente.

Este fenómeno se ha detectado tanto en la bahía de Osaka (197) como en la de Chesapeake (201).

Por tanto, el ciclo estacional de Vibrio parahaemolyticus puede estar influenciado por una gran variedad de factores, entre los que destacan la temperatura, la salinidad, el plancton, etc.

1.3 Correlación con Parámetros Ambientales

La relación existente entre la incidencia de V. parahaemolyticus y el medio ambiente, cuando éste presenta determinados índices de polución, no está del todo clara. Algunos investigadores han reportado mayores concentraciones de este microorganismo en aguas contaminadas que en las que no lo están (6,199). En cambio, Thompson y Vanderzant (180), Kaneko y Colwell (98), Sutton (170) y Jonas (91) no encontraron una relación significativa entre las cuentas de Vibrio parahaemolyticus y los índices de contaminación representados por cuentas de coliformes totales o de E. coli.

Así, por ejemplo, Oshiro (98) detectó entre 10 y 20 células de V. parahaemolyticus por ml de agua en un área densamente contaminada del mar interior de Seto, Japón. Por su parte, Horie (98) reportó la existencia de 20 a 100 UFC por ml de agua en la bahía de Tokio y cuentas mayores en la boca del río que allí converge; asimismo, Baross y Liston (6) encontraron de 10 a 5,000 células por ml en la sonda de Puget. Sin embargo, Kaneko y Colwell (98) reportaron cuentas relativamente bajas que promediaban menos de 10 por ml y sin correlación alguna con las cuentas de E. coli.

Estas variaciones pueden explicarse al tomarse en cuenta otros factores asociados con la contaminación tales como la concentración de nutrientes y partículas suspendidas y no sólo las cuentas de coliformes. Los índices de coliformes generalmente correlacionan bien con la presencia de patógenos bacterianos alóctonos tales como Salmonella spp., pero no con la de bacterias autóctonas potencialmente patógenas como Vibrio parahaemolyticus (49).

Watkins y Cabelli (199) observaron que la adsorción de Vibrio parahaemolyticus a partículas suspendidas es mayor en aguas de baja salinidad y, por otro lado, sugieren que las cuentas de este microorganismo podrían estar relacionadas con la contaminación, debido a que ésta, a su vez, lo está con el número de partículas. Además, comprobaron que en la bahía de Chesapeake, aún cuando la incidencia de este microorganismo mostró una correlación positiva con la cuenta de coliformes en el área que rodea al puerto de Baltimore, la cantidad detectada no fue tan elevada como la exhibida por Salmonella spp.

En un estudio subsecuente que cubrió el área entera de la bahía de Chesapeake, los datos revelaron que la salinidad y la concentración de oxígeno disuelto se encontraban más estrechamente relacionados con la incidencia de Vibrio parahaemolyticus. La frecuencia, es decir, los números totales de este microorganismo, se incrementaban al aumentar la salinidad y disminuir la concentración de oxígeno disuelto, lo cual refleja un probable aumento en la concentración de nutrientes en las áreas eutróficas de la bahía (100).

Vibrio parahaemolyticus se ha aislado de agua dulce en distintas áreas. Joseph (92), en un estudio realizado en Indonesia, encontró que en muchos casos el agua potable obtenida de pozos contenía a esta bacteria. En la bahía de Chesapeake, Kaper (100) aisló al microorganismo en la región más alta de la bahía, así como en los niveles superiores de los ríos James y Potomac. Al examinar la misma área, Saylor (160) obtuvo varios aislamientos, uno de los cuales fue de sedimento suspendido, donde la temperatura del agua era de 4.3°C y la salinidad se hallaba por debajo de los límites detectables por el salinómetro.

El transporte de V. parahaemolyticus por la marea, juega sin duda un papel importante en la ocurrencia de este microorganismo río arriba de los estuarios.

Ayres y Barrow (4) observaron mayores concentraciones de este microorganismo en sedimento lodoso que en sedimento de grava o arena; este hecho refleja la influencia que tiene la materia orgánica en la ocurrencia y sobrevivencia de esta especie bacteriana.

En Calcuta, India, V. parahaemolyticus se ha aislado de peces y muestras de agua dulce tomadas del río Hoogly, aproximadamente 50 millas río arriba de la bahía de Bengala. Este microorganismo se encuentra ampliamente distribuido en dicha área, al grado que se le encuentra en un 40% de las muestras de agua de estanque que "prácticamente no tienen sal" por provenir de agua de lluvia, principalmente. En esta metrópoli el consumo de alimentos marinos es bajo ya que la población local prefiere especies de agua dulce.

Ya que Vibrio parahaemolyticus se encuentra entre los vibrios más dependientes de la sal, podría esperarse que sobreviviera sólo por un corto período en ambientes de agua dulce. No obstante, la adsorción al plancton quizá pueda prolongar su supervivencia confiriéndole algún tipo de protección. En este contexto, cabe mencionar que en el caso de V. cholerae, la asociación con quitina le otorga resistencia al pH ácido.

Muestras subsecuentes en otras áreas han mostrado una baja tasa de aislamientos de este microorganismo tanto de agua como de sedimento. Estos datos no apoyan la idea de un ciclo de esta bacteria en los nichos heterótrofos de agua dulce, tal como sucede en las aguas estuarinas y costeras. Aparentemente, V. parahaemolyticus no forma parte de la microflora autóctona de los ecosistemas de agua dulce, sin embargo, la sobrevivencia de las células introducidas en sistemas de agua dulce por humanos infectados, parece prolongarse por su asociación con el plancton existente. Esta podría ser la razón de la diseminación de esta infección en Calcuta (159).

En resumen, la asociación de Vibrio parahaemolyticus al plancton de agua dulce, aún en números bajos, confiere otra dimensión a la distribución de este microorganismo.

1.4 Ocurrencia en Mar Abierto

Como rara vez se ha aislado a Vibrio parahaemolyticus de regiones pelágicas, parecería que está limitado a las aguas costeras y estuarinas; sin embargo, Aoki reportó su aislamiento del mar abierto de Japón, aún cuando ni Horie ni Miyamoto pudieron reproducir el fenómeno en las mismas áreas (93).

Esta incapacidad para aislar a V. parahaemolyticus en zonas pelágicas se ha reportado también en Canadá y el Continente Africano (25). Baross y Liston (6) notaron que la incidencia de este microorganismo en el agua de mar decrecía conforme aumentaba la profundidad en la costa de Washington; no obstante, encontraron números muy bajos de esta bacteria en sedimentos más profundos. Kaneko y Colwell (97) colectaron muestras a lo largo de cuatro recorridos fuera de la saliente continental del suroeste de los Estados Unidos y no aislaron a esta bacteria de ninguna de las muestras de agua, sedimento o plancton; sin embargo, obtuvieron un buen número de vibrios muy similares a ella.

La ausencia de V. parahaemolyticus en el océano es probablemente el resultado de la baja temperatura del agua, la alta salinidad y la baja concentración de nutrientes, ya que este microorganismo, a diferencia de otras bacterias marinas, es sensible al frío y generalmente no sobrevive en aguas con baja cantidad de nutrientes.

Otro factor importante que debe considerarse al examinar la incidencia de V. parahaemolyticus en el océano, es la presión hidrostática. Su efecto ha sido estudiado por Schwarz y Colwell (161) quienes reportaron que esta bacteria es incapaz de crecer a cualquier presión que simule el ambiente del océano profundo, es decir, entre 200 y 1000 ata. De esta manera, la incapacidad de Vibrio parahaemolyticus para tolerar una presión hidrostática elevada, mantiene la conclusión de que las aguas estuarinas constituyen su hábitat natural.

1.5 Asociación con Organismos Superiores

Es bien conocido el hecho de que V. parahaemolyticus se encuentra asociado con una gran variedad de organismos superiores, incluyendo plancton, peces y mariscos, tanto en el ambiente marino como en el estuarino.

Fishbein (67) ha reportado su aislamiento de 30 diferentes especies marinas, incluyendo almejas, ostiones, langostas, vaneras, sardinas, camarones, calamares, cangrejos, anguilas y otras. De 1969 a 1972, encontró que el 86% de las muestras de alimentos marinos examinados por la Food and Drug Administration, resultaron positivas para V. parahaemolyticus, si bien la mayoría de las muestras se colectaron durante brotes colectivos de enfermedades entéricas. Otros estudios igualmente extensos, reportan la presencia de este microorganismo en almejas, mejillones y ostiones (95,12,179,33,6,170,25,178,180,131).

Las cuentas de V. parahaemolyticus en ostiones pueden ascender hasta 1,300 por gramo de tejido, aunque los valores más frecuentes son de 10 por gramo (64).

Varios investigadores como Colwell (50), Krantz (106), Fishbein (65) y Barrow y Miller (11), han reportado el aislamiento de este microorganismo al analizar cangrejos, encontrando concentraciones tan altas como de 10^3 por gramo de carne (106). Otros, como Vanderzant (194) y Joseph (93), lo han recuperado del camarón.

Vibrio parahaemolyticus no se ha aislado tan frecuentemente de peces como lo ha sido de invertebrados que se alimentan por filtración (6). Sin embargo, se ha demostrado su existencia en una

gran variedad de peces tanto marinos como de agua dulce, entre los que se cuentan el atún, robalo, pez azul, pez gato, anguila, lenguado, macarela, mujol, perca, pámpano, pargo, sardina, esperlano, merlusa, caballa, bagre, etc. (95,31,130,67).

Además de la asociación comensal o simbiótica de esta bacteria con organismos superiores, también es posible la antagónica. Krantz (106) aisló a este microorganismo de cangrejos letárgicos y moribundos; Brinkley (31) observó la relación de esta bacteria con una enfermedad de las langostas y, Tubiash (184) la ha reportado presente en moluscos bivalvos.

Vanderzant y Nickelson (195) publicaron la muerte de camarones en maricultura, debida a infección por Vibrio parahaemolyticus. En este sentido, las propiedades patogénicas de V. parahaemolyticus podrían ser tan importantes en la maricultura del camarón u otros invertebrados, como se ha demostrado que V. anguillarum lo es en viveros de peces.

1.6 Relación con Bacteriófagos

El primer aislamiento de bacteriófagos específicos para Vibrio parahaemolyticus fue reportado en 1966 por Nakanishi quien, en esa ocasión, describió 3 diferentes fagos obtenidos de agua de mar, heces y una cepa lisogénica, respectivamente (103).

En 1973, Sklarow (165) aisló un bacteriófago específico para V. parahaemolyticus del sedimento de la costa del Atlántico, el cual presentaba forma de icosaedro. Posteriormente, Baross, Liston y Morita llevaron a cabo una serie de estudios sobre fagos de Vibrio parahaemolyticus (7,8,9).

Se piensa que la función primaria de los bacteriófagos en la naturaleza es lisar con el objeto de disminuir las poblaciones de determinadas bacterias. Generalmente, los fagos son específicos de especie o cepa y se cree que tienen su origen en cepas lisogénicas de la misma especie. Las cepas lisogénicas son bastante comunes en la naturaleza y en los experimentos donde se han mezclado fagos con las cepas susceptibles, eventualmente han emergido cepas resistentes a tales fagos. En consecuencia, puede suponerse que los bacteriófagos de Vibrio están asociados de algún modo a la mayoría de las especies de este género que se encuentran en el ambiente marino.

La incidencia estacional de los bacteriófagos de V. parahaemolyticus en mariscos, ha mostrado estar relacionada en forma inversamente proporcional con la frecuencia de vibrios mesófilos. Se han detectado niveles elevados de fagos de V. parahaemolyticus en muestras de mariscos que no albergaban niveles detectables de vibrios mesófilos y, además, se han aislado frecuentemente de crustáceos tales como el cangrejo Rey y el cangrejo de Nieve, que habitan en aguas permanentemente frías (menos de 5°C); este hallazgo sugiere fuertemente que el origen de estos fagos capaces de lisar a V. parahaemolyticus, no está en cepas lisogénicas naturales de esta especie. Esto es contrario a la creencia generalizada de que el principal requisito para el aislamiento de un bacteriófago, es la presencia del huésped específico. Obviamente, el origen de estos bacteriófagos seguirá siendo oscuro, en tanto el conocimiento sobre el tipo, número y actividad de los vibrios marinos y su asociación con animales de estos ambientes, no se establezca con claridad.

A la fecha, sólo existe información confiable, tanto de tipo taxonómico como fisiológico, sobre las especies patógenas para el hombre y los peces, tales como V. parahaemolyticus, V. alginolyticus y V. anguillarum. De éstas, sólo las dos primeras se encuentran relacionadas en forma significativa, a un grado tal que pudieran compartir algunos fagos. Sin embargo, no se ha detectado ningún fago de V. alginolyticus a partir de muestras marinas, ni se ha encontrado alguna cepa que albergara profagos capaces de lisar a V. parahaemolyticus.

Por otro lado, el hecho de que algunos fagos de V. parahaemolyticus puedan lisar a un amplio grupo de vibrios degradadores de agar y viceversa, puede considerarse como evidencia de que algunos de dichos fagos pudieran haberse originado de un vibrio remotamente relacionado con V. parahaemolyticus, por ejemplo, alguna especie psicrófila. Así, puede mencionarse el caso de los fagos P4A, P4B y 4-TC cuyo huésped original es el vibrio psicrófilo TC₁₁E₂A que es degradador de agar; lo interesante del caso es que estos fagos también lisar cepas de V. parahaemolyticus, pero solamente a temperaturas inferiores a los 30°C.

De esta manera, el hecho de que los ostiones contengan a una gran población de bacteriófagos que lisar tanto a Vibrio parahaemolyticus como a una gran variedad de vibrios degradadores de agar, sugiere una relación ecológica entre estos dos grupos de vibrios.

Las especies de vibrios comprendidas dentro de las poblaciones psicrófila y mesófila encontradas en ostiones, no se encuentran determinadas con exactitud. Por ejemplo, existe un considerable número de vibrios psicrófilos y degradadores de agar

que no se han identificado, debido a la gran variación fenotípica que exhiben; en esta situación, los bacteriófagos pueden representar el factor definitivo. Así, se ha llegado a sugerir que la especificación dentro de este grupo de vibrios marinos es prácticamente imposible, pudiendo existir un espectro amplio e ininterrumpido de organismos relacionados genéticamente (7,8,9).

Por su parte Koga (103), en 1982, llevó a cabo un estudio sobre las variedades morfológicas y los rangos de huéspedes de fagos de V. parahaemolyticus. Del agua de mar obtuvo 18 bacteriófagos líticos para V. parahaemolyticus, a los que clasificó en 4 grupos de acuerdo a su morfología. El grupo I estaba constituido por fagos con cabeza hexagonal y una cola con vaina contráctil. Los fagos de los demás grupos poseían una cola no contráctil, relativamente larga, presentando diferencias en sus cabezas. El grupo II presentaba una cabeza hexagonal; el III exhibía una cabeza polihédrica y, en el grupo IV se observaba una cabeza hexagonal con proyecciones en forma de perilla.

No se advirtió correlación alguna entre los serotipos O y K y el espectro lítico de los fagos y se encontró que el grupo I era más sensible al calor que los otros grupos, pues se inactivaba totalmente al exponerlo durante 30 minutos a 55°C; los demás lo hacían hasta los 60°C.

2. FENOMENOS EPIDEMIOLOGICOS

La frecuencia y distribución de los brotes epidémicos de la enfermedad causada por Vibrio parahaemolyticus correlacionan perfectamente con su ecología. Su incidencia se acentúa en los meses más cálidos del año, disminuyendo en los de invierno; este hecho exhibe un paralelismo total con la variación estacional del microorganismo (5). Sin embargo, aunque ésta establezca un ritmo determinado en Japón y los países occidentales, en otros como la India, dicho esquema no se presenta: ocurren durante todo el año tanto brotes epidémicos como casos esporádicos (51).

Por otro lado, generalmente se ha asociado la infección por Vibrio parahaemolyticus al consumo de alimentos crudos de origen marino tal como sucede en Japón; no obstante, en países como la India, rara vez se acostumbra esto y además se prefieren las especies de agua dulce. En Calcuta se ha reportado que el 33.3% de los pacientes que sufren de infección por esta bacteria, no presentan en su historia clínica el consumo de peces en los 7 días previos a la manifestación de la enfermedad. En este sentido se había sugerido que la presencia de V. parahaemolyticus en esta región se debía a la marea, empero, Sarkar (159) descartó esta posibilidad debido a que estas áreas, en las cuales las muestras de plancton contienen a este microorganismo, no tienen confluencia con aguas marinas y son entidades independientes con fuentes de agua subterráneas. Puede pensarse que la introducción del patógeno en tales cuerpos cerrados de agua, se deba a casos ambulantes o a portadores, ya que estas aguas se usan constantemente para propósitos domésticos y ablucionarios; además, no se descarta la posibilidad de un reservorio extrahumano (51,159).

Asimismo, se ha observado que en la India, la enfermedad afecta tanto a grupos estrictamente vegetarianos como a los no vegetarianos; ésto cuestionaría la teoría de que la ingestión de alimentos marinos crudos es la causa principal de gastroenteritis por V. parahaemolyticus. Por otra parte, el padecimiento afecta principalmente a la población socioeconómicamente más pobre, que no guarda buenos hábitos de higiene (51).

Con todo ello, Barker (5) propuso que son 3 los motivos mediante los cuales los alimentos contaminados pueden llegar a adquirir números suficientemente altos del microorganismo como para causar enfermedad en el humano:

- 1) Que se dejen sin refrigerar durante un largo período antes de su cocción o ingestión.
- 2) Que no se cuezan lo suficiente.
- 3) Que se recontaminen después de haberse cocido.

Con respecto a la falta de refrigeración, Bradshaw (30) realizó un estudio sobre las temperaturas de los refrigeradores y la supervivencia de V. parahaemolyticus; encontró que en los refrigeradores domésticos y comerciales la temperatura fluctúa entre 4.4 y 12.8°C en un período de 12 horas permitiendo, en muchos casos, no sólo la supervivencia del microorganismo sino incluso su multiplicación.

Por otra parte, Vanderzant y Nickelson (194) observaron que cuando V. parahaemolyticus se encuentra presente en los alimentos, puede soportar temperaturas de hasta 80°C; de ahí la importancia de cocinar los alimentos durante el tiempo suficiente.

Otro factor que Barker (5) analizó fue el tiempo de generación de V. parahaemolyticus (9 a 11 minutos); un inóculo inicial de 10^1 microorganismos puede llegar a ser de 10^6 en un período de 3 a 4 horas. A este respecto, Smith (166) reporta el caso del "sushi" japonés (ensalada típica de arroz y pescado), la cual si se ingiere en el restaurant rara vez provoca la enfermedad, pero si se ordena por teléfono para que sea entregado a domicilio la demora puede resultar suficiente como para alcanzar la dosis mínima infectiva.

En base a lo anterior, se procedió a realizar una investigación con los cocineros que preparaban el "sushi" en la que se observó que de Abril a Octubre más del 15% se "infectaban en forma asintomática", empero, dicha "infección", desaparecía durante los meses de invierno. En este caso, Smith (166) acuñó el término "excretor contaminado", ya que aunque estos portadores no manifiestan síntomas, excretan constantemente al microorganismo.

El conocimiento de la existencia del estado asintomático de los cocineros y otros portadores que pueden hacer las veces de foco infeccioso para la transmisión de los microorganismos, ha originado el establecimiento de encuestas epidemiológicas en varios países (166) incluyendo el nuestro.

En la ciudad de Puebla, México, el grupo de estudio encabezado por Molina García (125) determinó la frecuencia de anticuerpos anti-Vibrio parahaemolyticus en diversas poblaciones de sujetos asintomáticos que fueron seleccionados de acuerdo a su ocupación: de 100 personas encargadas de expender alimentos al público, 17 mostraban anticuerpos séricos contra el microorganismo. Además, entre los diez individuos que tenían mayor contacto con produc-

tos derivados del mar, cinco manifestaron presencia de anticuerpos; asimismo, en la población general se encontró una frecuencia del 16.5%. Estos datos sugieren que en este país las infecciones por V. parahaemolyticus son más frecuentes de lo que comúnmente se piensa.

Por su parte, Nava Fernández (131) realizó un estudio en la Ciudad de México; analizó 200 muestras de ostiones obtenidas en el principal mercado de pescados y mariscos de la ciudad y de 10 de ellas (5%) aisló a V. parahaemolyticus. Cabe mencionar que en esta ciudad no se han reportado casos de gastroenteritis debidas a este microorganismo, sin embargo, existen muchas posibilidades de que esto se deba a que no se considera, como debiera ser, que V. parahaemolyticus es un importante agente causal de esta enfermedad y, por ello, no se le busque en las muestras de materia fecal. Si además se toma en cuenta el hecho de que esta especie no desarrolla en medios tales como el Endo y el EMB y lo hace pobremente en el McConkey (62,166), los cuales se emplean para realizar los coprocultivos, puede explicarse el motivo por el cual no se detecta la verdadera incidencia de este microorganismo, ni aún cuando cause brotes epidémicos; además la antibióticoterapia prescrita en su caso es la misma que se emplea en salmonelosis, shigelosis y gastroenteritis por E. coli enteropatógena.

Antes de los acontecimientos de 1950 en Osaka, Japón, no se consideraba que una bacteria estuarina o marina pudiera ser un importante agente causal de gastroenteritis; sin embargo, en cuanto se investigó su presencia, V. parahaemolyticus ha llegado a colocarse gradualmente como el principal agente causal de este padecimiento en varios países (3,138,108).

Kudoh (108) realizó un extenso trabajo en Japón sobre la frecuencia de los distintos serotipos y su relación con brotes epidémicos sin encontrar asociación alguna. Este hecho se ha corroborado en otros países (24).

Asimismo, Asakawa (2), al investigar la presencia de Vibrio parahaemolyticus en alimentos marinos que se expenden en mercados, restaurantes y hoteles, encontró que el microorganismo sobrevive y prolifera en tales ambientes, si bien no pudo detectar una sola cepa KP+.

Con respecto a los alimentos contaminados, Sakazaki (152) establece que para controlar la infección en humanos, basta aplicar algunas medidas higiénicas que evitan la multiplicación del vibrio en los alimentos y previenen contaminaciones secundarias. Igualmente determinó el límite para aceptación del pescado: 1×10^4 microorganismos por cada 100 g de carne; sin embargo, este límite no incluye a mariscos, en los cuales requiere ser determinado. Además, encontró una estrecha relación entre las cuentas viables de V. parahaemolyticus y V. alginolyticus: por cada 100 células del segundo existen 10 del primero; de este dato se desprende que del recuento de V. alginolyticus puede estimarse el grado de contaminación de los alimentos por V. parahaemolyticus.

Por otro lado, la reacción al fenómeno de Kanagawa sigue siendo uno de los aspectos más enigmáticos de Vibrio parahaemolyticus (153,172,122).

Originalmente se había postulado que las cepas KP-, las cuales se encuentran generalmente en los alimentos, se transformaban en KP+ al pasar por el tracto intestinal humano. Sin embargo,

los experimentos realizados para probar esta hipótesis, tanto en animales como en voluntarios humanos, resultaron infructuosos; se administraron cepas KP- por vía oral y en ningún caso se recobraron cepas transformadas a partir de las heces (5,77).

Posteriormente, se sospechó que la presencia de plásmidos en las cepas KP+ podrían explicar esta situación. Sin embargo, en los estudios realizados por Guerry (77) y Twedt (186) sólo se detectaron plásmidos en algunas de las cepas KP+ y nunca en las KP-, pudiendo comprobarse además, que la curación de los mismos, no afectaba en forma significativa la producción de hemolisina (77) ni la reactividad en el modelo del asa ligada de conejo (186).

Otro fenómeno interesante fue el detectado por Burstyn (35): él comprobó que unas cepas mutantes espontáneas auxotróficas para Cys- y Arg- de una cepa originalmente KP+, se manifestaron KP- y la posterior reversión a la prototrofia no se acompañó del retorno al fenotipo original KP+. A este respecto, se ha sugerido que algunos elementos de inserción en secuencia (IS), como los observados en algunas mutaciones de los operones gal y lac en E. coli, pudieran estar involucrados en la producción de la hemolisina, actuando como factores de control o como parte del gene estructural. En este sentido, los estímulos del medio ambiente podrían influir en eventos de inserción/excisión de algún elemento IS que gobernara la expresión del gene de la hemolisina. Como sucede en algunos sistemas biológicos, existen transposones que forman parte integral en la regulación de un gene normal y cuyo movimiento depende de estímulos externos para que el microorganismo se adapte a cambios en el ambiente. Si un mecanismo similar existiera en V. parahemolyticus y gobernara la producción de hemolisina, podría pensarse que al menos algunas cepas KP- lleva

rían crípticamente la información genética para la producción de la hemolisina (35).

Si bien el fenómeno Kanagawa permanece sin explicación, cabe señalar un fenómeno similar exhibido por otro grupo de vibrios: los no aglutinables (NAG). En éstos, se observa lo siguiente: aquellos aislamientos obtenidos del medio ambiente presentan una reactividad negativa a la prueba del asa ligada de conejo, mientras los obtenidos a partir de heces de pacientes la muestran positiva (158a).

Otra observación interesante con respecto al fenómeno Kanagawa se desprende de la administración del microorganismo a animales. Chun (57) no encontró diferencia alguna entre cepas KP+ y KP- en lo que se refiere a aparición de síntomas y excreción del microorganismo en heces, al llevar a cabo pruebas con perros y gatos. Del mismo modo, Aiso no pudo diferenciar las cepas patógenas de las no patógenas en sus experimentos. Por otro lado, se ha observado que algunas cepas que resultan patógenas en el humano, no muestran efecto alguno en el animal y viceversa (57).

VIII. DISCUSION

Vibrio parahaemolyticus exhibe una amplia distribución en el orbe lo cual ha provocado que se le aisle en diferentes climas, desde aguas tropicales hasta cuerpos de agua fría (pese a su alta sensibilidad a las bajas temperaturas). Este hecho podría explicarse en base a su gran capacidad de adaptación pues además, su asociación con otros seres como el plancton así como con organismos superiores, ha dado lugar a que se le obtenga incluso en agua dulce, siendo un microorganismo halófilo.

Sin embargo, dicha capacidad de adaptación puede ser el resultado del aislamiento de especies atípicas estrechamente emparentadas con él y que son prácticamente indistinguibles por métodos convencionales. Así, sería factible tener varias especies agrupadas bajo una sola, dando esta única especie, la apariencia de ubicuidad.

Quizá esta misma situación sea responsable en cierta medida de la variedad de síntomas registrados en diferentes grupos de pacientes además del mecanismo por el cual desencadena la enfermedad pues, en ambos casos, no se ha llegado a una explicación satisfactoria como tampoco lo ha sido el fenómeno Kanagawa.

IX. CONCLUSIONES

- Con respecto a los aspectos generales de V. parahaemolyticus:
 1. Es un microorganismo al que no se le presta la debida atención en México, no obstante que en un significativo número de mexicanos se han puesto de manifiesto anticuerpos séricos y de que se le ha detectado en las aguas de nuestros mares y en los alimentos que de ellas obtenemos.
 2. Es un habitante típico de los estuarios en cuya ecología desempeña una función relevante, aunque también puede detectarse en otros ambientes acuáticos.
 3. Es una bacteria Gram-negativa, halófila y mesófila (aunque desarrolla a temperaturas que van desde los 9 hasta los 44°C) y cuyo pH óptimo es de 7.5 a 8 (aunque puede reproducirse en un rango de 5 a 11); presenta flagelación mixta y su tiempo de generación varía comúnmente entre 9 y 11 minutos.

- Por lo que se refiere al diagnóstico de las gastroenteritis debidas a Vibrio parahaemolyticus:
 1. Para efectuar el aislamiento del microorganismo a partir de muestras de materia fecal, los medios de enriquecimiento óptimo son el agua peptonada salina alcalina, el caldo de Monsur, el medio de Kristensen, el medio de Kampelmacher y el TSB adicionado de 7% de NaCl; asimismo, los medios

selectivos en placa más adecuados son el TCES adicionado de NaCl, el WA, el AAC y el de Twedt y Novelli con 7% de NaCl y 1% de almidón de maíz.

2. En cuanto a las pruebas bioquímicas que se emplean para la identificación del microorganismo, debe considerarse el cuadro propuesto por Hugh y Sakazaki, para reducir costos y tiempo sin que se disminuya la confiabilidad de los resultados.

- Por lo que toca a la patogenicidad del microorganismo, los únicos factores detectados a la fecha son la hemolisina termolabile directa (responsable del fenómeno de Kanagawa) y su capacidad de adherencia, la cual es determinante para su invasividad. Sin embargo, no debe descartarse la posibilidad de que produzca alguna otra toxina y de que la cápsula tenga propiedades antifagocitarias.

- Sobre su patología:

1. La enfermedad principal con la que se relaciona es la gastroenteritis, la cual origina síntomas diversos dependiendo de la cepa, la resistencia del huésped y el número de microorganismos ingeridos.
2. Los diferentes grados de virulencia observados entre las distintas cepas aisladas de pacientes y las variaciones en el fenómeno de Kanagawa, parecen reforzar la hipótesis de que existe todo un espectro de vibrios marinos muy relacionados capaces de causar enfermedad en el humano.

3. Los signos más frecuentes en la gastroenteritis son la diarrea, el dolor abdominal, las náuseas y el vómito.
4. No obstante que en la mayoría de las veces las lesiones sólo afectan al tracto intestinal, existen evidencias de que en los casos más severos otros órganos y tejidos, incluyendo el corazón, pueden verse involucrados.
5. Aunque con muy baja frecuencia, se ha encontrado que puede provocar panoftalmítis, otitis y gangrena.

- Acerca de su epidemiología:

1. Aunque la mayor frecuencia de envenenamientos alimentarios se ha presentado en el Japón, en donde más se acostumbra consumir pescado crudo, ya se han detectado casos importantes en todo el mundo; de hecho, ya se reconoce que Vibrio parahaemolyticus es uno de los principales agentes etiológicos de gastroenteritis en todo el orbe.
2. La más elevada incidencia de gastroenteritis debidas a este microorganismo se presenta en los meses en que las temperaturas son más altas; sin embargo, en ciertas regiones existe un gran número de casos durante todo el año.
3. Los portadores asintomáticos desempeñan un papel importante en la transmisión del microorganismo; no obstante, la enfermedad se adquiere más frecuentemente por la ingestión de alimentos del mar que no han sido refrigerados y/o cocidos óptimamente.

- Refiriéndose a las medidas que deben tomarse en nuestro país, es importante destacar la necesidad de incorporar los métodos microbiológicos tendientes a detectar la presencia de Vibrio parahaemolyticus tanto en los alimentos como en las muestras clínicas; asimismo, es conveniente establecer encuestas epidemiológicas lo suficientemente representativas. Ello conduciría a determinar la verdadera incidencia de este microorganismo y a instituir la terapéutica adecuada.

X. A N E X O S

AGUA PEPTONADA ALCALINA

Peptona	10 g
NaCl	10 g
H ₂ O	1000 ml
pH	8.6 - 9.0

El medio se distribuye en cantidades de 10 ml y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.

En el medio se inocula una muestra de 0.5 g ó 0.5 - 1 ml de heces y se incuba a 35 - 37°C durante 6 a 8 h; observando este tiempo de incubación se previene el sobredesarrollo de otras bacterias de la flora fecal (153).

CALDO DE MONSUR

Peptona	10 g
Cloruro de Sodio	10 g
Taurocolato de Sodio	5 g
Carbonato de Sodio	1 g
Agua	1000 ml
pH	9.0-9.2

Después de esterilizar el medio en autoclave a 121°C durante 15 minutos, se agrega telurito de potasio a una concentración final de 1:100,000 (153).

CALDO SAL-POLIMIXINA B

Extracto de levadura	3 g
Peptona	10 g
NaCl	20 g
Polimixina B	250 µg
H₂O	1000 ml
pH	8.6-9.0

El medio se distribuye en cantidades de 10 ml y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Cada tubo se inocula con 1 g ó 1 ml de muestra y se incuba a 35-37°C durante 8-12 h (153).

CALDO
AZUL AGUA - AMARILLO ALIZARINA

Peptona	10 g
Sacarosa	10 g
Cloruro de Sodio	30 g
Azul Agua	0.02 g
Amarillo Alizarina	0.02 g
Teepol	2.0 ml
Agua	1000 ml
pH	6.9

El medio se distribuye en cantidades de 10 ml y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos (19).

CALDO DE HORIE

Peptona	5 g
Extracto de carne	3 g
Cloruro de Sodio	30 g
Azul de Bromotizol	0.03 g
Violeta de Etilo	0.001 g
Arabinosa	5 g
Agua	1000 ml
pH	9.0

La solución de arabinosa se esteriliza por filtración y se agrega asepticamente al medio basal, el cual previamente se ha esterilizado en autoclave (117).

AGAR T C B S

Extracto de Levadura	5 g
Peptona	10 g
Sacarosa	20 g
Tiosulfato de Sodio	10 g
Citrato de Sodio	10 g
Colato de Sodio	3 g
Bilis de buey	5 g
Cloruro de Sodio	10 g
Citrato Férrico	1 g
Azul de Timol	0.04 g
Azul de Bromotimol	0.04 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH	8.6

El medio se calienta hasta disolver los ingredientes, se enfría a 45°C y se distribuye en cajas de Petri; no debe esterilizarse en autoclave (153).

AGAR DE WAGATSUMA

Extracto de levadura	3 g
Bactopeptona	10 g
Cloruro de Sodio	70 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Agar	15 g
H ₂ O	1000 ml

Después de disolver los ingredientes (debe evitarse la esterilización en autoclave), se agrega manitol a una concentración final de 1%, así como cristal violeta en solución alcohólica (al 0.1%) a una concentración de 0.1%. De igual modo se adiciona sangre des-fibrinada de conejo o de humano (o una suspensión salina de hematíes) al 5% (122).

AGAR DE AKIYANA

Extracto de Carne	5 g
Peptona	10 g
Sacarosa	10 g
Cloruro de Sodio	20 g
Teepol	2.0 ml
Azul de Bromotimol	0.08 g
Agar	15 g
Agua	1000 ml
pH	7.8

El medio se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

En muchos casos se ha substituido el Teepol por Tergitol 7 (0.1 ml) debido a su gran estabilidad (153).

AGAR DE KOURANY

Tripticase Soya Agar	40 g
Cloruro de Sodio	25 g
Sacarosa	20 g
Sales Biliares	0.5 g
Solución de Cloruro de Trifeniltetrazolio al 1%	3 ml
Agua	1000 ml
pH	7.1

El medio se esteriliza en autoclave
a 121°C durante 15 minutos (104).

AGAR BTB-Teepol MODIFICADO

Extracto de carne	5 g
Peptona	30 g
NaCl	40 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	30 g
Sacarosa	20 g
Glucosa	4 g
Teepol	2 ml
Agar Noble	15 g
Azul de Bromotimol	0.08 g
Púrpura de Bromocresol	0.01 g
Antihemolisina	50 ml
Agua	1000 ml
pH	8.0

Para la prueba de inmunohalo, el suero antihemolisina (con un título de 1:32), se mezcla con el medio esterilizado en autoclave, cuando este último se haya enfriado a 50°C (83).

AGAR DE KAPER

Peptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Triptona	10 g
Cloruro de Sodio	30 g
Sacarosa	20 g
Lactosa	20 g
Manitol	1 g
Clorhidrato de Arginina	5 g
Citrato de Amonio Férrico	0.5 g
Tiosulfato de Sodio	0.3 g
Púrpura de Bromocresol	0.02 g
Agar	13.5 g
Agua	1000 ml
pH	6.7

El medio se distribuye en cantidades de 5 ml y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 12 minutos. Los tubos se dejan enfriar en posición inclinada y, una vez que se han inoculado, se incuban a 35°C durante 18-24 horas (99).

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Arcos, J.M., Del Moral, A. and Reparaz, J.: "The presence of halophilic vibrios in waters of Navarra (Spain), very distant from the sea". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, Eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 77-81, 1974.
2. Asakawa, Y., Akahane, S. and Noguchi, M.: "Quantitative studies on Pollution with Vibrio parahaemolyticus, during distribution of Fish". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, Eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 97-103, 1974.
3. Atthasampuna, P.: "Vibrio parahaemolyticus food poisoning in Thailand". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, Eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 21-26, 1974.
4. Ayres, P.A. and Barrow, G.R.: "The distribution of Vibrio parahaemolyticus in British coastal waters; report of a collaborative study 1975-1976". J. Hyg., 80, 281, 1978.
5. Barker Jr., W.H.: "Vibrio parahaemolyticus outbreaks in the United States". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, Eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 47-52, 1974.
6. Baross, J. and Liston, J.: "Ocurrence of Vibrio parahaemolyticus and related hemolytic vibrios in marine environments of Washington State". Appl. Microbiol., 20, 179, 1970.
7. Baross, J., Liston, J. and Morita, R.: "Ecological relationship between Vibrio parahaemolyticus and Agar Digesting vibrios as evidenced by Bacteriophage Susceptibility Patterns". Appl. and Environ. Microbiol., 36 (3): 500-505, 1978.
8. Baross, J., Liston, J. and Morita, R.: "Incidence of Vibrio parahaemolyticus bacteriophages and other vibrio bacteriophages in marine samples". Appl. and Environ. Microbiol., 36 (3): 492-499, 1978.
9. Baross, J., Liston, J. and Morita, R.: "Some implications of Genetic Exchange among marine vibrios, including Vibrio parahaemolyticus, naturally occurring in the Pacific Oyster". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, Eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 129-137, 1974.

10. Barrow, G.I. and Miller, D.C.: "Growth studies on Vibrio parahaemolyticus in relation to Pathogenicity". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, Eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 205-210, 1974.
11. Barrow, G.I. and Miller, D.C.: "Vibrio parahaemolyticus: a potential pathogen from marine sources in Britain". Lancet I, 485, 1972.
12. Bartley, P.D. and Slanetz, L.W.: "Ocurrence of Vibrio parahaemolyticus in estuarine waters and oysters of New Hampshire". Appl. Microbiol., 21; 965-966, 1971.
13. Baumann, P., Furniss, A.L. and Lee, J.V.: "Genus Vibrio", Pacini, in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. I, Williams and Wilkins, Co., Baltimore, 518-538, 1984.
14. Beachey, E.A.: "Bacterial Adherence; Interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces". J. of Infect. Dis., 143 (3); 325-345, 1981.
15. Belas, M.R. and Colwell, R.R.: "Scanning Electron Microscope Observation of the Swarming Phenomenon of Vibrio parahaemolyticus". J. Bacteriol. 150 (2); 956-959, 1982.
16. Beuchat, L.R.: "Combined effects of water activity, solute and temperature on the growth of Vibrio parahaemolyticus". Appl. Microbiol. 27, 1075, 1974.
17. Beuchat, L.R.: "Comparison of Anti-Vibrio Activities of Potassium Sorbate, Sodium Benzoate and Glycerol and Sucrose Esters of Fatty Acids". Appl. and Environ. Microbiol., 39; 1178-1182, 1980.
18. Beuchat, L.R.: "Interacting effects of pH, temperature and salt concentration on growth and survival of Vibrio parahaemolyticus". Appl. Microbiol. 25 (5); 844, 1973.
19. Beuchat, L.R.: "Suitability of some enrichment broths and diluents for enumerating cold and heat-stressed Vibrio parahaemolyticus". Can. J. Microbiol. 23; 630-633, 1977.
20. Beuchat, L.R. and Worthington, R.E.: "Relationships between Heat Resistance and Phospholipid Fatty Acid Composition of Vibrio parahaemolyticus". Appl. and Environ. Microbiol., 31 (3); 389-394, 1976.

21. Bianchi, M.: "Composition en bases de l'ADN et position taxonomique de bactéries marines fermentant le glucose du genre *Vibrio* et des genres voisins". Arch. Mikrobiol., 90: 131-140, 1973.
22. Bianchi, M.: "Etude Taxonomique et Distribution Ecologique des Bactéries Vibroides du Milieu Marin". These pour obtenir le grade de docteur au sciences naturelles. L'Université D'Aix-Marseille, 1976.
23. Binta, M.G. and Nyaga, P.N.: "The distribution of *Vibrio parahaemolyticus* serotypes in Kenyan seafish, shellfish, marine water and sediment". Trans. of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg., 76 (4): 497-499, 1982.
24. Blake, P.A., Weaver, R.E. and Hollis, D.G.: "Diseases of Humans (other than cholera) caused by vibrios". Ann. Rev. Microbiol., 34: 341-367, 1980.
25. Bockemuhl, J. and Triemer, A.: "Ecology and Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* on the coast of Togo". Bull. W.H.O., 51, 353, 1974.
26. Boer, W.E. De, Golten, C. and Scheffers, W.: "Effects of Some Chemical Factors on Flagellation and Swarming of *Vibrio alginolyticus*". Neth. J. Sea Res., 9 (4): 385-403, 1975.
27. Boer, W.E. De, Golten, C. and Scheffers, W.: "Effects of Some Physical Factors on Flagellation and Swarming of *Vibrio alginolyticus*". Neth. J. Sea Res., 9 (2): 197-213, 1975.
28. Bonang, G., Lintong, M. and Santoso, U.: "The isolation and susceptibility to various antimicrobial agents of *Vibrio parahaemolyticus* from acute gastroenteritis cases and from sea food in Jakarta". Int. Symp. on *Vibrio parahaemolyticus*, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, Eds., Saikon Publ., Co., Tokyo, 27-33, 1974.
29. Boutin, B., Townsend, S., Scarpino, P. and Twedt, R.: "Demonstration of Invasiveness of *Vibrio parahaemolyticus* in Adult Rabbits by Immunofluorescence". Appl. and Environ. Microbiol., 37 (3): 647-653, 1979.
30. Bradshaw, J., Francis, D. and Twedt, R.: "Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in Cooked Seafood at Refrigeration Temperatures". Appl. Microbiol., 27 (4): 657-661, 1974.

31. Brinkley, A., Rommel, F. and Huber, T.: "The isolation of Vibrio parahaemolyticus and related vibrios from moribund aquarium lobsters". *Can. J. Microbiol.*, 22: 315-317, 1976.
32. Broek, M. Van den and Mossel, D.: "Sublethal Cold Shock in Vibrio parahaemolyticus". *Appl. and Environ. Microbiol.*, 34 (1): 97-98, 1977.
33. Broek, M. Van den, Mossel, D. and Eggenkamp, A.: "Occurrence of Vibrio parahaemolyticus in Dutch Mussels". *Appl. and Environ. Microbiol.*, 37: 438-442, 1979.
34. Brown, D., Spaulding, F. and Twedt, R.: "Enteropathogenicity of Vibrio parahaemolyticus in the Ligated Rabbit Ileum". *Appl. and Environ. Microbiol.*, 33 (1): 10-14, 1977.
35. Burstyn, D., McNicol, L. and Voll, J.: "Isolation and Characterization of Spontaneously Arising Auxotrophic and Kanagawa Phenomenon-Negative Mutants of Vibrio parahaemolyticus". *Infect. Immun.*, 27 (3): 889-896, 1980.
36. Galia, F. and Johnson, D.: "Bacteremia in Suckling Rabbits after Oral Challenge with Vibrio parahaemolyticus". *Infect. Immun.*, 11 (6): 1222-1225, 1975.
37. Carney, J., Wan, L., Lovelace, T. and Colwell, R.: "Numerical Taxonomy Study of Vibrio and Spirillum spp.". *Int. J. of Syst. Bacteriol.*, 25 (1): 38-46, 1975.
38. Carruthers, M.M.: "Cytotoxicity of Vibrio parahaemolyticus in HeLa Cell Culture". *J. of Infect. Dis.*, 132 (5): 555-560, 1975.
39. Carruthers, M. and Anderson, B.: "Inhibition by Polyanions of Adherence by Kanagawa-Positive Vibrio parahaemolyticus: A Physicochemical Effect". *J. of Infect. Dis.*, 140 (1): 119-122, 1979.
40. Carruthers, M.M.: "In vitro Adherence of Kanagawa-Positive Vibrio parahaemolyticus to Epithelial Cells". *J. of Infect. Dis.*, 136 (4): 588-592, 1977.
41. Carruthers, M. and Kabat, W.: "Isolation of Vibrio parahaemolyticus from fecal specimens on mannitol-salt agar". *J. Clin. Microbiol.*, 4, 175, 1976.

42. Casellas, J., Carlia, M. y Gerghi, M.: "Aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* en distintas variedades de mejillones en Argentina". Rev. Asoc. Argent. Microbiol., 9 (2): 41-53, 1977.
43. Colwell, R.R.: "Ocurrence and Biology of *Vibrio parahaemolyticus*". Microbiology-D. Schlessinger, Ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C., 230-240, 1975.
44. Colwell, R.R.: "Polyphasic Taxonomy of the Genus *Vibrio*; Numerical Taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and Related *Vibrio* Species". J. Bacteriol., 104: 410-433, 1970.
45. Colwell, R.R.: "Vibriosis and Spirilla" in Handbook of Microbiology, Laskin, A.I. and Lechevalier, H.A., Eds., CRC, Press, Boca Raton, Fla., 229-233, 1973.
46. Colwell, R., Kaneko, T. and Staley, T.: "*Vibrio parahaemolyticus*; an estuarine bacterium resident in Chesapeake Bay". Marine Tech. Soc. Food-Drugs Sea Proc.: 87-93, 1972.
47. Colwell, R., Kaneko, T., Staley, T., Sochard, M., Pickar, J. and Wan, L.: "*Vibrio parahaemolyticus*. Taxonomy, Ecology and Pathogenicity". Int. Symp. on *Vibrio parahaemolyticus*, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, Eds., Saikon Publ., Co., Tokyo, 169-176, 1974.
48. Colwell, R., Kaper, J. and Joseph, S.: "*Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and other vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay". Science 198: 394-396, 1977.
49. Colwell, R. and Kaper, J.: "*Vibrio* species as Bacterial Indicators of Potential Health Hazards Associated with Water". ASTM STP 635, Hoadley, A.W. and Dutka, B.J., Eds., American Society for Testing and Materials: 115-125, 1977.
50. Covert, D. and Woodburn, M.: "Relationships of Temperature and Sodium Chloride Concentration to the Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in Broth and Fish Homogenate". Appl. Microbiol., 23: 321-325, 1972.
51. Chatterjee, B.D.: "Epidemiologic and Taxonomic Status of *Vibrio parahaemolyticus*". Int. Symp. on *Vibrio parahaemolyticus*, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, Eds., Saikon Publ., Co., Tokyo, 177-185, 1974.

52. Chatterjee, B., De, P.K. and Sen, T.;
"Sucrose-teepol-tellurite agar: a new selective indicator medium for isolation of Vibrio species".
J. of Infect. Dis., 135, 654, 1977.
53. Chatterjee, B., Gorbach, S. and Neogy, K. :
"Vibrio parahaemolyticus and diarrhoea associated with non cholera vibrios". Bull. W.H.O., 42, 460, 1970.
54. Cherwonogrodzky, J. and Clark, A.; "Production of the Kanagawa Hemolysin by Vibrio parahaemolyticus in a Synthetic Medium". Infect. Immun., 37 (1): 60-63, 1982.
55. Chester, B. and Poulos, E.;
"Rapid Presumptive Identification of Vibrios by Immobilization in Distilled Water".
J. Clin. Microbiol., 11 (5): 537-539, 1980.
56. Chun, D., Chung, J., Tak, R. and Seol, S.; "Nature of the Kanagawa Phenomenon of Vibrio parahaemolyticus".
Infect. Immun., 12 (1): 81-87, 1975.
57. Chun, D., Chung, J. and Tak, R. : "Some Observations on Kanagawa Type Hemolysis of Vibrio parahaemolyticus".
Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, Eds., Saikon Publ., Co., Tokyo, 199-204, 1974.
58. Daily, O., Debell, R. and Joseph, S.; "Superoxide Dismutase and Catalase Levels in Halophilic Vibrios".
J. of Bacteriol., 134 (2): 375-380, 1978.
59. D'Aoust, J. and Pirnick, H.; "Small Infection Doses of Salmonella". Lancet I, 866, 1976.
60. Davis, Dulbecco, Eisen, Ginsberg y Wood; "Tratado de Microbiología", Ed. Salvat, 712-713, 1978.
61. Deneke, C. and Colwell, R.; "Studies of the Cell Envelope of Vibrio parahaemolyticus".
Can. J. Microbiol., 19: 241-245, 1973.
62. Desmond, E., Janda, J., Adams, F. and Bottone, F.;
"Comparative Studies and Laboratory Diagnosis of Vibrio vulnificus, an Invasive Vibrio sp.".
J. Clin. Microbiol., 19 (2): 122-125, 1984.

63. Dupray, E. and Cormier, M.: "Optimal Enrichment Time for Isolation of Vibrio parahaemolyticus from Seafood". *Appl. and Environ. Microbiol.*, 46 (5): 1234-1235, 1983.
64. Felsenfeld, O. and Cabirac, H.: "A study of the Ecology of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio alginolyticus in Southeast Louisiana, U.S.A. with special consideration of seafood compsumption". *J. Appl. Nutr.*, 29 (1/2): 17, 1977.
- 64a. Field, M.: "Intestinal Secretions: effect of Cyclic AMP and its role in Cholera". *New Engl. J. of Med.*, 248 (20): 1137-1143, 1971.
65. Fishbein, M., Mehlman, I. and Pitcher, J.: "Isolation of Vibrio parahaemolyticus from processed meat of Chesapeake Bay blue crabs". *Appl. Microbiol.*, 20, 176, 1970.
66. Fishbein, M. and Wentz, B.: "Enumeration, laboratory identification and serotypic analysis of Vibrio parahaemolyticus", in *Microbiology-1974*, Schlessinger, D., Ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C., 246, 1975.
67. Fishbein, M., Wentz, B., Landry, W. and MacEachern, B.: "Vibrio parahaemolyticus isolates in the U.S.; 1969-1972". *Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus*, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, Eds., Saikon Publ., Co., Tokyo, 53-58, 1974.
68. Franca, S., Gibbs, D., Samuels, P. and Johnson, W.: "Vibrio parahaemolyticus in Brazilian Coastal Waters". *JAMA*, 244 (6): 587-588, 1980.
69. Fujino, T.: "Discovery of Vibrio parahaemolyticus". *Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus*, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, Eds., Saikon Publ., Co., Tokyo, 1-4, 1974.
70. Fujino, T., Sakasaki, R. and Tamura, K.: "The Proposed Type Strain of Vibrio parahaemolyticus". *Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus*, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, Eds., Saikon Publ., Co., Tokyo, 159-161, 1974.

71. Ghosh, A., Guhamazunder, D., Banerjee, P., Sengupta, K., Bose, A. and Majumder, R.: "Studies on Mechanism of Pathogenicity of Vibrio parahaemolyticus". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, Eds., Saikon Publ., Co., Tokyo, 219-226, 1974.
72. Gilman, R., Spira, W., Rabbani, G. and Al-Mahomod, A.: "Invasive Escherichia coli and Vibrio parahaemolyticus a rare cause of dysentery in Dacca". Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., 74 (5): 688-689, 1980.
73. Gingras, S. and Howard, L.: "Adherence of Vibrio parahaemolyticus to Human Epithelial Cell Lines". Appl. and Environ. Microbiol., 39 (2): 369-371, 1980.
74. Goldmintz, D.: "Food Technological Aspects of Vibrio parahaemolyticus in Market Seafoods". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, Eds., Saikon Publ., Co., Tokyo, 147-152, 1974.
75. Golten, C. and Scheffers, W.: "Marine vibrios isolated from water along the Dutch coast". Neth. J. Sea Res., 9 (3-4): 351-364, 1975.
76. Goshima, K., Owaribe, K., Yamanake, H. and Yoshino, S.: "Requirement of Calcium Ions for Cell Degeneration with a Toxin (Vibriolysin) from Vibrio parahaemolyticus". Infect. Immun., 22 (3): 821-832, 1978.
77. Guerry, P. and Colwell, R.: "Isolation of Cryptic Plasmid Deoxyribonucleic Acid from Kanagawa Positive strains of Vibrio parahaemolyticus". Infect. Immun., 16: 328-334, 1977.
78. Hackney, C., Kleeman, E., Ray, B. and Speck, M.: "Adherence as a Method for Differentiating Virulent and Avirulent Strains of Vibrio parahaemolyticus". Appl. and Environ. Microbiol., 40 (3): 652-658, 1980.
79. Heinis, J., Beuchat, L. and Boswell, F.: "Antimetabolite Sensitivity and Magnesium Uptake by Thermally Stressed Vibrio parahaemolyticus". Appl. and Environ. Microbiol., 35 (6): 1035-1040, 1978.
80. Honda, T., Cheerskul, S., Takeda, Y. and Miwatani, T.: "Immunological Methods for Detection of Kanagawa Phenomenon of Vibrio parahaemolyticus". J. Clin. Microbiol., 11 (6): 600-603, 1980.

81. Honda, T., Goshima, K., Takeda, Y., Sugino, Y. and Miwatani, T.: "Demonstration of the Cardiotoxicity of the Thermostable Direct Hemolysin (Lethal Toxin) produced by Vibrio parahaemolyticus". Infect. Immun., 13 (1): 163-171, 1976.
82. Honda, T., Shimizu, M., Takeda, Y. and Miwatani, T.: "Isolation of a Factor Causing Morphological Changes of Chinese Hamster Ovary Cells from the Culture Filtrate of Vibrio parahaemolyticus". Infect. Immun., 14: 1028-1033, 1976.
83. Honda, T., Sornchai, C., Takeda, Y. and Miwatani, T.: "Immunological Detection of the Kanagawa Phenomenon of Vibrio parahaemolyticus on Modified Selective Media". J. Clin. Microbiol., 16 (4): 734-736, 1982.
84. Honda, T., Taga, S., Takeda, T., Hasibuan, M., Takeda, Y. and Miwatani, T.: "Identification of Lethal Toxin with the Thermostable Direct Hemolysin produced by Vibrio parahaemolyticus and Some Physicochemical Properties of the Purified Toxin". Infect. Immun., 13 (1): 133-139, 1976.
85. Hugh, R. and Sakazaki, R.: "Minutes of the Meeting of the Subcommittee of the Taxonomy of vibrios, Sept. 3, 1974". Int. J. Syst. Bacteriol., 25, 389, 1975.
86. Hughes, J., Boyce, J., Aleem, A., Wells, J., Rahman, A. and Curlin, G.: "Vibrio parahaemolyticus enterocolitis in Bangladesh; report of an outbreak". Am. J. Trop. Med. Hyg., 27: 106-112, 1978.
87. Iijima, Y., Yamada, H. and Shinoda, S.: "Adherence of Vibrio parahaemolyticus and its relation to pathogenicity". Can. J. Microbiol., 27: 1252-1259, 1981.
88. Jackson, H.: "Temperature relationships of Vibrio parahaemolyticus". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, Eds., Saikon Publ., Co., Tokyo, 139-145, 1974.
89. Jegathesan, M. and Paramasivam, T.: "Emergence of Vibrio parahaemolyticus as an important cause of diarrhea in Malaysia". Am. J. Trop. Med. Hyg., 25 (1): 201-202, 1976.

90. Johnson, D. and Calia, F.: "False-Positive Rabbit Ileal Loop Reactions Attributed to Vibrio parahaemolyticus Broth Filtrates".
J. of Infect. Dis., 133 (4): 436-440, 1976.
91. Jonas, R., Buckley, E. and Pfaender, F.: "A note on the isolation of the bacterium Vibrio parahaemolyticus from estuarine North Carolina".
Estuaries, 1 (4): 264-266, 1978.
92. Joseph, S.W.: "Observations on Vibrio parahaemolyticus in Indonesia". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakasaki, Takeda, Eds., Saikon Publ., Co., Tokyo, 35-40, 1974.
93. Joseph, S., Colwell, R. and Kaper, J.: "Vibrio parahaemolyticus and related halophilic vibrios".
CRC Crit. Rev. Microbiol., 10 (1): 77-124, 1982.
94. Joseph, S., Debell, R. and Brown, W.: "In vitro response to Chloramphenicol, Tetracycline, Ampicillin, Gentamicin and Beta-lactamase production by Halophilic Vibrios from Human and Environmental Sources".
Antimicrob. Agents Chemother., 13: 244-248, 1978.
95. Kampelmacher, E., Van Noorle Janseny, L., Mossell, D. and Green, F.: "A survey of the occurrence of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio alginolyticus on mussels and oysters and in estuarine waters in the Netherlands".
J. Appl. Bact., 35, 431, 1972.
96. Kaneko, T. and Colwell, R.: "Adsorption of Vibrio parahaemolyticus onto chitin and copepods".
Appl. Microbiol., 29 (2): 269-274, 1975.
97. Kaneko, T. and Colwell, R.: "Distribution of Vibrio parahaemolyticus and related organisms in the Atlantic Ocean off South Carolina and Georgia".
Appl. Microbiol., 28, 1009, 1974.
98. Kaneko, T. and Colwell, R.: "Ecology of Vibrio parahaemolyticus in Chesapeake Bay".
J. Bacteriol., 113 (1): 24-32, 1973.
99. Kaper, J., Remmers, E. and Colwell, R.: "A medium for presumptive identification of Vibrio parahaemolyticus".
J. Food Prot., 43 (12): 936-938, 1980.

100. Kaper, J., Remmers, E., Lockman, H. and Colwell, R.: "Distribution of Vibrio parahaemolyticus in Chesapeake Bay during the summer". *Estuaries*, 4: 321, 1981.
101. Karunasagar, I.: "Production of Hemolysin by Vibrio parahaemolyticus in a Chemically Defined Medium". *Appl. and Environ. Microbiol.*, 41 (5): 1274-1275, 1981.
- 101a. Kimberg, D., Field, M., Johnson, J., Henderson, A. and Gershon, E.: "Stimulation of Intestinal Mucosal Adenyl Cyclase by Cholera Enterotoxin and Prostaglandins". *J. Clin. Invest.*, 50: 1218-1229, 1971.
102. Kimura, K., Tateiri, S. and Iita, H.: "Effects of pH of the Medium on Flagellation of Vibrio parahaemolyticus". *Appl. and Environ. Microbiol.*, 37: 1248-1249, 1979.
103. Koga, T., Toyoshima, S. and Kawata, T.: "Morphological Varieties and Host Ranges of Vibrio parahaemolyticus Bacteriophages isolated from Seawater". *Appl. and Environ. Microbiol.*, 44: 466-470, 1982.
104. Kourany, M.: "Medium for Isolation and Differentiation of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio alginolyticus". *Appl. and Environ. Microbiol.*, 45 (1): 310-312, 1983.
105. Kourany, M. and Vázquez, M.: "The first reported case from Panama of acute gastroenteritis caused by Vibrio parahaemolyticus". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 24 (4): 638-640, 1975.
106. Krantz, G., Colwell, R. and Lovelace, E.: "Vibrio parahaemolyticus from the blue crab Callinectes sapidus in Chesapeake Bay". *Science*, 164: 1286, 1969.
107. Kristensen, K.K.: "Semiquantitative examinations on the contents of Vibrio parahaemolyticus in the sound between Sweden and Denmark". *Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus*, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, Eds., Saikon Publ., Co., Tokyo, 105-110, 1974.
108. Kudoh, Y., Sakai, S., Zen-Yoji, H. and Le-Clair, R.: "Epidemiology of Food Poisoning due to Vibrio parahaemolyticus occurring in Tokyo during the last decade". *Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus*, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, Eds., Saikon Publ., Co., Tokyo, 9-13, 1974.

109. Lam, S. and Monteiro, E.:
"Isolation of Mucoid Vibrio parahaemolyticus Strains".
J. of Clin. Microbiol., 19 (1): 87-88, 1984.
110. Lam, S. and Yeo, M.:
"Urease-Positive Vibrio parahaemolyticus Strain".
J. of Clin. Microbiol., 12, 57, 1980.
111. Larsen, H.:
"Halophilism" in The Bacteria; a Treatise of Structure
and Function, Vol. IV.
Edited by I.C. Gonsalus & R.Y. Stanier.
Academic Press; New York and London.
p. 297-336, 1962.
112. Lehninger, A.:
"Biochemistry", 2nd edition.
The John Hopkins University
Worth Publishers, Inc., 158-168, 1978.
113. Leistner, L. and Hechelmann, H.:
"Occurrence and Significance of Vibrio parahaemolyticus
in Europe". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus,
Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, Eds., Saikon Publ.,
Co., Tokyo, 83-90, 1974.
114. Libenzon, A., Demina, A., Kulov, G., Shestialtynova, I.
and Manukyan, G.:
"Halophilic Vibrios of the Azov Sea".
Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., 6, 77, 1977.
115. Liston, J.: "Influence of the U.S. Seafood Handling
Procedures on Vibrio parahaemolyticus". Int. Symp. on
Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki,
Takeda, Eds., Saikon Publ., Co., Tokyo, 123-128, 1974.
116. Lots, M., Tamplin, M. and Rodrick, G.:
"TCBS agar and its selectivity for Clinical and Marine
vibrio organisms".
Ann. Clin. Lab. Sci., 13 (1): 45-48, 1983.
117. Ma-Lin, C. and Beuchat, L.:
"Recovery of Chill-Stressed Vibrio parahaemolyticus
from Oysters with Enrichment Broths Supplemented with
Magnesium and Iron Salts".
Appl. and Environ. Microbiol., 39 (1): 179-185, 1980.

118. Mc Cullough, N.B. and Eisele, C.W.
 "Experimental human salmonellosis I. Pathogenicity of strains of S. maleagris and S. anatum obtained from spray-dried whole egg: J. Infect. Dis. 89: 209-213, 1951.
119. Misaki, H.; Natsumoto, N.: "Purification of Lysophospholipase of Vibrio parahaemolyticus and Its Properties".
 J. Biochem. 83: 1395-1405, 1978.
120. Miwatani, T.; Sakurai, J.; Takeda, Y. and Shinoda, S.: "Studies on Direct Hemolysins of Vibrio parahaemolyticus", Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 245-251, 1974.
121. Miwatani, T., Takeda, Y., Sakurai, J., Yoshihara, A. and Taga, S.: "Effect of Heat (Arrhenius Effect) on Crude Hemolysin of Vibrio parahaemolyticus".
 Infect. Immun. 6(6): 1031-1033, 1972.
122. Miyamoto, Y., Kato, T., Obara, Y., Akiyama, S., Takizawa, K. and Yamai, S.: "In vitro hemolytic characteristic of Vibrio parahaemolyticus; its close correlation with human pathogenicity".
 J. Bacteriol. 100(2): 1147-1149, 1969.
123. Miyamoto, Y., Obara, Y., Nikkawa, T., Yamai, S., Kato, T., Yamada, Y. and Ohashi, M.: "Simplified Purification and Biophysicochemical Characteristics of Kanagawa Phenomenon-Associated Hemolysin of Vibrio parahaemolyticus".
 Infect. Immun. 28(2): 567-576, 1980.
124. Molenda, J. R., Johnson, W.G., Fishbein, M., Wentz, B., Mehlman, I. J. and Dadisman Jr., T.A.: "Vibrio parahaemolyticus gastroenteritis in Maryland; Laboratory Aspects".
 Appl. Microbiol. 24: 444-448, 1972.
125. Molina García, O., Martínez Barreda, C., Pérez Medrano, C. y Peral López, A.M.: "Frecuencia de anticuerpos séricos anti-Vibrio parahaemolyticus en manejadores de alimentos".
 Sal. Pùb. Méx. 25: 273-278, 1983.

126. Morishita, H., Takada, H.: "Sparing effect of Lithium ion on the specific requirement for sodium ion for growth of Vibrio parahaemolyticus". *Can. J. Microbiol.* 22: 1263-1268, 1976.
127. Morris, G.K., De Witt, W.E., Gangarosa, E.J. and Mc Cormack, W.M.: "Enhancement by NaCl of the selectivity of TCBS agar for isolating Vibrio cholerae biotype El Tor". *J. Clin. Microbiol.* 4: 133, 1976.
128. Moss, J. and Vaughan, M.: "Activation of Adenylate Cyclase by Cholera toxin". *Ann. Rev. Biochem.* 48: 581-600, 1979.
129. Muic, V. and Zekic, R.: "Isolation of Vibrio parahemolyticus from the Northern Adriatic, Croatia, Yugoslavia". *Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus*, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 41-45, 1974.
130. Nakanishi, H. and Murase, M.: "Enumeration of Vibrio parahaemolyticus in Raw Fish Meat". *Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus*, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 117-121, 1974.
131. Nava Fernández, L.M., Parrilla, M.C. y Salcedo, N.: "Aislamiento de Vibrio parahaemolyticus de ostras en México, D.F.". *Sal. Pùb. Méx.* 23(3): 275-279, 1981.
132. Nealson, K.H.: "Isolation, Identification and Manipulation of Luminous Bacteria". *Methods in Enzymology*, Vol. LVII, Bioluminescence and Chemiluminescence, edited by Marlene A. De Luca, Department of Chemistry, University of California at San Diego, La Jolla California. Academic Press, 1978.
133. Neumann, D.A., Benenson, M.W., Hubster, E., Thi Nhu Tuan, V. and Tien-Van, L.: "Vibrio parahaemolyticus in the Republic of Vietnam". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 21: 464, 1972.
134. Obara, Y., Yamai, S., Nikkawa, T., Miyamoto, Y., Ohashi, M. and Shimada, T.: "Histopathological changes in the Small Intestine of Suckling Mice Challenged Orally with Purified Hemolysin from Vibrio parahaemolyticus". *Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus*, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 253-257, 1974.

135. Oberhofer, T.R. and Podgore, J.K.: "Vibrio parahaemolyticus associated with Acute Gastroenteritis". J. Clin. Microbiol. 16(3): 581-583, 1982.
136. Ohashi, M., Ohta, K., Tsuno, M. and Zen-Yoji, H.: "Development of a sensitive serological assay, reversed passive hemagglutination test for detection of enteropathogenic toxin (Kanagawa hemolysin) of Vibrio parahaemolyticus and re-evaluation of the toxin producibility of the isolates from various sources". Proc. 13th Joint Conf. Cholera, DHEW Publ. No. (NIH) 78-1540, 403-412, 1978.
137. Oishi, K., Yokoshima, S., Tomiyama, T. and Aida, K.: "Exohemagglutinins: New Products of Vibrios". Appl. Environ. Microbiol. 38(1): 169-172, 1979.
138. Okabe, S.: "Statistical Review of Food Poisoning in Japan-Especially that by Vibrio parahaemolyticus". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 5-8, 1974.
139. Olsen, H.: "Vibrio parahaemolyticus isolated from Discharge from the ear in two patients exposed to sea water". Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B, 86: 247-248, 1978.
140. Palasuntheram, C.: "The Halophilic Properties of Vibrio parahaemolyticus". J. Gen. Microbiol. 127: 427-428, 1981.
141. Pickar, J.H., Sochard, M.R., Bellanti, J.A. and Colwell, R.R.: "Pathogenic Properties of Some Strains of Vibrio parahaemolyticus". Dev. Industrial Microbiol. 14: 337-345, 1973.
142. Pressman, B.C.: "Biological Applications of Ionophores". Annu. Rev. Biochem. 45: 501-530, 1976.
143. Ray, B., Hawkins, S.M. and Hackney, C.R.: "Method for the Detection of Injured Vibrio parahaemolyticus in Seafoods". Appl. Environ. Microbiol. 35(6): 1121-1127, 1978.
144. Reed, P.W. and Lardy, H.A.: "A23187: A Divalent Cation Ionophore". J. Biol. Chem. 247(21): 6970-6977, 1972.

145. Reyes, A.L., Crawford, R.G., Spaulding, F.L., Peeler, J.T. and Twedt, R.M.: "Hemagglutination and Adhesiveness of Epidemiologically Distinct Strains of Vibrio parahaemolyticus". Infect. Immun. 39(2): 721-725, 1983.
146. Rietschel, E.T., Palin, W.J. and Watson, D.W.: "Nature of Linkages of the Fatty Acids Present in Lipopolysaccharides from V. metchnikovii and V. parahaemolyticus". Eur. J. Biochem. 37: 116-120, 1973.
147. Roland, F.P.: "Isolated cases of V. parahaemolyticus gastroenteritis". JAMA 241(23): 2504, 1979.
148. Roland, F.P.: "Leg Grangrene and Endotoxin Shock Due to Vibrio parahaemolyticus- an Infection Acquired in New England Coastal Waters". New Engl. J. Med. 282: 1306, 1970.
149. Roland, F.P.: "Salt-starch xylose lysine deoxycholate agar. A simple medium for the isolation of sodium and non-sodium dependent enteric gram-negative bacilli". Med. Microbiol. Immunol. 163(4): 241-249, 1977.
150. Rottini, G.D., Tamaro, M., Cinco, M. and Monti-Bragadin, C.: "Effect of Na⁺, K⁺ and Li⁺ on the growth of V. parahaemolyticus and related strains isolated from the Adriatic Sea". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, eds., Saikon Publ. Co., Tokyo 153-157, 1974.
151. Sakai, S., Kudoh, Y. and Zen-Yoji, H.: "Food Poisoning caused by Indole-negative strains of Vibrio parahaemolyticus in Tokyo". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, eds., Saikon, Publ. Co., Tokyo, 59-62, 1974.
152. Sakazaki, R.: "Control of Contamination and Hygienic Standard of Food Safety for Vibrio parahaemolyticus". International Association of Microbiology Societies. Abstracts of the XII International Congress of Microbiology, Bacteriology Section, Intersectional Meeting, Micology Section, München, West Germany, 22, 1978.

153. Sakazaki, R. and Balows, A.: "The Genera *Vibrio*, *Plesiomonas* and *Aeromonas*" in *The Prokaryotes*, Vol. II; Starr, Stolp, Truper, Balows, Schlegel (eds.), Springer-Verlag; Berlin Heidelberg, New York, 1272-1285, 1981.
154. Sakazaki, R., Tamura, K., Nakamura, A., Kurata, T., Gohda, A. and Kazuno, Y.: "Enteropathogenic Activity of *Vibrio parahaemolyticus*". Int. Symp. on *Vibrio parahaemolyticus*, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 231-235, 1974.
155. Sakurai, J., Honda, T., Jinguji, Y., Arita, M. and Miwatani, T.: "Cytotoxic Effect of the Thermostable Direct Hemolysin Produced by *Vibrio parahaemolyticus* on FL cells". Infect. Immun. 13: 876-883, 1976.
156. Sakurai, J., Matsuzaki, A., Miwatani, T.: "Purification and Characterization of Thermostable Direct Hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*". Infect. Immun. 8(5): 775-780, 1973.
157. Sakurai, J., Matsuzaki, A., Takeda, Y. and Miwatani, T.: "Existence of two distinct hemolysins in *V. parahaemolyticus*". Infect. Immun. 9(5): 777-780, 1974.
158. Sanyal, S.C. and Sen, P.C.: "Human Volunteer Study on the Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*". Int. Symp. on *Vibrio parahaemolyticus*, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 227-230, 1974.
- 158a. Sanyal, S.C.: "NAG *Vibrio* Toxin". Pharmac. Ther. 20: 183-201, 1983.
159. Sarker, B.L., Nair, G.B., Sircar, B.K. and Pal, S.C.: "Incidence and Level of *V. parahaemolyticus* Associated with Freshwater Plankton". Appl. Environ. Microbiol. 46(1): 288-290, 1983.
160. Saylor, G.S., Nelson Jr., J.D., Justice, A. and Colwell, R.R.: "Incidence of *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum* and *Vibrio parahaemolyticus* in a Estuary". Appl. Environ. Microbiol. 31(5): 723-730, 1976.

161. Schwarz, J.R. and Colwell, R.R.: "Effect of Hydrostatic Pressure on Growth and Viability of Vibrio parahaemolyticus".
Appl. Environ. Microbiol. 28(6): 977-981, 1974.
- 161a. Sharp, G.W. and Hynie, S.: "Stimulation of Intestinal Adenyl Cyclase by Cholera Toxin".
Nature 20: 266-269, 1971.
162. Shinoda, S., Honda, T., Takeda, Y. and Miwatani, T.: "Antigenic Difference Between Polar Monotrichous and Peritrichous Flagella of Vibrio parahaemolyticus".
J. Bacteriol. 120(2): 923-928, 1974.
163. Shinoda, S., Miwatani, T., Honda, T. and Takeda, Y.: "Antigenicity of Flagella of Vibrio parahaemolyticus".
Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 193-197, 1974.
164. Shinoda, S., Okamoto, K.: "Formation and Function of Vibrio parahaemolyticus lateral flagella".
J. Bacteriol. 129(3): 1266-1271, 1977.
165. Sklarow, S.S., Colwell, R.R., Chapman, G.B. and Zane, S.F.: "Characteristics of a Vibrio parahaemolyticus bacteriophage isolated from Atlantic coast sediment".
Can. J. Microbiol. 19: 1519-1520, 1973.
166. Smith, M.R.: "Vibrio parahaemolyticus".
Clin. Med. 78: 22-25, 1971.
167. Sochard, M.R. and Colwell, R.R.: "Toxin Isolation from a Kanagawa-Phenomenon Negative Strain of V. parahaemolyticus".
Microbiol. Immunol. 21(5): 243-254, 1977.
168. Spite, G.T., Brown, D.F. and Twedt, R.M.: "Isolation of an Enteropathogenic, Kanagawa-positive Strain of Vibrio parahaemolyticus from seafood implicated in acute gastroenteritis".
Appl. Environ. Microbiol. 35(6): 1226-1227, 1978.
169. Staley, T.E. and Colwell, R.R.: "Polynucleotide Sequence Relationships Among Japanese and American Strains of Vibrio parahaemolyticus".
J. Bacteriol. 114(3): 916-927, 1973.

170. Sutton, R.G.A.: "Some Quantitative Aspects of Vibrio parahaemolyticus in Oysters in the Sydney Area". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakasaki, Takeda, eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 71-76, 1974.
171. Tacket, C.O., Barrett, T.J., Saunders, G.E. and Blake, P.A.: "Panophthalmitis caused by Vibrio parahaemolyticus". J. Clin. Microbiol., 16(1): 195-196, 1982.
172. Takeda, Y.: "Thermostable Direct Hemolysin of Vibrio parahaemolyticus". Pharmac. Ther., 19: 123-146, 1983.
173. Takeda, Y., Hori, Y., Taga, S., Sakurai, J. and Miwatani, T.: "Characterization of the Temperature-dependent Inactivating Factor of the Thermostable Direct Hemolysin in Vibrio parahaemolyticus". Infect. Immun., 12(3): 449-454, 1975.
174. Takeda, Y., Taga, S. and Miwatani, T.: "Evidence that Direct Hemolysin of Vibrio parahaemolyticus is composed of Two Subunits". FEMS Microbiol Lett., 4: 271-274, 1978.
175. Takeda, Y., Takeda, T., Honda, T., Sakurai, J., Ohtomo, N. and Miwatani, T.: "Inhibition of Hemolytic Activity of the Thermostable Direct Hemolysin of Vibrio parahaemolyticus by Ganglioside". Infect. Immun., 12: 931-933, 1975.
176. Takeda, Y., Takeda, T., Honda, T. and Miwatani, T.: "Inactivation of the Biological Activities of the Thermostable Direct Hemolysin of Vibrio parahaemolyticus by Ganglioside G_{T1}". Infect. Immun., 14(1): 1-6, 1976.
177. Tien-Van, L. and Thi-Nhu-Tuan, N.: "Vibrio parahaemolyticus isolated among diarrhea patients". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakasaki, Takeda, eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 15-20, 1974.
178. Thomson, W.K. and Thacker, C.L.: "Vibrio parahaemolyticus in Canadian Shellfish". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus Fujino, Sakaguchi, Sakasaki, Takeda, eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 63-69, 1974.

179. Thomson, W.K. and Trenholm, D.A.: "The isolation of Vibrio parahaemolyticus and related halophilic bacteria from Canadian Atlantic Shellfish".
Can. J. Microbiol., 17: 545, 1971.
180. Thompson, C.A. and Vanderzant, C.: "Relationship of Vibrio parahaemolyticus in oysters, water and sediment and bacteriological and environmental indices".
J. Food Sci., 41: 117, 1976.
181. Thorsteinson, S.B., Minuth, J.M. and Musher, D.M.: "Clinical Manifestations of Halophilic non-cholera Vibrio infections".
The Lancet II: 1283-1284, 1974.
182. Torii, M.: "Extraction and Antigenic Specificity of O-Antigens of Vibrio parahaemolyticus". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 187-192, 1974.
183. Torii, M. and Sakakibara, K.: "Occurrence of 2-amino-2-deoxyheuronic acids as constituents of Vibrio parahaemolyticus K15 antigens".
Eur. J. Biochem., 37: 401-405, 1973.
- 183a. Torre, J. de la : "Algunos conceptos sobre el tratamiento del desequilibrio hídrico y ácido básico en la diarrea". Libro Conmemorativo del Primer Centenario, Tomo II, Academia Nacional de Medicina, 429-431, 1963.
184. Tubiash, H.S., Colwell, R.R. and Sakazaki, R.: "Marine vibrios associated with bacillary necrosis; a disease of larval and juvenil bivalve mollusks".
J. Bacteriol., 103(1): 272-273, 1970.
185. Twedt, R.M. and Brown, D.P.: "Studies on the Enteropathogenicity of Vibrio parahaemolyticus on the Ligated Rabbit Ileum". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 211-217, 1974.

186. Twedt, R.M., Brown, D.P. and Zink, D.L.: "Comparison of Plasmid Deoxyribonucleic Acid Contents, Culture Characteristics and Indices of Pathogenicity Among Selected Strains of Vibrio parahaemolyticus". Infect. Immun., 33: 322-325, 1981.
187. Twedt, R.M., Novelli, R.E., Spaulding, P.L. and Hall, H.E.: "Comparative Hemolytic Activity of Vibrio parahaemolyticus". Infect. Immun., 1: 394-399, 1970.
188. Twedt, R.M., Peeler, J.T. and Spaulding, P.L.: "Effective Ileal Loop Dose of Kanagawa-positive Vibrio parahaemolyticus". Appl. Environ. Microbiol., 40(6): 1012-1016, 1980.
189. Twedt, R.M., Spaulding, P.L. and Hall, H.E.: "Morphological, Cultural, Biochemical and Serological Comparison of Japanese Strains of Vibrio parahaemolyticus with related cultures isolated in the United States". J. Bacteriol. 98(2): 511-518, 1969.
190. Twedt, R.M., Spaulding, P.L. and Johnson, H.: "Antigenic Schema and Epidemiology of Vibrio parahaemolyticus". Appl. Microbiol. 23: 966, 1972.
191. Ulitzur, S.: "Vibrio parahaemolyticus and Vibrio alginolyticus: short generation-time marine bacteria". J. Microbiol. Ecol., 1: 127, 1974.
192. Unemoto, T., Tsurucka, T. and Hayashi, M.: "Role of Na⁺ and K⁺ in preventing lysis of a slightly halophilic Vibrio alginolyticus". Can. J. Microbiol. 19: 563-571, 1973.
193. Vanderzant, C. and Nickelson, R.: "Procedure for Isolation and Enumeration of Vibrio parahaemolyticus". Appl. Microbiol. 23(1): 26-33, 1972.
194. Vanderzant, C. and Nickelson, R.: "Survival of Vibrio parahaemolyticus in Shrimp Tissue under various environmental conditions". Appl. Microbiol. 23(1): 34-37, 1972.
195. Vanderzant, C. and Nickelson, R.: "Vibrio parahaemolyticus: a problem in mariculture?". J. Milk Food Technol. 36(3): 135, 1973.

196. Vanderzant, C., Nickelson, R. and Hazelwood, R.W.: "Effect of Isolation-Enumeration Procedures on the Recovery of Normal and Stressed Cells of Vibrio parahaemolyticus". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 111-116, 1974.
197. Varon, M. and Shilo, M.: "Ecology of Aquatic Bdellovibrios" in Aquatic Microbiology, Reissman, C. ed., Vol. I, Academic Press, New York, 1-48, 1980.
198. Wagatsuma, S.: "Ecological studies on Kanagawa Phenomenon Positive Strains of Vibrio parahaemolyticus". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 91-96, 1974.
199. Watkins, W.D. and Cabelli, V.J.: "Vibrio parahaemolyticus in the Narragansett Bay estuary". Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol., 177, 1978.
200. Watkins, W.D., Thomas, C.D. and Cabelli, B.J.: "Membrane Filter Procedure for Enumeration of Vibrio parahaemolyticus". Appl. Environ. Microbiol. 32: 679, 1976.
201. Williams, H.N., Falkler, W.A. and Shay, D.E.: "Incidence of Marine Bdellovibrios Lytic Against Vibrio parahaemolyticus in Chesapeake Bay". Appl. Environ. Microbiol. 40(5): 970-972, 1980.
202. Yabuuchi, E., Miwatani, T., Takeda, Y. and Arita, M.: "Flagellar Morphology of Vibrio parahaemolyticus". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 163-168, 1974.
203. Zen-Yoiji, H., Hitokato, H., Morozomu, S. and Le-Clair, R.A.: "Purification and Characterization of a Hemolysin produced by Vibrio parahaemolyticus". J. Infect. Dis. 123(6): 665-667, 1971.
204. Zen-Yoiji, H., Kudoh, Y., Igarashi, H., Ohta, K. and Fukai, K.: "Purification and Identification on Enteropathogenic Toxins "A" and "A'", produced by Vibrio parahaemolyticus and their Biological and Pathological Activities". Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, eds., Saikon Publ. Co., Tokyo, 237-243, 1974.