

66
Zey



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PATOLOGIA ASOCIADA A LOS
PRINCIPALES VIBRIONES QUE AFECTAN
AL HUMANO.

TRABAJO MONOGRAFICO DE
ACTUALIZACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
PRESENTA:
MARCELA ELISA LIMON CHACON



267357

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO SEGÚN EL TEMA:

PRESIDENTE: RAÚL GARZA VELASCO
VOCAL: ABEL GUTIÉRREZ RAMOS
SECRETARIO: ADRIANA GUADALUPE MEJÍA CHAVEZ
PRIMER SUPLENTE: EDUARDO BONILLA ESPINOSA
SEGUNDO SUPLENTE: NORMA TREJO MEDINA

Lugar donde se desarrolló el tema:

BIBLIOTECAS DE LAS FACULTADES DE MEDICINA Y QUÍMICA, Y
DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS.

ASESOR DEL TEMA:



Q. F. B. RAÚL GARZA VELASCO.

SUSTENTANTE:



MARCELA ELISA LIMÓN CHACÓN

Este trabajo se lo dedico a:

Mis padres

Las dos personas más importantes en mi vida quienes han logrado con un gran esfuerzo hacer de mí, lo que soy.

Raúl Garza

Por su tiempo e interés así como por brindarme la gran oportunidad de concluir mi carrera profesional.

Ernesto

Por tu resistencia y apoyo incondicional.

Víctor Ugalde

Por ser una de las personas que más admiro por sus firmes creencias y valores.

Mi hermano

Por enseñarme a ver la vida de otra manera.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL GÉNERO <i>Vibrio</i>	
• Clasificación básica.....	4
• Microscopía.....	5
• Propiedades culturales.....	6
• Pruebas de identificación.....	8
II. <i>Vibrio cholerae</i>	
• Factores de virulencia.....	14
• Movilidad.....	16
• Adherencia.....	17
• Proteasa Hap.....	19
• La toxina del cólera.....	20
• Otras toxinas de <i>V. cholerae</i>	25
• Genes de virulencia <i>ctx</i> , <i>ace</i> y <i>zot</i>	27
• Principales características del padecimiento.....	30
• Algunos datos epidemiológicos.....	31
• <i>V. cholerae</i> 0139 Bengal.....	32
• Características del agente causal.....	36
• Diagnóstico del cólera en el laboratorio.....	37
• Tratamiento.....	40
• La búsqueda de una vacuna segura y efectiva.....	41
III. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
• El gen <i>tdh</i> en cepas de <i>V. parahaemolyticus</i>	47
• El gen <i>trh</i> en <i>V. parahaemolyticus</i>	48
• La virulencia de la TDH.....	49
• Propiedades fisicoquímicas de la TDH.....	50
• Propiedades biológicas de la TDH.....	51

• Actividad hemolítica	51
• Citotoxicidad y enterotoxicidad.....	52
• Toxicidad letal.....	55
• Respuestas cutáneas en animales.....	55
• Cardiotoxicidad de la TDH.....	56
IV. <i>Vibrio metschnikovii</i>	
• La citolicina de <i>Vibrio metschnikovii</i>	63
V. <i>Vibrio vulnificus</i>	67
VI. <i>Vibrio hollisae</i>	74
VII. <i>Vibrio mimicus</i>	77
VIII. Otras especies de <i>Vibrio</i> aparentemente patógenas para el humano.	
• <i>V. fluvialis</i>	83
• <i>V. furnissii</i>	84
• <i>V. alginolyticus</i>	85
• <i>V. damsela</i>	85
• <i>V. cincinnatiensis</i>	86
• <i>V. carchariae</i>	86
IX. CONCLUSIONES	87
X. BIBLIOGRAFÍA	89

INTRODUCCIÓN

En 1883, Roberto Koch reportó por vez primera la existencia de bacterias curvas Gram negativas -denominadas con el tiempo vibriones-, durante la quinta gran pandemia del cólera. No obstante, a partir de tal fecha se han venido identificando otros microorganismos estrechamente relacionados con *Vibrio cholerae*, los cuales también se encuentran tanto en el agua salada como en ríos y lagos, por lo que generalmente el ser humano entra en contacto con ellos al bañarse -con frecuencia en los estuarios- y/o al consumir pescado o mariscos crudos o cocidos parcialmente, e inclusive, al ingerir otros alimentos de origen vegetal en cuyo cultivo y riego se emplean aguas negras (4, 26 y 92).

Si bien el cólera representa la enfermedad más conocida entre las ocasionadas por vibriones, lo cierto es que otras especies del género *Vibrio* también provocan diversos padecimientos al humano, destacando los de índole gastrointestinal, aunque sin soslayar otras afecciones severas tales como la contaminación de heridas, los abscesos cutáneos, las septicemias y la invasión de órganos internos.

Entre más numerosas y profundas resultan las investigaciones acerca de otros vibriones, mayores son los hallazgos sobre sus múltiples factores de

patogenicidad; en este sentido, es preciso señalar la detección de numerosas estructuras proteicas que presentan actividad proteolítica y, desde luego, diversas exotoxinas muy virulentas, algunas de ellas muy relacionadas con el colerágeno (la exotoxina del cólera).

Cabe subrayar que independientemente de que la familia *Vibrionaceae* incluye a un número cada vez mayor de especies patógenas de *Vibrio*, también se encuentran ubicados en ella otros géneros que ocasionan el síndrome diarreico y diversas afecciones al humano; entre ellas destacan *Aeromonas* y *Plesiomonas*.

Por tal motivo, cada vez se hace más urgente practicar modificaciones a las metodologías relacionadas con los coprocultivos, a fin de que se puedan detectar otros agentes etiológicos cuya presencia en las muestras clínicas suele pasar inadvertida, en ausencia tanto de los medios de cultivo que se requieren para su aislamiento como de la secuencial identificación bioquímica e inmunológica.

El presente trabajo pretende subrayar la importancia clínica de las especies de *Vibrio* que más frecuentemente afectan la salud del ser humano, haciendo énfasis en sus principales factores de virulencia (4, 26 y 92).

OBJETIVOS

- Describir las principales características microbiológicas del género *Vibrio*, destacando aquéllas en las cuales podría basarse su diferenciación en el laboratorio clínico.
- Señalar los principales factores de virulencia detectados en: *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio metschnikovii* y *Vibrio mimicus*, enumerando los genes en los que reside su eventual síntesis.
- Mencionar los avances logrados en la determinación de la importancia clínica de *V. vulnificus* y *V. hollisae* en el ser humano.

I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL GÉNERO

Vibrio

- **Clasificación básica**

El género *Vibrio* pertenece a la familia *Vibrionaceae* y entre las especies más importantes del género destacan las siguientes:

Tabla 1. Especies del género *Vibrio*

<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio natriegens</i>
<i>Vibrio metschnikovii</i>	<i>Vibrio splendidus</i>
<i>Vibrio mimicus</i>	<i>Vibrio nigripulchritudo</i>
<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio fischeri</i>
<i>Vibrio hollisae</i>	<i>Vibrio hadaliensis</i>
<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	<i>Vibrio proteolyticus</i>
<i>Vibrio furnissii</i>	<i>Vibrio gazogenes</i>
<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Vibrio ordalii</i>
<i>Vibrio damsela</i>	<i>Vibrio costicola</i>
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio tubiashii</i>
<i>Vibrio carchariae</i>	<i>Vibrio aestuarianus</i>
<i>Vibrio campbellii</i>	<i>Vibrio logei</i>
<i>Vibrio nereis</i>	<i>Vibrio mediterranei</i>
<i>Vibrio pelagius</i>	<i>Vibrio marinus</i>
<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>Vibrio orientalis</i>
<i>Vibrio diazotrophicus</i>	<i>Vibrio salmonicida</i>

Entre las especies señaladas, aquéllas que fungen como patógenas para el ser humano son: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. metschnikovii*, *V.*

mimicus, *V. vulnificus*, *V. hollisae*, *V. cincinnatiensis*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. furnissi*, *V. alginolyticus* y *V. carchariae*, aunque por la gravedad y frecuencia de los padecimientos que ocasionan, las seis primeras son las de mayor relevancia (4 y 92).

Debido a que los vibrios se encuentran generalmente en forma libre, sobre todo en el mar, en el agua fresca y en los estuarios, o bien asociados a animales acuáticos, el humano se encuentra en constante riesgo de ser infectado por ellos, pudiendo adquirir enfermedades gastrointestinales, septicemia, e infecciones de heridas.

- **Microscopía**

Los miembros del género *Vibrio* son bacilos curvos de 0.5 a 0.8 μm de ancho por 1.4 a 2.6 μm de largo, aunque su forma original suele perderse en los cultivos viejos o cuando las condiciones de desarrollo les son adversas; cabe mencionar que, en algunas cepas, la curvatura es más pronunciada al inicio de la fase estacionaria que en la fase exponencial.

Se trata de microorganismos Gram negativos que poseen un flagelo polar de 24 a 30 ηm de ancho por 1.4 a 1.8 μm de largo, el cual les confiere una

gran movilidad; sin embargo, bajo ciertas condiciones de cultivo (como en los medios sólidos), pueden producir una mayor cantidad de flagelos más pequeños cuyo número varía desde unos cuantos hasta más de 100.

- **Propiedades culturales**

Los vibriones crecen en una gran variedad de medios de cultivo, figurando entre ellos la gelosa sangre, el agar TCBS, el caldo triptona y algunos otros.

La reproducción de todas las especies de vibrio es estimulada por el ion Na^+ aunque la concentración óptima de este último varía dependiendo de la especie: *V. cholerae* y *V. metschnikovii* desarrollan adecuadamente en rangos de 5 a 15 mM, mientras que *V. costicola* requiere hasta de 600-700mM.

V. cholerae tiene la capacidad de crecer en algunos otros medios tales como el TBM (Terrestrial Basal Medium), aún en ausencia de Na^+ ; no obstante, su tasa de reproducción se reduce en 50 a 80 % si se le compara con la observada bajo concentraciones adecuadas del mencionado catión. Algunas cepas de *V. metschnikovii* no desarrollan en caldo triptona al 1%

exento de NaCl; este medio se emplea como base para identificar a la cepa, de acuerdo con su tolerancia a dicha sal. Cabe tomar en cuenta que, en algunas especies halófilas de *Vibrio*, la concentración requerida de Na⁺ disminuye al adicionarse al medio Mg⁺⁺ (50mM) y Ca⁺⁺ (10mM) ya que, de esta manera, las proporciones de dichos cationes son muy similares a las contenidas en el agua de mar.

Los vibrios son bacterias muy versátiles, puesto que mientras algunos sólo llegan a manifestar capacidad para emplear doce compuestos orgánicos como fuente de carbón y energía, otros pueden utilizar hasta sesenta y siete sustancias, incluyendo pentosas, hexosas, disacáridos, azúcares ácidos, intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos, aminoácidos y compuestos aromáticos monocíclicos. De acuerdo con lo anterior, resulta complicado diseñar un único medio de cultivo en el que todas las cepas de vibrios puedan desarrollarse adecuadamente.

La temperatura óptima para la reproducción del género *Vibrio* fluctúa entre los 20 y los 37°C; la gran mayoría de las cepas toleran condiciones moderadamente alcalinas, por lo que crecen fácilmente a pH de 9, e inclusive, *V. cholerae* y *V. metschnikovii* lo pueden hacer a pH de 10. Los vibriones son microorganismos anaerobios facultativos capaces de llevar a

cabo ambos tipos de metabolismo, es decir, tanto el fermentativo como el respiratorio.

En cuanto a sus características macroscópicas, la morfología de las colonias de *Vibrio* coincide en casi todas las especies: son convexas, suaves y cremosas, de color blanco y con bordes regulares, si bien lo anterior puede variar, especialmente después de realizarse numerosos subcultivos. Un rasgo interesante de los vibrios marinos consiste en la producción de *swarming* en los medios sólidos, fenómeno que probablemente se relacione con la formación de células largas que presentan numerosos flagelos laterales, y con factores físicos y químicos tales como la temperatura y la concentración de agar (4 y 92).

- **Pruebas de identificación**

La realización de pruebas bioquímicas para efectuar la diferenciación y clasificación de estos microorganismos se basa en ciertas características fenotípicas de cada especie.

La tabla 2 presenta las principales pruebas empleadas en la diferenciación de las especies de *Vibrio* y la tabla 3 sólo incluye a las de mayor aplicación en los laboratorios clínicos (4).

Tabla 2. Pruebas diferenciales clave que permiten clasificar en seis grupos a las doce especies de *Vibrio* con mayor importancia clínica.

Grupo	Especies	Prueba									
		CN/ 0% NaCl	CN/ 1% NaCl	Ox	NO ₃ ⁻	Mio-inositol	ADH	LDC	ODC		
1	<i>V. cholerae</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	+	
	<i>V. mimicus</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	+	
2	<i>V. metschnikovii</i>	-	+	-	-	V	V	V	V	-	
3	<i>V. cincinnatiensis</i>	-	+	+	+	+	-	V	V	-	
4	<i>V. hollisae</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	
	<i>V. damsela</i>	-	+	+	+	-	+	V	V	-	
5	<i>V. fluvialis</i>	-	+	+	+	-	+	-	-	-	
	<i>V. furnissii</i>	-	+	+	+	-	+	-	-	-	
	<i>V. alginolyticus</i>	-	+	+	+	-	-	+	+	V	
6	<i>V. parahaemolyticus</i>	-	+	+	+	-	+	-	-	+	
	<i>V. vulnificus</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	V	
	<i>V. carchariae</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	

CLAVE: CN = Caldo nutritivo; Ox = Oxidasa; NO₃⁻ = Reducción de nitratos; ADH = Dihidrolasa de arginina; LDC = Descarboxilasa de lisina; ODC = Descarboxilasa de ornitina; + = ≥ 90 % positivo; - = < 10 % positivo; V (variable) = 10 a 89 % positivo.

Tabla 3. Diferenciación bioquímica de las especies de *Vibrio* aisladas a partir de muestras clínicas (92).

Pruebas	Especies de <i>Vibrio</i>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Producción de indol ^a	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
Rojo de metilo ^a	d	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Voges-Proskauer ^a	+	d	-	+	-	-	d	-	+	-	-	-
Citrato de Simmons	-	+	-	-	+	+	-	-	d	+	-	d
Desaminasa de fenilalanina	-	-	-	-	-	-	e	-	-	-	-	d
Lisina descarboxilasa ^a	+	+	+	d	-	-	+	-	d	+	+	+
Arginina dihidrolasa ^a	-	-	-	+	+	+	-	-	d	-	-	-
Ornitina descarboxilasa	d	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	d
Ácido de D-Glucosa	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+
Ácido de Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	+
Ácido de Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Ácido de D-Manosa	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+
Ácido de Trehalosa	+	+	+	+	+	+	d	-	+	+	+	+
Hidrólisis de Esculina ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	d
Reducción de nitrato ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
ONPG	-	+	+	-	d	d	-	-	d	+	-	d
Crecimiento en 1 % de NaCl	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Crecimiento en 6 % de NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en 8 % de NaCl	+	-	+	-	d	+	-	-	d	-	+	-
Producción de <i>swarming</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Sensibilidad a O/129	-	+	-	+	d	-	+	d	+	+	-	+

a = A este medio se le agrega NaCl a una concentración de 1 %; d = 11-89 % de las cepas son positivas; e = No hay crecimiento; + = 90 % o más de las cepas son positivas; - = 90 % o más de las cepas son negativas; 1 = *V. alginolyticus*; 2 = *V. cholerae*; 3 = *V. cincinnatiensis*; 4 = *V. damsela*; 5 = *V. fluvialis*; 6 = *V. furnissii*; 7 = *V. harvey*; 8 = *V. hollisae*; 9 = *V. meschnikovii*; 10 = *V. mimicus*; 11 = *V. parahaemolyticus*; 12 = *V. vulnificus*.

II. *Vibrio cholerae*

Este microorganismo es el agente causal del cólera, una enfermedad epidémica que ha matado millones de personas, la cual se adquiere por beber agua contaminada con heces humanas o por ingerir de alimentos lavados con agua contaminada y que desafortunadamente, aún continúa representando uno de los principales problemas mundiales de salud (26).

Vibrio cholerae ha logrado persistir en el ambiente debido a su capacidad para crecer tanto en agua salada como en agua dulce y afecta a los humanos porque puede colonizar el intestino y adaptarse fácilmente a las condiciones que imperan en él; de hecho, se adhiere a la superficie mucosa del intestino delgado y libera una exotoxina, denominada colerágeno, que actúa sobre el tejido implicado. Las células de la mucosa cuentan con un grupo de bombas de transporte iónico (para Na^+ , K^+ , Cl^- y HCO_3^-) que normalmente mantienen un hermético control sobre los flujos iónicos a través de la mucosa intestinal; como el agua puede pasar libremente a través de las membranas, la única manera para controlar el flujo hacia dentro y fuera de los tejidos es regulando las concentraciones de los iones en los diferentes compartimentos. Bajo condiciones normales, el flujo neto de iones es desde el lumen hacia los tejidos; el efecto de la toxina del cólera altera este balance y, aunque aparentemente no daña directamente a la mucosa, reduce el flujo neto de Na^+ hacia el tejido y

origina un flujo neto de Cl^- (y agua) del tejido hacia el lumen, dando lugar a una severa diarrea y a un desbalance electrolítico. Una persona con un cuadro severo de cólera puede perder 20 L diarios de agua diariamente. La materia fecal se encuentra tan diluida que en las evacuaciones pueden apreciarse claramente algunos restos de moco, lo que da la apariencia de “agua de arroz”. La pérdida de la plasticidad de la piel y los ojos hundidos de los enfermos representan una clara evidencia de la gran cantidad de agua perdida por los tejidos. No obstante, la consecuencia más seria de la pérdida de agua es el colapso del sistema circulatorio, que conduce a la muerte del enfermo. La enfermedad es autolimitante y se resuelve espontáneamente si las personas afectadas sobreviven a la fase aguda; ello determina la base de la más efectiva terapia contra el padecimiento: la restitución del agua y de los electrolitos (44 y 100).

Aunque en las epidemias la mortalidad suele ser alta, especialmente entre la población infantil, por lo general los sobrevivientes adquieren inmunidad por tiempos prolongados contra la reinfección; no obstante ello no evita que puedan transformarse en portadores durante contactos posteriores y, consecuentemente, que funjan como focos infecciosos que transmiten la enfermedad a personas susceptibles y/o que contribuyan a la contaminación de los suministros de agua (94 y 95).

Históricamente, el cólera se ha considerado como una enfermedad del “viejo mundo”, si bien las epidemias más recientes han ocurrido en la India y los últimos brotes se han presentado en América. Cabe señalar que su mortalidad ha sido baja en los últimos brotes debido, en parte, a cierto despliegue de organización en los países afectados. Esto demuestra que aún en los países pobres es posible establecer campañas efectivas para combatir padecimientos tales como el cólera, sin embargo, las movilizaciones no representan soluciones satisfactorias para resolver el problema, ya que son costosas, desvían la atención y los recursos destinados a otros problemas de salud pública y no salvan la vida de todas las víctimas del padecimiento (83 y 94).

Una adecuada solución consiste en construir y mantener correctamente los abastecimientos de agua, lo cual además protege contra otras diversas afecciones gastrointestinales. Aunque numerosos países se encuentran trabajando seriamente para lograr esta meta, no es posible soslayar que los abastecimientos seguros implican gastos importantes, particularmente en las áreas rurales, lo que rebasa la capacidad de las naciones pobres. Además, es necesario considerar que aún donde se cuenta con este tipo de abastecimientos, las “guerrillas” y los desastres naturales podrían destruir en el término de algunos días o semanas los sistemas de tratamiento de aguas negras cuya construcción requiere de varios años (94 y 95).

Puesto que en muchas partes del mundo se carece de abastecimientos seguros de agua, una alternativa secundaria puede ser la de desarrollar alguna vacuna segura, barata y efectiva; no obstante, aunque antes existía esta prioridad en la agenda mundial de salud, lo cierto es que el proyecto no ha recibido el apoyo necesario, quizá porque los países que podrían trabajar en él se autoconsideran libres de problemas de cólera. A este respecto, es evidente que la enfermedad no es común en los países desarrollados y que, por lo regular, sólo involucra a turistas que visitan las zonas de riesgo; sin embargo, es preciso tomar en cuenta que *Vibrio cholerae* persiste en el medio ambiente asociado a muchas partes del mundo, incluidas diversas áreas en donde no representa un problema de salud, por lo que en alguna coyuntura generada por guerras o desastres naturales ello podría traducirse en la aparición de epidemias situadas en regiones inexpertas en lo referente a la neutralización de sus devastadores efectos (92, 94 y 95).

Factores de virulencia

La continua búsqueda de una vacuna efectiva contra el cólera ha conducido al estudio de los factores de virulencia del agente causal; afortunadamente, los trabajos acerca de las bases moleculares de su patogenicidad han tenido diversos avances, debido en parte a que el microorganismo está cercanamente relacionado con *Escherichia coli*. De esta manera, varios descubrimientos recientes sobre la fisiología y genética de esta última especie han podido

aplicarse directamente al vibrión colérico; adicionalmente, éste ha resultado un excelente modelo para investigar la colonización bacteriana de superficies mucosas y los efectos de las toxinas en las células hospedadoras. No obstante, lo anterior no significa que ya se haya logrado una completa comprensión del cólera; de hecho, los estudios recientes sobre cómo actúa *V. cholerae* han revelado que su interacción con el hospedador es más complicada de lo que se pensó durante mucho tiempo. Hasta hace algunos años, se creía que el cólera era una enfermedad simple y bien entendida, y que el agente causal sólo contaba con flagelos, que le permiten desplazarse hacia la mucosa intestinal, pili, que promueven su adherencia al tejido “blanco” y una exotoxina (el colerágeno), que actúa sobre las células de la superficie mucosa produciendo una severa diarrea (4 y 95).

Recientemente, varios hallazgos han puesto de manifiesto otros eventos que sugieren un progreso de la enfermedad más complejo de lo que antes se señalaba: por ejemplo, los estudios sobre la regulación de la virulencia del microorganismo demuestran que éste presenta varios cambios cronológicos hasta lograr adaptarse a las condiciones que encuentra en su hospedador; evidentemente, si la simple colonización de la mucosa resulta verdaderamente complicada, es obvio que las respuestas de adaptación a las nuevas condiciones -parasitarias- y las relacionadas con la invasión no pueden ser sencillas. Por otra

parte, se ha comprobado que algunas cepas de *V. cholerae* producen otras toxinas adicionales al colerágeno y, aunque es incuestionable que esta última es la más importante, no se puede descartar la posibilidad de que otra exotoxina también juegue un papel relevante en el curso del cólera. Finalmente, ha reaparecido con mayor fuerza la duda de los autores acerca de porqué un parásito que aparentemente se beneficia colonizando las células intestinales de su hospedador, elabora y libera una exotoxina que provoca severos efectos de lavado intestinal que lo elimina de su hábitat natural y lo destina a un ambiente saprobio menos favorable para él (23).

Movilidad

V. cholerae posee un flagelo polar único que lo posibilita a desplazarse hasta las células “blanco” del intestino delgado, según lo demuestra el hecho de que mutantes inmóviles resultan muy poco virulentas, en comparación con las cepas silvestres. Cabe mencionar que aún se desconocen los fundamentos sobre la atracción de tipo químico (quimiotaxis) que establecería la dirección del desplazamiento del microorganismo hacia las células “blanco”, si bien existe consenso acerca de que ello ocurre con base en algunas sustancias de desecho liberadas por la mucosa del intestino delgado (4).

Adherencia

Incuestionablemente, largos filamentos pilosos forman espesas envolturas bacterianas que permiten al vibrión colérico adherirse a sus células “blanco”. Dichos pili se han denominado pili Tcp (por *toxin co-regulated pili*), debido a que los genes que codifican para su síntesis son regulados de manera muy similar a como ocurre en los implicados en la elaboración del colerágeno (13, 29 y 105).

Importantes estudios realizados en voluntarios humanos han demostrado que las cepas mutantes carentes en pili Tcp son avirulentas. Sin embargo, no se ha logrado avanzar en el conocimiento de cómo es la interacción entre dichas adhesinas del microorganismo y las células “blanco”, persistiendo la duda de cuáles son sus receptores en éstas; sólo se ha establecido que la subunidad de los pili Tcp comparte una considerable secuencia de aminoácidos con los pili tipo “N-metilfenilalanina”, de los cuales se ha encontrado que se modifican después de la traducción pero antes del ensamble de los péptidos, aunque se desconoce la razón de esta característica.

En realidad, la mayor parte de las investigaciones sobre los pili Tcp se ha concentrado en la organización y regulación de los genes implicados en su producción, así como en el proceso de su elaboración y ensamble. Los genes

necesarios para la producción de los pili Tcp se encuentran organizados en un racimo que contiene quince genes; uno de ellos, el *tcpA*, codifica para la síntesis de la subunidad principal de pilina TcpA, responsable principal de la adherencia del vibrión a las células “blanco”; el *tcpB* podría codificar para la proteína estructural de un *pilus* más pequeño cuya relevancia en la adhesión es aparentemente menor o nula; otros tres genes se relacionan con la regulación de la expresión de los dos anteriores y, al menos cuatro más, se asocian a la secreción y ensamble de los péptidos sintetizados: por ejemplo, el gene *tcpC* codifica para una proteína de membrana externa cuya función aún se desconoce y el *tcpJ* lo hace para la síntesis de una peptidasa que escinde la secuencia “señal” amino-terminal de la subunidad TcpA previamente excretada. Finalmente, el gene *tcpG*, localizado en una porción externa del racimo -de los quince genes-, parece codificar para una proteína “chaperona” que ayuda a ensamblar los péptidos producidos, como parte de la maquinaria normal para secreción y ensamble de las proteínas destinadas al periplasma o a la membrana externa (entre las que también se cuentan la fosfatasa alcalina, las β -lactamasas y las porinas) (13, 29, 58 y 105).

Por su parte, otras proteínas que posiblemente desempeñen el papel de adhesinas de *V. cholerae* podrían ser las siguientes: la denominada hemaglutinina y las que son codificadas por los genes *acf* (accessory

colonization factor). En cuanto a la primera, se ha demostrado ampliamente que las hemaglutininas detectadas en otras bacterias patógenas representan importantes factores de colonización; por lo que se refiere a las proteínas Acf, éstas se localizan sobre la membrana externa del microorganismo y se piensa que podrían resultar trascendentales en la colonización, ya que se ha observado que las mutantes carentes en *acf* muestran una capacidad considerablemente más reducida para adherirse al tracto intestinal de los animales de laboratorio. Como es sabido, algunas bacterias producen y emplean múltiples adhesinas para evadir la respuesta inmune del hospedador, e inclusive, otras sintetizan adhesinas no fimbriales para concretar uniones más estrechas a sus células “blanco” (8 y 94).

Proteasa Hap

V. cholerae secreta una proteasa dependiente de zinc y calcio, denominada originalmente mucinasa, que degrada a una gran cantidad de proteínas, incluyendo a la fibronectina, lactoferrina y a la propia toxina colérica; las cepas mutantes carentes del gen involucrado en su síntesis, denominado *hap* (por hemagglutinin-protease, ya que también actúa como hemaglutinina), son tan virulentas como las silvestres, de acuerdo con los estudios realizados en los modelos animales utilizados, entre los que destacan los conejos infantiles; es decir que, al parecer, dicha proteasa podría resultar intrascendente en la

colonización y lesión de las células intestinales, aunque ello no puede asegurarse plenamente, debido a que los conejos infantiles se consideran bastante más susceptibles que el humano a la acción patógena global del vibrión colérico (94 y 95).

En realidad, los expertos le reconocen a la proteasa Hap otro papel interesante, consistente en promover la separación bacteriana de las células a las que se había adherido previamente, cuando éstas son eliminadas de la mucosa por un proceso natural análogo a la descamación de la piel. Bajo tales condiciones, el microorganismo podrá desplazarse posteriormente, con base en su movilidad, hacia otra región vecina del tracto intestinal, a fin de adherirse a otras células “blanco” y persistir colonizando al hospedador (94 y 95).

La toxina del cólera

No existen dudas acerca de la importancia de la toxina del cólera como el principal factor de virulencia en las cepas productoras de la enfermedad, ya que las mutantes que no la sintetizan sólo ocasionan cuadros diarreicos comunes en voluntarios humanos. Dada su relevancia como factor de virulencia y su mecanismo de acción, dicha toxina ha sido intensamente estudiada a nivel bioquímico y genético, lográndose que su modelo sea uno de los comprendidos con mayor amplitud.

La exotoxina del cólera o colerágeno es una toxina del tipo A-B que presenta una subunidad A y cinco subunidades idénticas B; la primera pesa 27 kDa y, las segundas, 11.7 kDa. Los genes que codifican para la A (el *ctxA*) y las B (el *ctxB*) forman parte del mismo operón: una vez producidas, las subunidades A y B se secretan hacia el periplasma, donde se ensamblan, desconociéndose la manera en la que las moléculas ensambladas son liberadas hacia el exterior de la célula bacteriana, aunque se ha establecido que dicha eliminación requiere de la proteína TcpG, la “chaperona” que también participa en el ensamble de los pili Tcp. La producción de los pili Tcp y de la toxina del cólera es co-regulada a nivel transcripcional, y el hallazgo de que la proteína “chaperona” también actúa en la liberación del colerágeno abre la posibilidad de demostrar en el futuro que los dos procesos permanecen relacionados aún después de la transcripción (94 y 109).

La subunidad A no es enzimáticamente activa, sino hasta que se escinde para dar lugar a los fragmentos A1 y A2, previamente unidos mediante puentes disulfuro; al parecer, dicha activación ocurre cuando la toxina ha sido liberada fuera del vibrión (43 y 94).

La toxina excretada por *V. cholerae* se une a una célula de la mucosa intestinal, concretamente a sus receptores, los gangliósidos G_{M1} . Dichos gangliósidos corresponden químicamente a un lípido-ceramida unido covalentemente a un oligosacárido que contiene ácido siálico; el lípido se encuentra embebido en la membrana de la célula hospedadora cuya superficie expone al oligosacárido, mismo que representa el sitio de reconocimiento de la subunidad B del colerágeno.

Cabe subrayar que el gangliósido G_{M1} se encuentra en diversos tipos de células humanas y que otros tejidos también presentan gangliósidos muy parecidos, aunque con cadenas más largas de residuos de ácido siálico. En este sentido, es importante precisar que *V. cholerae* también produce una neuraminidasa (exoenzima también conocida como sialidasa), que elimina los residuos de ácido siálico de otros oligosacáridos más complejos, para hacerlos estructuralmente similares al G_{M1} ; ello sugiere que la neuraminidasa contribuye a la patogenicidad del microorganismo, incrementando el número de receptores disponibles para el colerágeno, aunque la virulencia de las cepas mutantes carentes de los genes que codifican para la síntesis de la enzima sólo disminuye en un 20 %, de acuerdo con estudios realizados en modelos animales (43 y 94).

Una vez que la toxina del cólera se ha unido al G_{M1} de la célula “blanco”, el fragmento A1 se separa de la molécula, debido aparentemente a la reducción del enlace disulfuro que lo mantenía unido al fragmento A2, e ingresa a la célula del hospedador por algún mecanismo aún desconocido de translocación. A este respecto, una hipótesis controversial establece que las cinco subunidades B se insertan dentro de la membrana de la célula “blanco” y forman un poro a través del cual atraviesa el fragmento A1; en realidad no se han encontrado señales de que la toxina ingrese o no dentro de vesículas endocíticas (por endocitosis) y, por otra parte, los estudios cristalográficos tampoco apoyan la mencionada teoría, que incluye la “posibilidad” de que la estructura de una molécula en solución (la toxina del cólera y, particularmente, la subunidad proteica B) pueda interactuar tan fácil y establemente con el ambiente hidrofóbico de la membrana de la célula del hospedador (54 y 72).

El fragmento A1 ADP-ribosila a diversas proteínas de la membrana de la célula hospedadora, pero especialmente a la que se le ha denominado G_s , ya que se trata de una de las GTPasas (o proteínas G) que regulan diversos aspectos en las células eucariotes. Las mencionadas GTPasas se constituyen por tres subunidades (G_α , G_β y G_γ) y el proceso de asociación-desasociación de ellas, acompañado por la hidrólisis del GTP, se traduce en la activación/inactivación de la proteína G que corresponda (72 y 94).

La Gs es la proteína G (o GTPasa) que regula la actividad de la adenilato-ciclase en las células hospedadoras, actuando como si se tratara de un proceso dependiente de hormonas y que, por lo tanto, determina el nivel de AMPc en dichas células. De hecho, la forma activa de Gs (unida a GTP) incrementa la actividad de la adenilato-ciclase, mientras que la forma inactiva (unida a GDP) rinde adenilato ciclase-inactiva.

En resumen, destaca la interesante función de la Gs como “prendedor-apagador” en las células intestinales: como respuesta a su estimulación por parte de algunas hormonas y unida a GTP o GDP, activa o desactiva a la adenilato ciclase, respectivamente, cuando se requiere o no, incrementar los niveles de AMPc (adenosinmonofosfato cíclico); esta última molécula desempeña fundamentales funciones regulatorias en las células eucariotes, pero su acumulación intracelular -en concentraciones relativamente elevadas- resulta muy perjudicial para el metabolismo tisular.

Dicha acumulación ocurre cuando el fragmento A1 del colerágeno ejerce su actividad enzimática, consistente en ADP-ribosilar a la proteína reguladora Gs, ya que de esta manera se provoca la activación permanente de la adenilato ciclase de la célula hospedadora (consultar el diagrama 1) (72 y 94).

La reacción global catalizada por la subA₁ de la toxina colérica es la siguiente:



Otras toxinas de *V. cholerae*

Aunque la toxina del cólera es incuestionablemente la más importante entre las producidas por *V. cholerae*, algunas cepas elaboran otras exotoxinas; inicialmente, lo anterior fue descubierto durante los primeros intentos realizados para desarrollar vacunas vivas a partir de mutantes del vibrión colérico capaces de sintetizar subunidad B pero no subunidad A; teóricamente, dichas mutantes resultarían excelentes vacunas, ya que contenían todos los antígenos necesarios para inducir una respuesta protectora de anticuerpos IgA y, adicionalmente, porque no provocarían síntomas a las personas al no liberar toxina colérica activa. Sin embargo, las pruebas realizadas en voluntarios humanos originaron diarrea y, aunque la sintomatología resultaba notablemente menos grave que el cólera, fue evidente que la especie producía otra(s) enterotoxina(s); ante dicha situación, se ha pensado en utilizar como vacuna a las cepas que sólo sinteticen colerígeno, empero, de cualquier manera deberá identificarse cuáles son todas las toxinas adicionales, para poder garantizar la seguridad del producto (94 y 95).

Hasta el momento se han detectado las toxinas adicionales ZOT y ACE. Al parecer, la ZOT destruye los delgados filamentos que unen a una célula de la mucosa con otra, preservando la continuidad del tejido intestinal; es la única toxina bacteriana a la que se le ha comprobado tal efecto; los delgados filamentos a los que se hizo referencia son tan efectivos que, inclusive, impiden la libre difusión de los iones entre los “espacios” que separan entre sí a las células de la mucosa; de hecho, ello es fundamental para que los iones sólo puedan ser transportados por bombas específicas para cada electrolito a través de la membrana celular y, por lo tanto, para que el flujo de iones y de agua a través de la mucosa pueda ser controlado y el organismo del hospedador retenga su agua. En tal sentido, la toxina ZOT interrumpe la continuidad entre las células de la mucosa, promoviendo la entrada de las sustancias intraluminales hasta regiones posteriores a la mucosa y, además, afecta el balance iónico originando diarrea (15 y 107).

Esta toxina descubierta recientemente se ha denominado ZOT, del inglés *zona occludens toxin*; el gene *zot* correspondiente se localiza inmediatamente después del operon *ctxAB*, pero no se ha logrado establecer si todas las cepas lo contienen ni si está corregulado por el *ctx* o por alguno otro gen asociado a factores de virulencia distintos del colerágeno.

Por lo que se refiere a la toxina ACE, su detección es aún más reciente, su nombre deriva de *accessory cholerae enterotoxin* y no se encuentra directamente relacionada con el colerágeno ni con la ZOT, aunque ocasiona diarrea en animales. Sin lugar a dudas, el descubrimiento de nuevas toxinas en *V. cholerae* evidencia la posibilidad de que el microorganismo pueda contar con otros factores de patogenicidad aún desconocidos; por otra parte, el hecho de que las diarreas ocasionadas por la ZOT y la ACE no sean tan graves como la debida al colerágeno tampoco descalifica a las primeras como probables partícipes en el cólera, en donde podrían desempeñar papeles importantes, incluida la etapa de colonización del intestino (15 y 107).

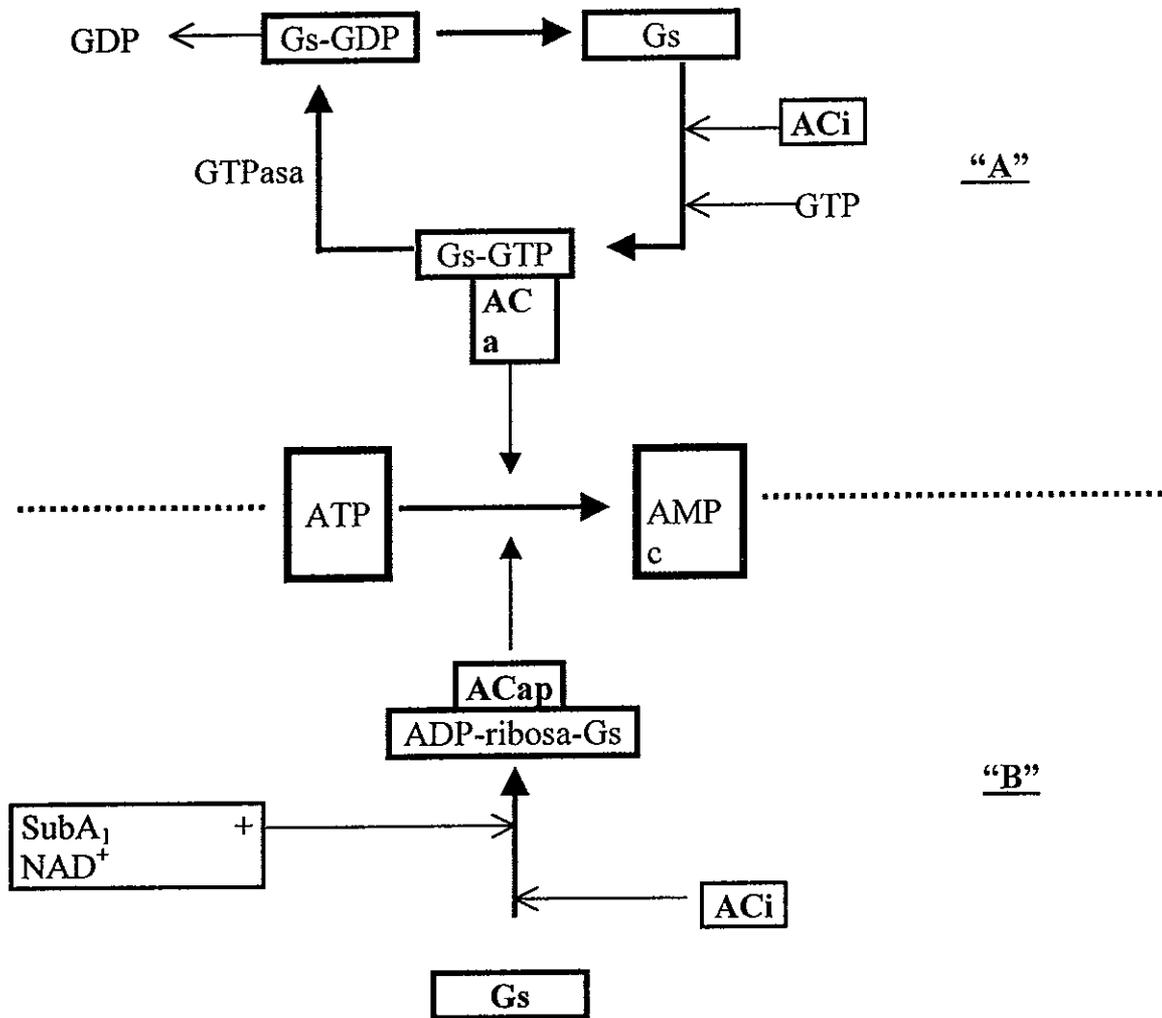
Genes de virulencia *ctx*, *ace* y *zot*

Como es bien sabido, no todas las cepas de *V. cholerae* producen la toxina colérica; a este respecto, es importante considerar que las cepas no toxigénicas carecen del operón *ctxAB*. Al parecer, los genes *ctxA* y *ctxB* se localizan en elementos genéticos móviles, muy probablemente en transposones, y sólo las cepas que adquieren a estos últimos elaboran colerágeno (52 y 85).

La inserción de los transposones aparenta ocurrir en sitios muy específicos del DNA porque los genes que codifican para el colerágeno generalmente son

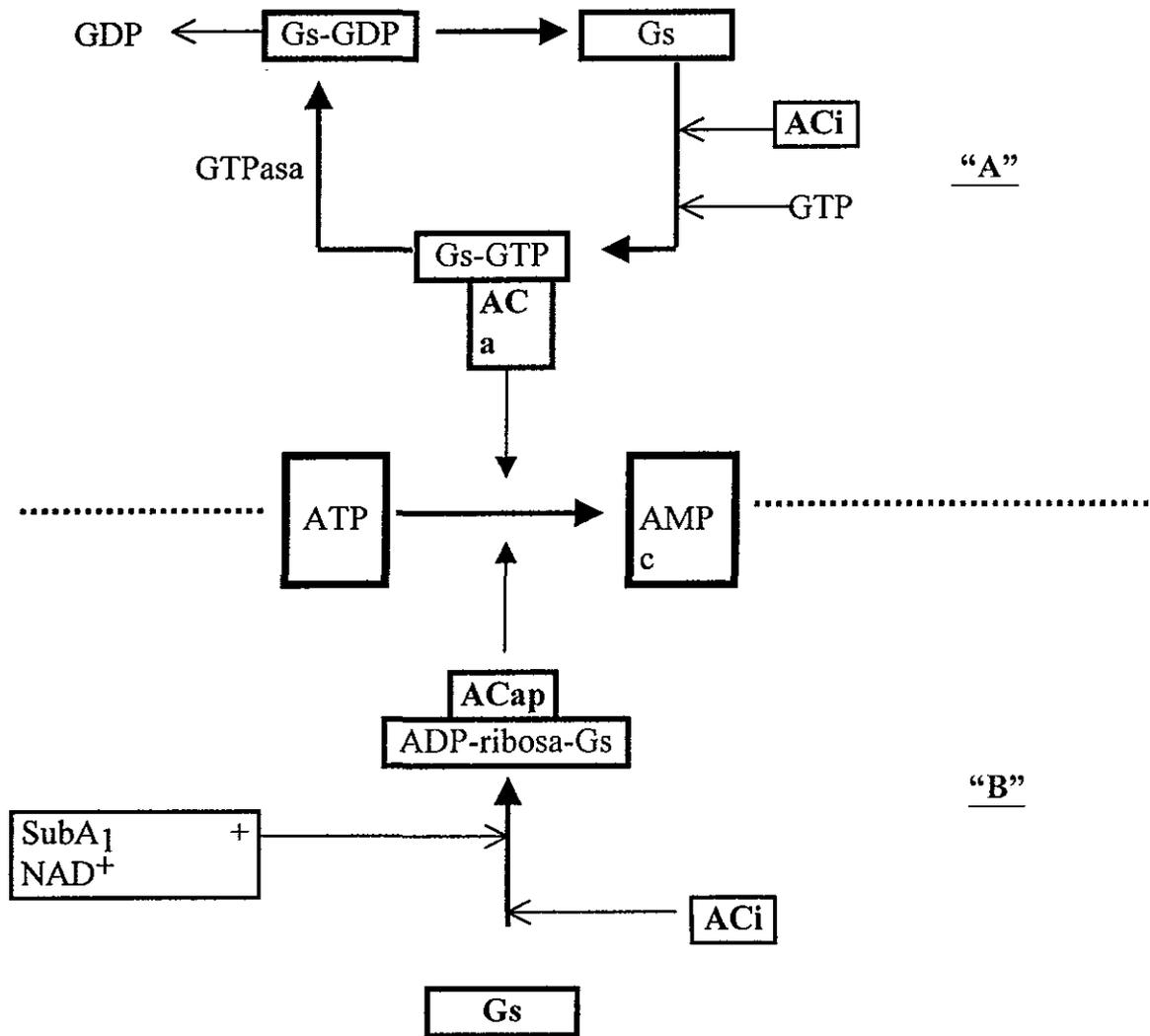
localizados en el mismo sitio del cromosoma; además, la razón de que unas cepas produzcan mayor cantidad de toxina del cólera que otras parece radicar en la duplicación del transposón que acarrea la región *ctx*, según lo observado en animales de experimentación. Finalmente, se ha descubierto que los genes *zot* y *ace* se encuentran muy cercanos al operón *ctxAB*, probablemente formando parte del mismo transposón que acarrea a este último; ello implicaría la existencia de un verdadero cassette de virulencia que se amplificaría durante el proceso infeccioso (52 y 85).

Diagrama 1. Producción de AMPc en las células intestinales: **A)** en condiciones de salud; **B)** bajo la influencia de la subA₁ de la toxina colérica.



CLAVES: GDP = guanosindifosfato; GTP = guanosintrifosfato; ACi = adenilato ciclasa inactiva; ACa = adenilato ciclasa activa; ATP = adenosintrifosfato; AMPc = adenosinmonofosfato cíclico; ACap = Adenilato ciclasa activada permanentemente; NAD⁺ = nicotinamida-adenosin-dinucleótido.

Diagrama 1. Producción de AMPc en las células intestinales: A) en condiciones de salud; B) bajo la influencia de la subA₁ de la toxina colérica.



CLAVES: GDP = guanosindifosfato; GTP = guanosintrifosfato; ACi = adenilato ciclasa inactiva; ACa = adenilato ciclasa activa; ATP = adenosintrifosfato; AMPc = adenosinmonofosfato cíclico; ACap = Adenilato ciclasa activada permanentemente; NAD⁺ = nicotinamida-adenosin-dinucleótido.

vómito y la diarrea -pudiendo o no haber una leve fiebre-, con evacuaciones blanquesinas que semejan agua de arroz; la intensa deshidratación origina que el paciente manifieste ojos hundidos, pómulos salidos, lengua seca y sarrosa, labios cianóticos y manos de lavandera. Cabe mencionar que, cuando el enfermo se encuentra bajo tratamiento hídrico, llega a evacuar entre 15 y 25 litros diarios de agua; ello da una idea muy cierta acerca de la agresividad del cuadro patológico (56, 59 y 68).

Algunos datos epidemiológicos

El cólera reapareció en América después de una ausencia de más de cien años, tocando tierra en Chancay, Perú, en enero de 1991; a partir de esta región se diseminó a través del Continente, llegando a México en junio del mismo año (23).

A diferencia de lo sucedido en pandemias anteriores, la actual tiene una letalidad de sólo 1 %, lo cual se debe a que el biotipo involucrado es El Tor que, en general, es más frecuente pero mucho menos virulento que el Clásico (56 y 81).

³ El fenómeno se conoce como choque hipovolémico debido al escaso volumen de sangre.

Si bien en la República Mexicana sólo se registraron -oficialmente- alrededor de 4,059 casos anuales en 1994, al año siguiente el problema creció de manera vertiginosa, ya que la cifra final fue de 16,430; ante tal problemática, se intensificaron las campañas de prevención y control, empleándose los medios masivos de comunicación, con lo cual el registro de 1996 disminuyó a 1,088 casos. Por lo que se refiere a 1997, la frecuencia de la enfermedad se incrementó a 2,356 casos, influyendo en cierta forma los desastres ocurridos en Guerrero y Oaxaca, con motivo del huracán Paulina (85, 91).

***V. cholerae* O139 Bengal**

Como se ha logrado establecer, no todas las cepas de *V. cholerae* causan cólera; de hecho, un relativamente pequeño número de ellas ha fungido como responsable de todos los principales brotes de la enfermedad, tal como se ha podido comprobar mediante los métodos disponibles para realizar la tipificación correspondiente (47).

Las cepas asociadas a epidemias que han rebasado las fronteras de los países afectados (las cuales por tal razón se han clasificado como pandemias), pertenecen a un mismo serogrupo, conocido como O1, mismo que incluye a los biotipos Clásico y El Tor; evidentemente, las cepas O1 comparten los mismos antígenos O, y todas producen la potente toxina del cólera y otros factores de

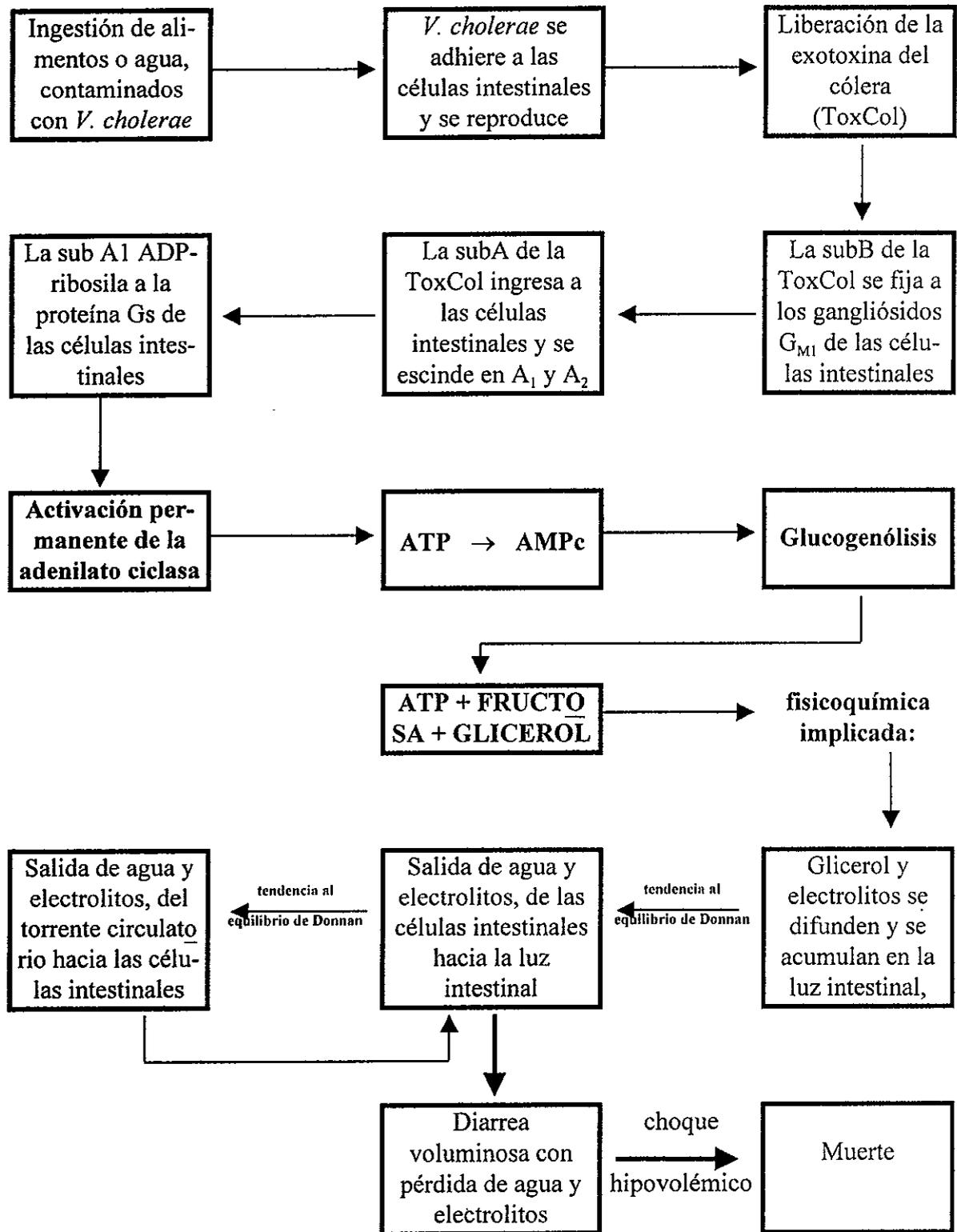
virulencia necesarios para provocar la severa y letal forma del padecimiento (92).

En realidad, la mayoría de las cepas de *V. cholerae* son no-O1 y generalmente se les considera como no patógenas o con capacidad sólo suficiente para dar lugar a cuadros diarreicos comunes. Las pruebas que se emplean para poder distinguir entre las cepas no-O1 y las que causan cólera revisten gran importancia en salud pública, ya que la especie *V. cholerae* se aísla con cierta frecuencia a partir de numerosas fuentes de agua (92 y 47).

Sin embargo, recientemente la clasificación de las cepas en O1 y no-O1 se está cuestionando de manera natural al encontrarse que un importante brote epidémico de cólera localizado en la India, pero que también se está extendiendo en Tailandia, se relaciona con una cepa no-O1, denominada *V. cholerae* O139 Bengal. Esta última no sólo posee los factores de virulencia para ocasionar el cólera sino que, además, ha mostrado mejores atributos para sobrevivir en diversas fuentes de agua que las pertenecientes al biotipo El Tor que, según los estudios efectuados en la zona, ha desaparecido en numerosas regiones endémicas. Los reportes indican que la cepa O139 se ha encontrado en diferentes muestras de agua recolectadas a lo largo de la India, en tanto que la cifra asociada a El Tor es de sólo 1 % (92 y 93).

Es conveniente subrayar que la O139 se está aislando a partir de numerosos pacientes que presentan los típicos signos del cólera y que posee las mismas características de los antiguos biotipos Clásico y El Tor que han ocasionado la severa forma de la enfermedad. De hecho, se señala con insistencia que los equipos de salud mundiales se encuentran en estado de alerta respecto a la O139, ya que existen serias posibilidades de que genere otra pandemia mundial de cólera (70 y 81).

Diagrama 2. Principales eventos implicados en la infección por cólera (23, 56, 59 y 68).



Características del agente causal

Vibrio cholerae es una bacteria Gram negativa que presenta forma de coma, tanto en su estado parasitario como durante los primeros cultivos *in vitro*, si bien después adquiere la morfología de bacilo recto, con aproximadamente 0.5 μ de ancho por 1.5 μ de largo; es muy móvil -merced a su flagelo polar único- y no produce cápsula ni espora. Asimismo, es facultativo, puede reproducirse entre los 6 y los 42°C (aunque su temperatura óptima es de 37°C) y, aunque su pH óptimo es cercano a 7, crece sin problemas a pH's alcalinos de hasta 9.5 (56).

Aunque ya se mencionó con anterioridad, es conveniente subrayar que existen cepas de *V. cholerae* que no ocasionan cólera, sino un síndrome diarreico común -menos grave-; en este sentido, la diferenciación correspondiente generalmente se basa en una simple reacción de aglutinación con un suero polivalente denominado anti-O1: las cepas que provocan el cólera aglutinan en presencia de dicho suero, a diferencia de las restantes (conocidas como cepas no-O1), aunque exceptuando a la de *Vibrio cholerae* O139 Bengal (81).

Las cepas de *Vibrio cholerae* O1 se subdividen en 2 biotipos: Clásico y El Tor, con base en diversas pruebas bioquímicas⁴; cada uno de dichos biotipos se divide en 3 serotipos: Inaba, Ogawa e Hikojima, dependiendo de las determinantes antigénicas presentes en su antígeno O (AgO) (56, 81 y 94).

Tabla 3. División de la especie *Vibrio cholerae*, en biotipos y serotipos

ESPECIE	BIOTIPOS	SEROTIPOS	
		Nombre	Det's Ag'icas ¹
<i>Vibrio cholerae</i>	Clásico	Inaba	AC
		Ogawa	AB
		Hikojima	ABC
	Eltor	Inaba	AC
		Ogawa	AB
		Hikojima	ABC

CLAVE: ¹= Determinantes antigénicas presentes en su antígeno O.

Diagnóstico del cólera en el laboratorio

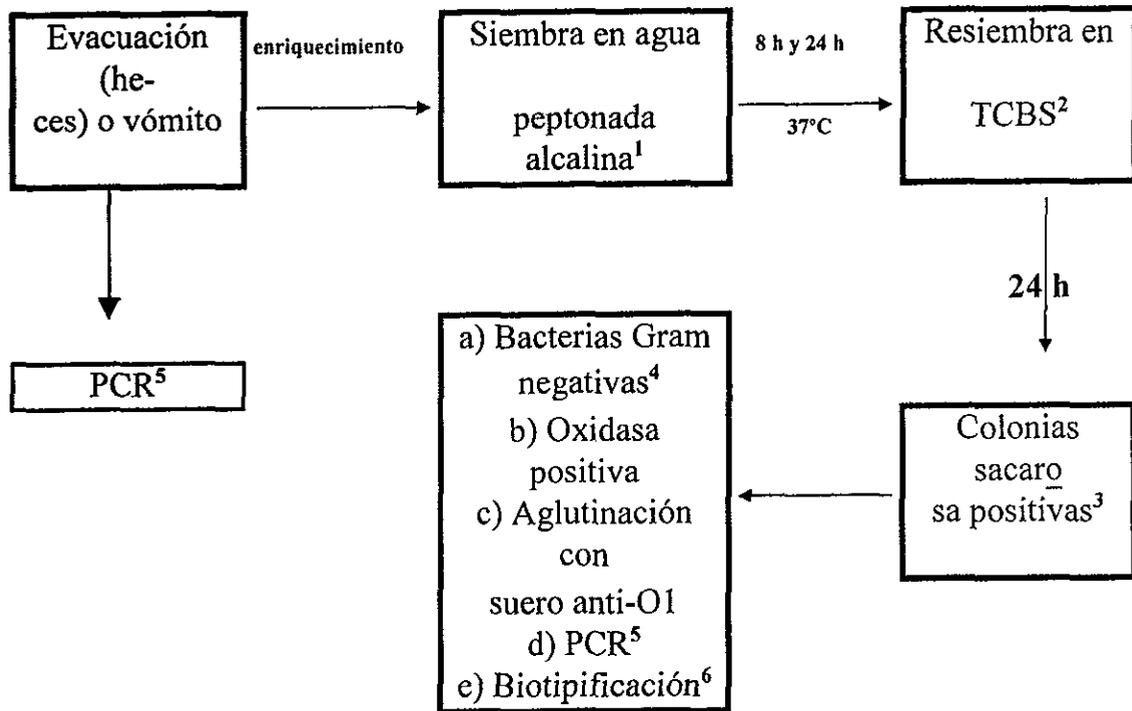
Dada la rapidez con la que el cólera evoluciona, en la mayor parte de los casos resulta impropio esperar el reporte del laboratorio para dar inicio al tratamiento; por tal motivo, éste se implementa con base en el diagnóstico clínico (signos y síntomas) y consiste en la administración de tetraciclinas u

⁴ Voges Proskauer, fermentación de manosa, ornitina descarboxilasa (ODC), lisina descarboxilasa (LDC) y Kligler (3).

otros antibióticos y la pronta restitución del agua y los electrolitos perdidos, por vía oral pero, principalmente, por vía endovenosa (56).

No obstante lo anterior, el cultivo de las muestras debe realizarse en todos los casos, a fin de aislar, identificar y tipificar a la cepa responsable, lo que sustenta los estudios epidemiológicos correspondientes. Los pasos más importantes en la identificación y tipificación de la especie se resumen en el diagrama 3.

Diagrama 3. Metodología implicada en la detección de *V. cholerae* en muestras clínicas (23, 24, 56, 81, 94 y 95).



CLAVE: ¹ = peptona al 1 % estéril ajustada a pH aproximado de 8.6; ² = Tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa; ³ = las colonias sacarosa positiva son de color amarillo, ya que el TCBS contiene indicador azul de bromotímol; ⁴ = los microorganismos se observan al microscopio, previa preparación de extensiones teñidas al Gram; ⁵ = reacción en cadena de la polimerasa; ⁶ = reacciones de aglutinación con sueros anti-B y anti-C.

Tratamiento

Puesto que el deceso de los enfermos es ocasionado por la gran pérdida de agua y electrolitos, la restitución de fluidos constituye la meta inmediata de la terapia; de hecho, en los pacientes que se encuentran conscientes y que no muestran síntomas de deshidratación extrema, resulta adecuada la rehidratación oral en volúmenes similares a los que son eliminados. Si bien el intestino delgado se encuentra afectado durante el padecimiento, ello es posible gracias a que el intestino grueso y el colon pueden absorber líquidos; no obstante, el problema consiste en que el organismo del hospedador pierde agua y electrolitos más rápidamente en relación con los que puede absorber; en este sentido, cuando se administran suficientes cantidades de líquidos, los volúmenes de agua se pueden mantener en niveles que permiten la sobrevivencia hasta la erradicación del microorganismo.

Evidentemente, la rehidratación oral incluye una solución preparada a base de sales y glucosa en agua; el agua sola no funciona, ya que las sales son indispensables para que se genere una adecuada osmolaridad y la glucosa estimula la absorción de las sales y el agua por parte de las células de la mucosa.

La mezcla de sales y glucosa se distribuye comercialmente en sobres sellados y sólo se requiere de agregar la cantidad adecuada de agua para ser administrada. Adicionalmente, en los países en los que se cuenta con antibióticos, estos últimos deben incluirse para apresurar la erradicación del microorganismo y, consecuentemente, para evitar la producción del colerágeno; sin embargo, es obvio que la diarrea persistirá hasta que las células intestinales afectadas sean eliminadas y sustituidas por células sanas. Por tal motivo, la rehidratación oral debe permanecer aún en presencia de antibióticos.

Los casos más graves de cólera son aquéllos en los que la enfermedad ha progresado hasta el grado de que el paciente entra en coma y muestra evidentes signos de una avanzada deshidratación; bajo dichas circunstancias, es indispensable la restitución de agua y electrolitos por vía intravenosa.

La búsqueda de una vacuna segura y efectiva

El primer intento que se recuerda para desarrollar una vacuna contra el cólera data de la década de los 1880's y consistió en bacterias completas muertas que se inoculaban directamente en el torrente circulatorio; dicho intento resultó infructuoso ya que no inducía protección contra la enfermedad. En realidad, se ha demostrado ampliamente la gran importancia de los anticuerpos IgA para prevenir el proceso infeccioso asociado al vibrión en el intestino, por lo que la

vía intravenosa no era la adecuada para aplicar la vacuna; adicionalmente, es preciso recordar que *V. cholerae*, como la mayoría de las bacterias Gram negativas, presenta una endotoxina en la pared celular, la cual también daba lugar a efectos colaterales indeseados.

En la actualidad, dicha vacuna presenta otra desventaja muy grave: en los países muy pobres, su aplicación podría provocar epidemias de SIDA, dada la carencia de jeringas-agujas suficientes que tratan de superar empleando el mismo equipo en numerosas personas.

Considerando todo lo anterior, la búsqueda de nuevas vacunas se ha enfocado en productos de administración oral que induzcan una adecuada respuesta de IgA en la mucosa intestinal; sobre este particular, cabe señalar que se encuentran bajo prueba dos vacunas orales en regiones con historias dramáticas de cólera.

La primera de tales vacunas se constituye por bacterias completas inactivadas, adicionadas de subunidad B purificada; su grado de protección se estima en más del 60 %, lo que supera enormemente lo logrado con otras vacunas previas; además, estudios más recientes que comparan la efectividad de dicha vacuna, con y sin subunidad B, han demostrado que no existen diferencias detectables;

esto último representa una buena noticia, ya que la adición de subunidad B incrementa notablemente los costos del producto. La principal desventaja de esta vacuna radica en que su grado de eficacia es menor en infantes y niños -que en los adultos-, lo que complica la situación, considerando que se trata de los grupos con mayores índices de letalidad.

Por lo que se refiere a la segunda vacuna oral bajo prueba, se trata de microorganismos vivos cuyo gene *ctx* ha sido inactivado mediante mutagénesis insercional, de manera que sólo se produzca la subunidad B. Los resultados iniciales sugieren un grado de protección cercano al 90 %, pero aún es necesario que el proyecto de experimentación finalice sin que se presenten situaciones adversas -lo cual llevará algunos años-, para asegurar que se ha encontrado la solución al problema, desde el punto de vista de su prevención. Al parecer, el fundamento de las buenas expectativas de esta vacuna se asocia al hecho de que *V. cholerae* interactúa con las células de la mucosa intestinal, pero también con las células M, lo que inicia el proceso que culmina en la presencia de concentraciones importantes de IgA en la mucosa.

III. *Vibrio parahaemolyticus*

El nombre de esta especie se relaciona con el hecho de que, desde que se identificó por primera vez (Fujino, 1950), sus colonias manifestaron una importante actividad hemolítica en placas de agar sangre; posteriormente, las investigaciones realizadas por Kato en el Laboratorio de Salud Pública de Kanagawa demostraron que si bien las cepas aisladas a partir de las heces de los enfermos presentaban dicha característica, ello no ocurría en las que se detectaban en las diversas fuentes de contagio para el humano (12, 27).

Los estudios realizados condujeron a asignar el nombre de “fenómeno de Kanagawa” a la peculiar hemólisis mostrada por el microorganismo en el agar de Wagatsuma; este medio se prepara de la siguiente manera: la porción basal (extracto de levadura, peptona, manitol, agar, cristal violeta y NaCl al 7 %), sin esterilizar, se divide en dos fracciones iguales que se mantienen a 50°C; en seguida, se agrega a la primera de ellas una suspensión de eritrocitos humanos al 20 % (frescos y lavados) en una proporción del 10 % V/V y, a la otra, se le adiciona el mismo volumen de glóbulos rojos de caballo. Ambas porciones se vierten en cajas de Petri y se permite que solidifiquen.

Para realizar la prueba de Kanagawa, se estría en ambas cajas una asada obtenida de un cultivo líquido previamente incubado durante toda la noche, las placas se incuban a 37°C y las lecturas se efectúan a las 18 y a las 24 h.

La reacción se considera Kanagawa positiva (KP+) cuando se presenta una clara zona de hemólisis beta alrededor del crecimiento del microorganismo inoculado en la caja que contiene eritrocitos humanos pero dicho fenómeno no ocurre en la placa con hematíes de caballo. Consecuentemente, una reacción Kanagawa negativa (KP-) es aquella cuya hemólisis en la caja con eritrocitos humanos es de tipo alfa, o bien, cuando ambos medios manifiestan hemólisis (86).

Es importante subrayar que diversas observaciones acerca del mencionado fenómeno, con otras cepas y variando el agar de Wagatsuma, permitieron concluir que la hemólisis de Kanagawa dependía de la cantidad de hemolisina producida por *V. parahaemolyticus* y de otras variables tales como el tipo de sangre empleada, la concentración de NaCl, el pH y la fuente de carbono disponible; por tal motivo, se llegó a cuestionar la confiabilidad de esta prueba para determinar si una cepa era patógena (17, 16, 67, 108).

En 1971, Ohara detectó una hemolisina termoestable presente en los filtrados de cultivos de las cepas KP+ y propuso que esta sustancia era la responsable del fenómeno Kanagawa; ese mismo año, Zen-Yoji logró aislarla a partir del cultivo líquido de una cepa KP+ (103, 121).

En 1973, Sakurai observó que la actividad hemolítica de dicha hemolisina termoestable producida por cepas KP+ no se activaba ni se incrementaba en presencia de lecitina y propuso denominarla “hemolisina termoestable directa (TDH)”, en virtud de que las hemolisinas indirectas requieren de la adición de fosfolípidos para generar zonas de hemólisis más grandes y mejor definidas (89).

La evidencia definitiva acerca de la importancia de la TDH en la enteropatogenicidad de *V. parahaemolyticus*, se obtuvo recientemente, en 1985, mediante el uso de cepas alteradas genéticamente y vía la realización de ensayos más sensibles. Nishibuchi y Kaper efectuaron estudios del gen *tdh* merced a los cuales pudieron demostrar que la TDH representa el principal determinante de virulencia en las cepas KP+ y, adicionalmente, que el fenotipo KP+ tiene origen en la expresión de un gen *tdh* muy específico. Estos hallazgos lograron establecer que el KP sí representa un buen indicador de virulencia.

El gen *tdh* en cepas de *V. parahaemolyticus*

Las interesantes investigaciones sobre el gen *tdh* en cepas KP+ y KP- de *V. parahaemolyticus*, han revelado lo siguiente:

- Todas las cepas KP+ contienen dos copias del gen *tdh* (*tdh1* y *tdh2*). La presencia de dicho duplicado sugirió inicialmente la posibilidad de que los productos de *tdh1* y *tdh2* eran necesarios para conformar una TDH funcional. Sin embargo, la producción de toxina con actividad biológica típica, sintetizada a partir de cada uno de los dos genes *tdh* -en forma individual- descalificó dicha propuesta; evidentemente, el análisis correspondiente se llevó a cabo clonando los genes *tdh1* o *tdh2* en cepas de *Escherichia coli* (47, 73, 74 y 102).

Finalmente, se sugirió como determinante la expresión preferencial del gen *tdh2*, a partir del estudio de dos cepas mutantes isogénicas KP+: una que carecía del gen *tdh1* y, la otra, libre del gen *tdh2*.

En conclusión se pudo conocer que el gen *tdh2* es el responsable del fenotipo KP+ y de la síntesis de más del 90 % de la estructura de la TDH, mientras que el gen *tdh1* sólo codifica para la producción del 0.5 a 9.4 % de la mencionada proteína.

- Algunas cepas de *V. parahaemolyticus* producen una débil hemólisis en el agar de Wagatsuma, debido a que sólo poseen una copia del gen *tdh* (73).
- La mayoría de las cepas KP- no tiene la capacidad genética para producir TDH, aún cuando algunas poseen el gen *tdh*; ello quizás ocurra porque el grado de expresión de dicho gen sea insuficiente, al no funcionar el operón Vp-TxRS, o bien, debido a fallas en la producción del RNAm a nivel basal (55).

El gen *trh* en *V. parahaemolyticus*

Investigando un brote de gastroenteritis en las Maldivas, se observó que las cepas involucradas eran KP-, productoras de una hemolisina diferente a la TDH aunque aparentemente “relacionada con ella” o TRH (del inglés thermostable direct hemolysin-related hemolysin); estudios adicionales han aportado mayor conocimiento acerca de ella: se constituye por 2 subunidades, su peso molecular es de 23, 000 Da, su punto isoeléctrico de 4.6, es lábil a temperaturas de 60°C durante 10 minutos y sus propiedades biológicas, inmunológicas y fisicoquímicas son similares a las de la TDH (35 y 37).

El análisis de 285 cepas de *V. parahaemolyticus* reveló que las cepas *tdh*+ ocasionaban gastroenteritis pero ello también ocurría con las *trh*; además, se observó que los aislamientos provenientes de muestras clínicas contenían ambos genes, *tdh* y *trh*, mientras que los obtenidos de fuentes ambientales no presentaban a ninguno de ellos (3, 49, 96 y 112).

La virulencia de la TDH

Como se ha señalado con anterioridad, la probada relación entre el fenómeno de Kanagawa y la patogenicidad de *V. parahaemolyticus* para el humano, estimuló la intensa búsqueda del factor que provocaba dicho fenómeno: en resumen, Kato (1966) purificó parcialmente una hemolisina con carácter termoestable cuya acción resultaba letal para ratones; Yanagase reportó que la hemolisina principal del microorganismo era una lecitinasa y la llamó fosfolipasa A; Fujino puso de manifiesto una hemolisina termolábil y finalmente, Misaki y Matsumoto detectaron la presencia de una lisofosfolipasa con poder hemolítico (61, 63, 90 y 121).

No obstante, de esas cuatro supuestas hemolisinas encontradas en *V. parahaemolyticus*, sólo se ha estudiado extensamente a la denominada TDH, lo cual explica la descalificación de otras toxinas que pudieran desempeñar algún

papel igual o similar en la patogenia relacionada con este microorganismo (39, 66, 89, 90, 103 y 121).

Propiedades fisicoquímicas de la TDH

La TDH purificada no presenta carbohidratos, lípidos, ni fosfatos y su espectro de absorción en el ultravioleta corresponde al de una proteína típica, con un máximo a 277nm y un mínimo a 250nm; su actividad hemolítica desaparece al ser expuesta a la acción de ciertas enzimas tales como la pepsina y la alfa-quimotripsina (39, 89, 102, 103 y 121).

Una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS origina la aparición de bandas con pesos moleculares diferentes, lo que muestra que está compuesta por dos subunidades de aproximadamente 21 000 Da cada una; Zen-Yoji, Honda y Miyamoto describieron su composición de aminoácidos y, en 1969, Miwatani detectó que exhibía el efecto Arrhenius, el cual se caracteriza por una pérdida de la actividad hemolítica al ser calentada a determinada temperatura y el secuencial recobro de dicha propiedad biológica al rebasarse la temperatura “crítica” (39, 62, 66 y 121).

De hecho, Takeda logró aislar un factor que neutralizaba la acción hemolítica de la TDH al someterla a 50-60°C durante 10 minutos y cuya acción

desaparecía a 80-90°C, permitiendo que la hemolisina recobrar su capacidad biológica central; lógicamente, concluyó que este factor era termolábil, muy probablemente de tipo proteico y responsable del efecto Arrhenius (101).

Propiedades biológicas de la TDH

- **Actividad hemolítica**

Zen-Yoji estudió el efecto que la TDH producía sobre los glóbulos rojos de varias especies animales y encontró que su eficacia decrecía en el siguiente orden: rata, perro, ratón, mono, hombre, conejo, cobayo, hasta ser prácticamente inexistente en el caballo (121).

Por su parte, Sakurai encontró que su actividad hemolítica variaba de acuerdo con la temperatura, resultando nula cuando ésta era baja; además, encontró que la lisis celular de los eritrocitos humanos, causada por la TDH, está mediada por cationes divalentes tales como Ca^{++} , Mn^{++} y Mg^{++} (103).

Takeshi descubrió que la hemólisis ocurría en varios pasos y que, entre estos, algunos eran dependientes de la temperatura: los primeros incluían la unión y la inserción de la TDH, al glóbulo rojo, así como la formación de un canal intramembranal; en cuanto a los últimos, comprenden a la turgencia y la lisis

del eritrocito (consultar la sección correspondiente a la citolisina de *V. metschnikovii*) (104).

- **Citotoxicidad y enterotoxicidad**

La TDH exhibe actividad citotóxica sobre diversos tipos de células cultivadas in vitro; entre dichas células destacan las HeLa, las L, las FL, las de neuroblastoma, las de miocardio y melanoma de ratón y las CCL-6 derivadas del intestino humano (30, 87, 88 y 103).

Ohara y Miyamoto analizaron los cambios histopatológicos ocurridos en el intestino delgado de ratones lactantes de 5 a 6 días de nacidos, inoculados por vía oral con TDH (mediante la utilización de una sonda); observaron que la administración de 50 µg provocaba diarrea y la ulterior muerte de todos los animales utilizados; cabe señalar que, al disminuir las dosis entre los 2 y 12.5 µg, sólo algunos ratones morían y los sobrevivientes se recuperaban totalmente de la diarrea (66 y 79).

A pesar de que la mucosa intestinal de los animales con diarreas provocadas por dosis relativamente pequeñas no presentaban cambios destructivos aparentes, los exámenes microscópicos mostraban la presencia de edema. Sin embargo, los ratones inoculados con grandes dosis (50 µg), antes de morir

experimentaban modificaciones muy evidentes en diferentes zonas de la mucosa intestinal.

Con base en lo anterior, tanto Ohara como Miyamoto concluyeron que la TDH es un factor muy importante en las gastroenteritis humanas debidas a *Vibrio parahaemolyticus* (66 y 79).

Buscando una mayor evidencia de la relevancia de la TDH en la enteropatogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus*, Nishibuchi y Kaper compararon a una cepa KP+ con su cepa mutante isogénica KP- cuyos genes *tdh1* y *tdh2* se encontraban inactivados. Los resultados mostraron que sólo la cepa KP+ provocaba la acumulación considerable de líquido en el asa intestinal ligada de conejo y ello se confirmó montando tejido intestinal de conejo en cámaras especiales para estudiar transporte de iones: al agregarse al sistema los filtrados de cultivos de las cepas TDH+ se producía un incremento notable de la corriente y ello no ocurría en el caso de las cepas TDH- (75 y 77).

A diferencia de los severos procesos destructivos que se presentaban al inocular grandes cantidades de TDH en el asa intestinal de conejo, los tejidos analizados en las cámaras de corriente no presentaban mayores alteraciones; esto se debía a

que en estos últimos experimentos se empleaban cantidades muy pequeñas de TDH (del orden de nanogramos) (77).

Es importante notar que estos últimos estudios proponen que los mecanismos de acción de la TDH incluyen la alteración del flujo iónico en las células del intestino, trastorno que provoca una respuesta secretoria con diarrea abundante, inducida por la excreción intestinal de cloro, mediada por calcio intracelular (75).

La capacidad de la TDH para estimular el flujo iónico también se ha comprobado en tejidos no intestinales tales como los de miocardio, eritrocitos de rata y hematíes humanos (42 y 75).

Cabe subrayar que aunque existen claras evidencias de que la TDH provoca la formación de poros en la membrana de los eritrocitos, en realidad este fenómeno no se ha logrado observar en células intestinales (38 y 42).

- **Toxicidad letal**

Honda reportó que las inyecciones intravenosas de TDH resultaban letales para ratones de 6 semanas: 5 μg eran suficientes para matarlos en un minuto; dicho tiempo se incrementaba a 20 minutos cuando se empleaban dosis de 1 μg y los

ratones inoculados sólo quedaban inmóviles, manifestando calambres cuando se utilizaban 0.5 µg (39).

Zen-Yoji investigó la toxicidad letal de la TDH en monos, observando que la inoculación directa de 5 y 10 mg de la toxina les provocaba una diarrea acuosa acompañada por la acumulación de exudado mucoide en el yeyuno; contrastando con lo anterior, 25 mg de TDH ocasionaban la muerte de los monos 5 a 10 h después de la inoculación.

Finalmente, el mismo investigador analizó diversas autopsias de individuos que fallecieron por afecciones provocadas por *Vibrio parahaemolyticus* y detectó una disminución marcada en el tono de la pared del intestino delgado y una gran cantidad de exudado mucoide sanguinolento (122).

- **Respuestas cutáneas en animales**

La aplicación intradérmica de la TDH en animales origina una respuesta característica diferente a la generada por el colerágeno: histopatológicamente, suelen aparecer edema, eritema e induración, alcanzándose el máximo de intensidad de las lesiones 8 h después de la inoculación. La dosis mínima de toxina que provoca una clara respuesta

cutánea en los cobayos es de 2.5 μg ; por su parte, el colerágeno requiere de 24 h o más, sobre todo en dosis de 10 ηg (66 y 122).

- **Cardiotoxicidad de la TDH**

Los estudios realizados inyectando TDH por vía intravenosa en animales susceptibles han permitido comprobar el carácter cardiotóxico de la toxina; evidentemente, se ha requerido de pruebas electrocardiográficas y del análisis de los efectos en corazones aislados perfundidos: Honda aplicó por vía intravenosa 15 μg de TDH a una rata de 445 g y, aunque el electroencefalograma no manifestó cambios significativos, el electrocardiograma correspondiente mostró un incremento de voltaje a los 13 segundos y el corazón del animal dejó de latir a los 33.5 segundos (36).

La cardiotoxicidad de la TDH se ha demostrado también en cultivos de células de corazón de ratón. Si el corazón fetal se disocia en sus células componentes (mediante la aplicación de tripsina) y éstas se cultivan en medio esencial mínimo de Eagle suplementado con suero fetal bovino al 10 % (a 36°C, bajo una atmósfera de 5 % de CO₂, y 59 % de aire) las células en cuestión laten a una velocidad de 10 a 260 pulsaciones por minuto.

Los efectos de la TDH purificada sobre un grupo de estas células de miocardio se pueden resumir de la siguiente manera: la adición de 0.05 $\mu\text{g/ml}$ al medio incrementa ligeramente el número de latidos, volviendo a la normalidad en 10 minutos; con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ el latido se estimula con rapidez pero se detiene súbitamente 1 minuto y, tras otros 5 minutos, se restablece con su velocidad normal permaneciendo sin cambio.

Análogamente, al adicionarse 0.2 $\mu\text{g/ml}$ de la TDH, el latido se incrementa, luego se detiene y, posteriormente, se restablece; sin embargo, el lapso entre la detención y el restablecimiento es más largo que cuando se adicionan 0.1 $\mu\text{g/ml}$. Con 1 $\mu\text{g/ml}$ o más, la situación varía notablemente: el latido se incrementa al principio y a continuación se detiene abruptamente, pero la mayoría de las células se desintegra muy pronto; sin embargo, una nueva adición de 0.1 a 0.2 $\mu\text{g/ml}$ de TDH antes de la mencionada desintegración, da como resultado que el latido se restablezca en unos cuantos minutos (36).

Goshima estudió el mecanismo de la degeneración celular causada por la TDH, encontrando que ésta provoca diversos cambios morfológicos a los cultivos de células de miocardio y de melanoma de ratón (cepa B-16CW1), en presencia de Ca^{++} extracelular; al parecer, la hemolisina incrementa la permeabilidad de las

membranas celulares hacia dicho catión que, además, cuando se encuentra extracelularmente en concentraciones elevadas ($\geq 10^{-6}$ M) fluye con gran rapidez hacia el interior de las células, de acuerdo con su gradiente electroquímico; a este respecto, la concentración de la forma libre intracelular del Ca^{++} es del orden de 10^{-7} M, en consecuencia, el cambio morfológico en las células del miocardio de ratón se debe principalmente a la contracción total de las miofibrillas (30).

IV. Vibrio metschnikovii

A pesar de que *V. metschnikovii* fue descrito por primera vez en 1888, esta bacteria se redefinió como una nueva especie del género *Vibrio* en 1978. Lee y asociados reportaron cepas de este microorganismo, al que aislaron a partir de muestras de ríos, estuarios, alcantarillados, coquinas (una especie de molusco), almejas, ostiones, langostas, de aves que murieron debido a una enfermedad parecida al cólera, e inclusive, de las heces fecales de humanos; no obstante, se carecía de suficientes evidencias acerca de su virulencia y, concretamente, de su papel como causante de gastroenteritis (53).

Hasta ese mismo año (1978), sólo se conocía un caso en el cual se había comprobado la patogenicidad de *Vibrio metschnikovii*: se trataba de una mujer negra con 82 años quien había sido admitida con vómito, debilidad y escalofríos, en el hospital Cook County de Chicago (41).

Su historia clínica indicaba que no padecía de diarrea ni dolores abdominales y no había viajado ni había consumido mariscos recientemente; además, presentaba diabetes mellitus controlada mediante dieta, hipertensión tratada con diuréticos, se encontraba deshidratada aunque alerta y orientada, tenía un pulso de 110, temperatura de 38.4°C y

presión arterial de 120/70; los ojos no manifestaban el color amarillo indicativo de ictericia.

Las radiografías, la química sanguínea y los exámenes de abdomen, piel y mucosas, no revelaron alteración alguna, salvo la presencia de nódulos calcificados en el cuadrante superior derecho del abdomen. Los dos cultivos de sangre efectuados el día de su admisión evidenciaron la participación de *V. metschnikovii* cuya identificación se llevó a cabo mediante cincuenta diferentes pruebas bioquímicas y de tolerancia al NaCl.

El tratamiento se basó en la administración de tobramicina y clindamicina y, al sospecharse de la perforación de la vesícula biliar, ésta fue extirpada exitosamente, por lo que la paciente fue dada de alta poco tiempo después.

De acuerdo con las probabilidades, se consideró que la paciente había adquirido al microorganismo tiempo atrás, al ingerir mariscos o agua de mar; finalmente, *V. metschnikovii* se había diseminado desde el intestino hasta la vesícula biliar y, a partir de ésta, se liberaba constantemente hacia la sangre (41).

En 1993, Hansen publicó dos casos en los cuales *V. metschnikovii* se asociaba a padecimientos humanos (32).

El primero incluía una defunción, previa septicemia, debido a infarto cardíaco; se trataba de un oficial retirado de 70 años, caucásico, admitido en el hospital St. Luc University, en Bruselas, Bélgica. Los signos y síntomas involucrados eran debilidad, dolor abdominal, diarrea, vómito, náuseas, vértigo y cefalea; por otra parte, el historial clínico indicaba que el paciente no había viajado con anterioridad a otras regiones geográficas ni había consumido mariscos y que era alcohólico, adicto a la nicotina, diabético insulino-dependiente, tenía una úlcera duodenal y, además, padecía de cirrosis, de insuficiencia renal, de problemas de coagulación y de trastornos pulmonares.

El individuo iniciaba su tratamiento con ampicilina intravenosa, glucosa perfundida al 5 %, diuréticos y aerosoles, pero falleció a los cuatro días. De los tres cultivos de sangre realizados el día de su admisión sólo uno resultó positivo, identificándose en él a *V. metschnikovii*.

El segundo caso también correspondía a un paciente de edad avanzada: una mujer de 82 años, caucásica, admitida en el hospital general del estado en Villefranche-sur-Saone, Francia. Sus signos principales eran debilidad y dificultad para respirar, sin diarrea ni dolores abdominales; su historial clínico no incluía viajes ni consumo de mariscos en fechas recientes, pero señalaba enfisema,

asma, úlceras cutáneas en una pierna, insuficiencia cardíaca hacía dos años, hipertensión y tanto derrame pleural como nódulos en el cuadrante derecho superior del pulmón.

En esta oportunidad, la terapia se instituyó a base de amoxicilina-clavulanato y tobramicina, realizándose paralelamente una punción en la pleura para que drenara durante una semana. El líquido extraído resultó estéril, pero uno de los tres cultivos de sangre evidenció la presencia de *V. metschnikovii*. Cabe mencionar que este microorganismo también se aisló a partir de las úlceras cutáneas, aunque acompañado por *Morganella moranii*, *Serratia marcescens*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae*. Por fortuna, la paciente se recuperó satisfactoriamente, abandonando el hospital al finalizar la tercera semana.

Evidentemente, la positividad de los hemocultivos de ambos enfermos propone a *V. metschnikovii* como agente causal de septicemia en pacientes geriátricos debilitados; sin embargo, Hansen no pudo establecer la fuente de contagio ni la vía de transmisión, aunque el hecho de que también encontrara al microorganismo en la lesión cutánea de la segunda persona, le permitió sugerir que la bacteria en cuestión haya ingresado a la sangre a partir de aquella herida (32).

las Vero y las de ovario de hámster chino, provoca la acumulación de líquido en el intestino de ratones pequeños y aumenta la permeabilidad vascular al inocularse en la piel de conejo (65).

En 1989, Miyake observó que su actividad lítica era dependiente de la temperatura y de la concentración de hematíes; adicionalmente, tratando de dilucidar su mecanismo de acción, probó los efectos que causaban diversos cationes divalentes sobre su capacidad citolítica (64).

En cuanto a sus estudios sobre la influencia de la temperatura, el autor incubó una mezcla de eritrocitos con citolisina a 4°C, a continuación lavó los hematíes con TBS (Tris-Buffered Saline), los suspendió e incubó a 37°C y observó que no ocurría la lisis celular; ello le permitió establecer que la unión de la citolisina a los eritrocitos podría ser temperatura-dependiente. Por otro lado, comprobó que la hemólisis a 37°C requería de sólo dos minutos y que, a 4°C, este lapso se incrementaba al doble; tales experimentos evidenciaron que el paso de lisis -en específico- también dependía de la temperatura.

Con respecto al papel de los diversos cationes, el investigador los dividió en dos grupos, considerando las dosis que provocaban un 50 % de

inhibición de la citolisina: el 1 se conformó por Cd^{++} , Cu^{++} , Ni^{++} , Sn^{++} y Zn^{++} y, el grupo 2, por Ba^{++} , Co^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} y Sr^{++} .

Secuencialmente, observó que los cationes del grupo 1 impedían la hemólisis pero, al retirarlos, ésta ocurría eficazmente; estudiando el fenómeno sugirió que la inhibición se debía a que dichos cationes interferían la formación de un tetrámero de la citolisina muy necesario en el proceso.

La liberación de hemoglobina hasta después de 20 minutos de incubación permitió detectar que la turgencia del eritrocito representa otra etapa que interviene en la lisis; a este respecto, se observó que la turgencia y, por lo tanto, el proceso lítico, puede ser inhibido por los cationes del grupo 2.

Tomando como base los hallazgos antes descritos, Miyake concluyó que la inhibición de la hemólisis, tanto por la temperatura como por los cationes del grupo 1, se debe a que ocurren alteraciones en la membrana, las cuales disminuyen la difusión lateral de la citolisina y, por ende, la formación del mencionado tetrámero; en cuanto a los cationes del grupo 2, la inhibición de la lisis se asocia al hecho de que aquéllos cierran los poros formados por la citolisina en la membrana eritrocítica, evitando la generación del flujo osmótico que origina la turgencia del glóbulo rojo.

En suma, la forma en que actúa la citolisina se puede resumir en los siguientes eventos:

1. Unión de la citolisina a la membrana del eritrocito (paso que depende de la temperatura).
2. Difusión lateral de la toxina unida (etapa que se puede inhibir con cationes del grupo 1).
3. Formación de un tetrámero de la citolisina y lesión del hematí (proceso que también se afecta por la temperatura).
4. Turgencia del eritrocito, al incrementarse el flujo de agua a través de poros o lesiones transmembranales debidos a la acción de la citolisina (efecto que se puede inhibir con cationes del grupo 2).
5. Liberación de la hemoglobina al destruirse el glóbulo rojo (64).

V. *Vibrio vulnificus*

V. vulnificus ha sido aislado a partir de una gran variedad de fuentes, entre las que destacan el agua, sedimento, plancton y conchas (de almejas, cangrejos y ostiones), principalmente en el Golfo de México, en las costas del Atlántico y en diversos lagos de Nuevo México y Oklahoma (69).

Esta especie ocasiona gastroenteritis e infecciones de heridas implicando, en estas últimas, procesos leves o muy graves que se manifiestan como celulitis y/o miositis; además, se trata del *vibrión* al que se le ha relacionado con mayor frecuencia como agente etiológico de septicemia primaria, sobre todo en pacientes que padecen de enfermedades crónicas previas, entre las que destacan las de carácter hepático (69).

Hollis y cols establecieron dos formas de infección por *V. vulnificus* observadas en humanos: en la primera, la bacteria ingresa por vía oral al hospedador, se establece en el intestino y pasa a la sangre; sin embargo, para que tenga lugar la septicemia, es necesaria la presencia de Fe^{++} libre y que el paciente muestre algunos factores predisponentes, tales como fallas en el sistema del complemento y defectos funcionales en el sistema retículo endotelial (6, 34, 111 y 120).

La segunda corresponde a un típico caso de celulitis debida a infección de heridas, en las que el tejido lesionado está en contacto con agua de mar; son relativamente frecuentes las laceraciones provocadas al limpiar moluscos para ingestión humana o al practicar la pesca (6, 34, 111 y 120).

Cabe señalar que la septicemia afecta principalmente a sujetos con enfermedad hepática, hemocromatosis, a los alcohólicos, diabéticos, a las personas con desordenes intestinales, y a quienes se encuentran inmunosuprimidos por tratamientos con corticosteroides o por padecer de cáncer o SIDA (21).

La tercera parte de los individuos que adquieren septicemia relacionada con la ingestión de mariscos crudos, ingresan al hospital en estado de shock y/o sufren de hipotensión cerca de 12 h después de ser internados. El 70 % presenta ampollas en la piel, coagulación disminuída, sangrado gastrointestinal, trompocitopenia, leucopenia y, ocasionalmente, leucocitosis.

Por otra parte, el 50 % de los pacientes con infecciones en heridas requieren de intervención quirúrgica o amputación, lo que refleja la virulencia del microorganismo.

De hecho, las tasas de mortalidad asociadas a *V. vulnificus* fluctúan entre 55 y

79 % y los sobrevivientes llegan a presentar complicaciones debidas a fallas en diversos órganos; la situación es aún más grave en los pacientes que sufren de hipotensión durante las primeras 24 h de hospitalización, ya que la tasa de letalidad alcanza el 90 % (21).

Identificado inicialmente como uno más de los *vibrios* marinos halofílicos lactosa positiva, *V. vulnificus* recibió su nombre en 1979; posteriormente, se dividió en dos biotipos, con base en la especificidad del hospedero, señalándose que el biotipo 1 era oportunista en humanos mientras el 2 sólo se había considerado –inicialmente- como patógeno para las anguilas (20).

Los estudios realizados sobre factores de virulencia en el biotipo 1 demostraron lo siguiente:

- La importancia de la cápsula: sólo las cepas opacas –únicas que presentan cápsula- son virulentas y pueden sobrevivir en el suero humano y en medios con cantidades restringidas de fierro.
- La producción de una citotoxina-hemolisina responsable del daño tisular.
- La correlación entre la disponibilidad de fierro en los fluidos corporales y la patogenicidad de la cepa (2).

Investigaciones similares se efectuaron con el biotipo 2, encontrándose que:

- La cápsula es esencial en la resistencia del microorganismo al efecto bactericida del suero humano, pero no impide la inhibición del crecimiento microbiano por parte de la transferrina humana (que actúa como agente quelante de hierro).
- El hecho de que las cepas translúcidas del biotipo 2 sean avirulentas para el humano y el ratón, muestra que la cápsula –casi ausente en cepas translúcidas– es necesaria para su patogenicidad en ratones pero no se requiere en el caso de las anguilas, lo cual pudiera deberse a diferencias que existen en los mecanismos de defensa de ambos hospedadores. Cabe mencionar que la necesidad de la cápsula para la sobrevivencia del microorganismo en el suero humano se demostró en presencia de hierro; lógicamente ocurrió el crecimiento de las cepas capsuladas.
- La producción de hemolisinas en agar sangre; como en el caso del biotipo 1, el 2 las sintetiza en condiciones carentes de hierro. De esta manera, la cepa está obligada a lisar los hematíes para utilizar la hemoglobina como nutriente y fuente de hierro.

- El microorganismo es capaz de producir sideróforos, para obtener hierro a partir de los agentes quelantes existentes en el organismo del hospedador (2).

Los resultados obtenidos también revelaron que el biotipo 2 es patógeno primario en las anguilas, con capacidad de infectar tanto a pescados como a ratones, y de manifestarse como oportunista en el humano (5).

El hecho de que no se hubiera aislado al biotipo 2 a partir de humanos pudo deberse a que las técnicas de identificación empleadas hasta antes del descubrimiento se basaban en la identificación de características que eran comunes a ambos biotipos (5).

En resumen, Amaro reportó que ambos biotipos comparten varios factores de virulencia, destacando la producción de cápsula, exotoxinas, proteínas (tanto intracelulares como de membrana externa) y sideróforos (2).

Adicionalmente, la síntesis de proteasas extracelulares por parte de *V. vulnificus*, le permite invadir los tejidos (hidrolizando elastina y colágena) en donde se encuentra la herida, provocando una necrosis severa local. Kothary detectó una proteasa con las siguientes propiedades: termolábil a 100°C durante 30 minutos, estable en el rango de pH desde 6 a 10 con un óptimo de 7 a 8, un punto isoeléctrico de 5.8 y un peso molecular de 50,500 Da (50).

Por su parte, Gray publicó la existencia de una citolisina fuertemente hidrofóbica, con un punto isoeléctrico de 7.1 y un peso molecular de 56,000 Da, constituida en su mayoría por aminoácidos y cuya capacidad de lisar eritrocitos es reducida en presencia de proteasas y colesterol. Su actividad citolítica es muy intensa sobre los hematíes de cerdo, mono, burro, gato, borrego, paloma y ratón; también evidencia actividad en cultivos de tejidos de células de ovario de hamster chino, es letal para ratones inoculados vía intravenosa en concentraciones de 3µg /Kg y provoca permeabilidad vascular al administrarse en piel de cerdo de Guinea (31).

La actividad de dicha citolisina también depende de la temperatura y de su concentración, siendo necesaria más de una molécula de ella para lisar un glóbulo rojo; al parecer, su mecanismo para lograr la hemólisis requiere de al menos dos pasos: uno de unión, independiente de la temperatura y, el segundo (temperatura-dependiente), en el que ocurre una perturbación del hematíe que conduce a su lisis (31).

Wright realizó estudios sobre la citolisina, originando la mutagénesis de un transposón que contiene los genes para su síntesis: inyectó en forma intravenosa e intradérmica la cepa alterada y sin alteración observando, al comparar la dosis media letal, que su inactivación no afectó la virulencia. Aunque ésto pudiera

sugerir que la función de la citolisina como factor de virulencia no es tan clara como la presencia de la cápsula, estos resultados pueden deberse a que no empleó los modelos animales adecuados para detectar su actividad (110).

En otro orden de ideas, *Vibrio vulnificus* posee la capacidad de producir dos tipos de sideróforos: hidroxamato y fenolato, los cuales le permiten crecer en condiciones donde el hierro no se encuentra libre; ambos actúan uniéndose a dicho metal, transportándolo hacia el interior de la célula bacteriana a través de la membrana lipídica (97).

Por último, este microorganismo libera al medio una fosfolipasa A₂ y una lisofosfolipasa; la primera se inactiva a 56°C durante 30 minutos y la segunda hasta los 100°C. Ambas tienen un peso molecular de 80,000 Da y difieren en cuanto a que la primera tiene un pI de 5 y la lisofosfolipasa de 4. Al parecer, juntas manifiestan una acción citolítica en los eritrocitos, aunque todavía no se establece su función en los padecimientos causados por *V. vulnificus* en el humano (106).

VI. Vibrio hollisae

Esta especie corresponde a uno de los vibrios aislados con menor frecuencia a partir de muestras clínicas, debido a su incapacidad de crecimiento en el medio TCBS (comúnmente empleado para efectuar el aislamiento de este género) y a la diferencia en cuanto a las pruebas bioquímicas implicadas; fue propuesto como nueva especie en 1982 y hasta posteriormente se le relaciona con varios casos de gastroenteritis y septicemia; asociados al consumo de mariscos crudos y a la aparición de diarrea, dolor abdominal y fiebre (11, 71 y 84).

En 1985, Nishibushi y colegas reportaron su capacidad para producir una hemolisina parecida a la de *V. parahaemolyticus*, con capacidad hemolítica sobre eritrocitos humanos, de conejo, del cerdo de Guinea y de ganso; otros rasgos encontrados incluyen su inactivación después de ser calentada durante 10 minutos a 70°C, su reacción cruzada con el suero anti-Vp-TDH, y un peso molecular y secuencias nucleotídicas similares a las del gen que codifica para la TDH (40, 78 y 116).

A pesar de lo anterior, la hemolisina de *V. hollisae* difiere de la TDH en su capacidad lítica sobre eritrocitos de gallina, borrego y carnero, así como en su movilidad electroforética (40, 78 y 116).

En 1988, al comparar las hemolisinas de *V. hollisae* con las de *Vibrio cholerae* no-01 y de *Vibrio parahaemolyticus*, Yoh encontró que la primera está formada por dos subunidades idénticas y, al igual que las dos últimas, su capacidad para lisar eritrocitos depende tanto del tiempo como de la temperatura, y posee la misma actividad letal sobre ratones (118).

Adicionalmente, encontró que la causa principal por la cual difieren en sus respectivos mecanismos para producir lisis y en sus estabilidades al calor; radica en sus diferencias en cuanto a las secuencias de aminoácidos constitutivos, hecho que también origina la aparición de distintas determinantes antigénicas (117 y 118).

Otras investigaciones realizadas por el mismo autor han demostrado que dicha hemolisina se produce tanto por cepas de *V. hollisae* ambientales como por las obtenidas a partir de casos clínicos, aunque la cantidad sintetizada difiere de un microorganismo a otro, siendo menor en las primeras; desafortunadamente, su estudio sólo analizó 7 cepas ambientales (119).

Otros factores de virulencia relacionados con *V. hollisae* son su adherencia e invasividad y la producción de aerobactina y de una toxina extracelular; las propiedades más relevantes de esta última fueron establecidas por Kothary: es

termolábil, sensible a proteasas, tiene un punto isoeléctrico de 6.5, su peso molecular varía entre 83,000 y 80,000 Da no presenta reactividad cruzada con la toxina del cólera y provoca la elongación de las células CHO sin que ocurra incremento alguno en la concentración de AMPc (51, 60 y 80).

VII. *Vibrio mimicus*

Esta especie fue descubierta por Davis en 1981 y representa una más de su género que se considera como patógeno importante para el humano, al que le ocasiona infecciones intestinales entre cuyos síntomas destacan diarrea, náuseas, vómito, calambres abdominales y fiebre (19).

Desafortunadamente, aún se desconocen la mayoría de sus factores de virulencia y, por ende, los mecanismos de acción asociados a ellos (19).

Yamamoto y cols purificaron y caracterizaron enterotoxinas de dos cepas de *V. cholerae* no 01, encontrando que ambas eran biológica e inmunológicamente indistinguibles de la toxina del cólera; Spira y cols, analizando dos cepas de *Vibrio mimicus*, 61892 y 63616, obtenidas de pacientes con diarrea en Bangladesh, detectaron la síntesis de enterotoxinas que también eran biológica, inmunológica y fisicoquímicamente idénticas a la toxina del cólera, excepto por el hecho de que eran secretadas sin la escisión proteolítica de la subunidad A; empero, dicha diferencia podría deberse al empleo de lincocín, sustancia utilizada para aumentar la producción de enterotoxinas (98 y 113).

Chowdhury llevó a cabo un análisis comparativo entre la enteropatogenicidad de 125 cepas ambientales y la de otras 19 obtenidas a partir de casos clínicos; encontró que menos del 1 % de las cepas ambientales y poco más del 10 % de las aisladas de casos clínicos producían una toxina parecida al colerágeno, por lo que concluyó que la producción de esta toxina es realmente rara (14).

Alam y colegas decidieron realizar un estudio para establecer los factores que intervienen en la virulencia de *V. mimicus* y cómo se conjugan estos para hacer que una cepa sea considerada virulenta o no. En su investigación emplearon 77 cepas ambientales, obteniendo los siguientes resultados:

- El 96 % (74) mostraron una considerable capacidad para adherirse a la mucosa intestinal de conejo; sólo 3 cepas carecían de esta propiedad.
- El 100 % provocó la aglutinación de eritrocitos de conejo, si bien el grado de hemaglutinación varió entre una y otra cepa.
- El 11 a 28 % produjeron una toxina parecida al colerágeno y resultaron positivas en la prueba de acumulación de líquido en el asa intestinal de conejo.
- El 80 % produjo sideróforos tales como el aerobactín, gracias a los cuales el microorganismo puede procurarse el hierro en el intestino del hospedador.

- El 95 % liberó proteasas y la tercera parte de ellas mostró una acción proteolítica muy intensa; además 60 de las 73 cepas productoras de proteasas lisaban eritrocitos de conejo.
- Más del 74 % de las que provocaban acumulación de líquido también eran fuertemente adhesivas y, de todas ellas más del 85 % provocaba hemaglutinación. Esta relación ya había sido reportada para *V. cholerae* por Yamamoto.
- No se observó relación alguna entre la producción de colerágeno, hemolisinas, sideróforos, proteasas y adherencia a la mucosa intestinal; de hecho, la carencia de hemolisinas y/o de toxina del cólera en algunas cepas patógenas sugirió la posibilidad de que existan otros factores de virulencia aún no detectados (1 y 115).

Ananthan analizó 18 cepas de *V. mimicus* provenientes de pacientes con diarrea y encontró que 15 liberaban toxinas termolábiles y 2 sintetizaban toxinas termoestables; dichos hallazgos se revelaron mediante el empleo del asa ligada de conejo (22).

Además, observó que los filtrados de los cultivos líquidos de 15 cepas manifestaban la presencia de factor de permeabilidad vascular al ser inoculados

en piel de conejos adultos. Finalmente, ninguna cepa resultó positiva a la prueba de Sereny, y todas evidenciaron propiedades citotóxicas en cultivos de células CHO y Vero.

Sanyal y cols detectaron en *V. mimicus* la producción de una toxina termolábil, estructural e inmunológicamente indistinguible del colerágeno, secretada al medio y sólo activa cuando sufría escisión proteolítica en la subunidad A.

Aunque se desconocen los mecanismos de excreción y de escisión de la toxina de *V. mimicus*, se considera probable que sean similares a los relacionados con el colerágeno; de acuerdo con observaciones realizadas en bacterias cultivadas *in vitro*, la escisión podría deberse a la producción de varias proteasas que recortarían la subunidad A antes de que la toxina fuera secretada; contrastando con ello, la acción proteolítica *in vivo* se debería a enzimas del fluido intestinal.

Anathan también reportó una hemaglutinina indiferenciable inmunológicamente de la producida por *V. cholerae* 01 y a la cual en esta especie se le reconoce algún papel en la patogénesis del cólera, debido a que actúa como mucinasa y como activadora de la toxina antes descrita.

Finalmente, el mismo autor reportó otra enterotoxina termoestable no relacionada con el colerágeno y dos cepas que mostraron ser invasivas en el epitelio intestinal de conejo (22).

En esa época, Fasano y cols demostraron que además de la toxina del cólera en *Vibrio cholerae* 01, el microorganismo también producía otra enterotoxina designada como *zonula occludens toxin* (ZOT), cuya función es la de aumentar la permeabilidad de la mucosa intestinal mediante la modificación estructural de las uniones intercelulares (15 y 25).

Posteriormente, Baudrano encontró que el gen *zot* se encontraba a un lado, (corriente arriba) del gen *ctx* y Karasawa reportó la presencia de un gen *zot* independiente de *ctx* en cepas de muestras clínicas y ambientales de *V. cholerae* (8 y 15).

Consecuentemente, Chowdhury y cols empezaron a buscar al gen *zot* en cepas de pacientes con diarrea causada por *V. mimicus*, encontrando que en la cepa E-33 este gen podría ser el causante de gastroenteritis; adicionalmente en 3 de 5 cepas seleccionadas también se encontró al gen *zot* y sólo una presentaba además al gen *ctx* (15).

La presencia del gen zot en cepas que también presentan el gen ctx hizo suponer que este último juega algún papel en la patogenicidad de *V. mimicus*; sin embargo, como el gen ctx se ha detectado en algunas cepas ambientales, se ha pensado en la posibilidad de transmisión entre las diferentes cepas (15).

En resumen, *V. mimicus* debe su nombre a que comparte diversos factores de patogenicidad con *V. cholerae*, la especie “tipo” del género, si bien la enfermedad intestinal provocada por la primera suele resultar menos grave y con menores tasas de mortalidad (16).

VIII. OTRAS ESPECIES DE *Vibrio* APARENTEMENTE PATÓGENAS PARA EL HUMANO

A continuación se describe brevemente el posible papel de otras seis especies de *Vibrio* aparentemente patógenas para el humano; aunque en el caso de algunas de ellas su virulencia podría considerarse como incuestionable, lo cierto es que aún se requiere que se lleven a cabo investigaciones más amplias para asegurar o descartar su importancia como agentes causales de enfermedades infecciosas o toxi-infecciosas en el hombre.

V. fluvialis

Esta especie fue aislada en Bangladesh a partir de más de 500 pacientes con diarrea, siendo clasificada, en un inicio, como un grupo semejante a *Vibrio* (*Vibrio*-like group) EF-6; sin embargo, posteriormente recibió el nombre de *V. fluvialis*, después de haberla sometido a rigurosos estudios de taxonomía numérica (99).

Este microorganismo se detectó en los Estados Unidos a partir de muestras de evacuaciones fecales de un paciente que falleció debido a su intenso síndrome diarreico y, tiempo después, en 1989, se determinó como el agente causal de la

enfermedad intestinal de siete pacientes que vivían en las costas del Golfo de México, tres de los cuales requirieron de hospitalización.

Por otra parte, *V. fluvialis* fue aislado a partir de la sangre de una persona cuya septicemia también era causada por *Shigella sp*; desafortunadamente, este caso concluyó con el deceso del paciente (99).

V. furnissii

El origen de esta especie se remonta al aislamiento de varias cepas de *V. fluvialis* (1983) que producían gas a partir de glucosa; al someterlas a pruebas de hibridación con DNA se dió lugar a la especie *V. furnissii*. Ésta se logró aislar a partir de las evacuaciones de diversos pacientes con gastroenteritis aguda, aunque su papel como el agente etiológico no se pudo establecer con claridad (10).

Por otra parte, *V. furnissii* también se detectó junto con *V. fluvialis* en las muestras fecales de un infante de sólo un mes de nacido, mismo que curó sin tratamiento alguno (10).

V. alginolyticus

Este microorganismo ha sido aislado a partir de muestras clínicas de infecciones en oído, conjuntivitis, invasión craneana e infecciones de heridas originadas por quemaduras o por simple exposición a agua contaminada (69).

De hecho, las cepas de *V. alginolyticus* con que cuenta la colección del CDC (Center for Diseases Control) en Atlanta, Georgia, provienen en su totalidad de oídos infectados; en resumen, esta especie se ha obtenido de regiones extraintestinales, por lo que se considera que no funge como agente etiológico de diarrea (69).

V. damsela

Se denominó de esta manera en 1981, cuando se le encontró como la causa de úlceras superficiales en la hembra del pez *Chromis punctipinnis*. Sólo se ha asociado a infecciones de heridas: seis cepas designadas inicialmente como EF-5 en el CDC fueron aisladas de procesos cutaneos en personas aparentemente sanas -en relación con la carencia de otros signos y síntomas-; cinco de dichos casos correspondían a personas que habían tenido contacto con agua salada y el sexto individuo había sufrido de una herida en la mano al cortar filetes de pescado (71).

V. damsela ha sido reportada como la causa de una infección necrosante rápidamente progresiva y produce una citolisina letal para el ratón que es diferente a las liberadas por *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* y *V. cholerae*. Además, se aisló de una herida fatal infectada y los estudios realizados mostraron la existencia de dos fenotipos hemolíticos diferentes, uno de los cuales inhibía la hemólisis ocasionada por *Staphylococcus aureus* (71).

V. cincinnatiensis

Este microorganismo se detectó en la sangre y el líquido cefalorraquídeo de un individuo de aproximadamente 70 años de edad que padecía de meningitis. El paciente no declaró algún contacto con agua de mar ni consumo reciente de mariscos y curó completamente merced a una terapia instituida a base de Moxalactam (7 y 9).

V. carchariae

Esta especie se aisló en Grecia, a partir de una herida infectada ocasionada a un niño que recibió una mordida de tiburón (82).

IX. CONCLUSIONES

1. Los principales factores de virulencia de *V. cholerae* son su movilidad, adherencia, la proteasa Hap, la neuraminidasa, la toxina ZOT y el colerágeno; este último es el de mayor importancia en los cuadros deshidratantes clásicos y actúa provocando la activación permanente de la adenilato ciclasa de las células intestinales.
2. La actual epidemia americana de cólera es ocasionada por el biotipo El Tor, que si bien es más frecuente que el biotipo Clásico, no es tan virulento; de hecho, sus tasas de mortalidad fluctúan alrededor del 1 al 3%.
3. En los años más recientes, se ha comprobado que una nueva cepa de *V. cholerae* no-01, denominada 0139 Bengal, está desplazando por su mayor frecuencia a los biotipos Clásico y el Tor, sobre todo en la India y Tailandia. A este respecto, las autoridades mundiales de salud se encuentran en estado de alerta, ya que en breve dicha cepa podría provocar la octava pandemia mundial de cólera.
4. *V. parahaemolyticus* causa severos cuadros diarreicos por consumo de mariscos y otros alimentos no cocidos de origen marino; la hemolisina

termoestable directa (TDH) es su toxina más relevante: es citotóxica, enterotóxica y cardiotóxica, y letal para animales de experimentación.

5. *V. metschnikovii*, *V. mimicus*, *V. hollisae* y *V. vulnificus* ocasionan cuadros gastroentéricos; además, las dos últimas especies también se relacionan con otros padecimientos tales como infecciones de heridas y septicemia.

X. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Alam, M., Miyoshi, S., Yamamoto, S., Tomochika, K., and Shinoda, S.: Expression of virulence-related properties by, and intestinal adhesiveness of, *Vibrio mimicus* strains isolated from aquatic environments, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996; 62(10):3871-3874
- 2 Amaro, C., Biosca, E. G., Fouz, B., Toranzo, A. E. and Garay E.: Role of Iron, Capsule, and Toxins in the Pathogenicity of *Vibrio vulnificus* Biotype 2 for Mice, *Infect. Immun.*, 1994; 62(2):759-763.
- 3 Baba, K., Shirai, H., Terai, A., Takeda, Y., and Nishibuchi, M.: Analysis of the *tdh* gene cloned from a *tdh* gene-positive strain of *Vibrio parahemolyticus*, *Microbiol. Immunol.*, 1991; 35:253-258.
- 4 Baumann, P., Furniss, A. L., and Lee, J. V. : Genus *Vibrio*, Pacini, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Williams and Wilkins, Co., Baltimore, 1984; 518-538.
- 5 Biosca, E. G., Marco-Noales, E., Amaro C. and Alcaide E.: An Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Detection of *Vibrio vulnificus* Biotype 2: Development and Field Studies, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997; 63(2):537-542.
- 6 Blake, P. C., Merson, M. H., Weaver, R. E., Hollis, D. G. and Heublein, P. C.: Disease caused by a marine vibrio. Clinical characteristics and epidemiology, *N. Engl. J. Med.*, 1979; 300:1-5.

- 7 Bode, R. B., Brayton, P. R., Colwell, R. R., Russo, F. M., and Bullock, W. E.: A new *Vibrio* species, *Vibrio cincinnatiensis*, causing meningitis: Successful treatment in an adult., *Ann. Int. Med.*, 1986; 104(1):55-56.
- 8 Bondre, V. P., Sriwastava, R., Sinha, V. B., and Srivastava, B. S.: Screening of TnpHoA mutants of *Vibrio cholerae* 0139 for identification of antigens involved in colonisation., *J. Med. Microbiol.* 1997; 46(12):1007-1011.
- 9 Brayton, P. R., Bode, R. B., Colwell, R. R., MacDonell, M. T., Hall, H. L., Grimes, D. J., West, P. A., and Bryant, T. N.: *Vibrio cincinnatiensis* sp. Nov., a new human pathogen., *J. Clin. Microbiol.*, 1986; 23(1):104-108.
- 10 Brenner, D. J., Hickman-Brenner, F. W., Lee, J. V., Steigerwalt, A. G., Fanning, G. R., Hollis, D. G., Farmer, J. J., Weaver, R. E., Joseph, S. W., and Seidler, R. J.: *Vibrio furnissii* (formerly aerogenic biogroup of *Vibrio fluvialis*), a new species isolated from human feces and the environment., *J. Clin. Microbiol.*, 1983; 18(4):816-824.
- 11 Carnahan, A. M., Harding, J., Watsky, D., and Hansman, S.: Identification of *Vibrio hollisae* associated with severe gastroenteritis after consumption of raw oysters, *J. Clin. Microbiol.*, 1994; 32(7):1805-1806.
- 12 Colwell, R.R.: Occurrence and Biology of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology*-D. Lschlessinger, Ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C., 230-240, 1975.

- 13 Chiang, S. L., and Mekalanos, J. J.: Use of signature-tagged transposon mutagenesis to identify *Vibrio cholerae* genes critical for colonization., *Mol. Microbiol.*, 1998; 27(4):797-805.
- 14 Chowdhury, M. A. R., Aziz, K. M. S., Kay, B. A., and Rahim, Z.: Toxin production by *Vibrio mimicus* strains isolated from human and environmental sources in Bangladesh, *J. Clin. Microbiol.*, 1987; 25(11):2200-2203.
- 15 Chowdhury, M. A. R., Hill, R. T., and Colwell, R. R.: A gene for the enterotoxin zonula occludens toxin is present in *Vibrio mimicus* and *Vibrio cholerae* 0139., *FEMS Microbiol. Lett.*, 1994; 119:377-380.
- 16 Chun, D., Chung, J. And Tak, R.: Some Observations on Kanagawa Type Hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Int. Symp. On Vibrio parahaemolyticus*, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, Eds., Saikon Publ., Co., Tokyo, 199-204, 1974.
- 17 Chun, D., Chung, J., Tak, R. And Seol. S.: Nature of the Kanagawa Phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun.*, 12 (1): 81-87, 1975.
- 18 Dalsgaard, A., Alarcon, A., Lanata, C. F., Jensen, T., Hansen, H. J., Delgado, F., Gil, A. I., Penny, M. E. and Taylor, D.: Clinical manifestations and molecular epidemiology of five cases of diarrhoea in children associated with *Vibrio metschnikovii* in Arequipa, Peru, *J. Med. Microbiol.*, 1996; 45(6):494-500.

- 19 Davis, B. R., Fanning, R. G., Madden, J. M., Stegerwalt, A. G., Bradford, H. B., Smith, H. L., and Brenner, D. J.: Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*, J. Clin. Microbiol., 1981; 14(6):631-639.
- 20 Devi, S. J., Hayat, Frasc, C. E., Kreger, A. S. and Morris, J. G.: Capsular Polysaccharide- Protein Conjugate Vaccines of Carbotype 1 *Vibrio vulnificus*: Construction, Immunogenicity, and Protective Efficacy in a Murine Model, Infect. Immun., 1995; 63(8):2906-2911.
- 21 Devi, S. J., Hayat, U., Powell, J. L. and Morris, J. G.: Preclinical Immunoprophylactic and Immunotherapeutic Efficacy of Antisera to Capsular Polysaccharide-Tetanus Toxoid Conjugate Vaccines of *Vibrio vulnificus*, Infect. Immun., 1996; 64(6): 2220-2224.
- 22 Dotevall, H., Jonson-Strömberg, G., Sanyal, S., and Holmgren J.: Characterization of enterotoxin and soluble hemagglutinin from *Vibrio mimicus*: identity with V. cholerae 01 toxin and hemagglutinin., FEMS Microbiol. Lett., 1985; 27:17-22.
- 23 Falklind S., Stark M., Albert M.J., Uhlen M., Lundeberg J. and Weintraub A.: Cloning and sequencing of a region of a *Vibrio cholerae* O139 Bengal and its use in PCR based detection, J Clin Microbiol, 34(12): 2904-2908 (1996).

- 24 Faruque S.M., Ahmed K.M., Abdul A.R.M., Qadri, F., Siddique, A.K. and Albert, M.J.: Emergence of a new clone of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 byotype El Tor displacing *V. cholerae* O139 Bengal in Bangladesh, *J Clin Microbiol*, 35(3): 624-630 (1997).
- 25 Fasano, A., Baudry, B., Pumplun, D. W., Wasserman, S. S., Tall, B. D., Ketley, J. M., and Kaper, J. B.: *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1991; 88:5242-5246.
- 26 Freeman, Bob A.: *Microbiología de Burrows.*, Interamericana Mc Graw Hill, México D. F. 551-552, 1989.
- 27 Fujino, T.: Discovery of *Vibrio parahemolyticus*. *Int. Symp. on Vibrio parahaemolyticus*, Fujino, Sakaguchi, Sakazaki, Takeda, Eds., Saikon Publ., Co., Tokyo, 1-4, 1974.
- 28 Gardel, C. L., and Mekalanos, J. J.: Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression., *Infect. Immun.*, 1996; 64(6):2246-2255.
- 29 Giron, J. A., Gomez-Duarte, O. G., Jarvis, K. G., and Kaper, J. B.: Longus pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli* and its relatedness to other type-4 pili--a minireview., 1997; 192(1):39-43.

- 30 Goshima, K., Owariba, 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.
- 31 Gray L. D. and Kreger, A. S.: Purification and Characterization of an Extracellular Cytolysin Produced by *Vibrio vulnificus*, Infect. Immun., 1985; 48(1):62-72.
- 32 Hansen, W., Freney, J., Benyagoub, H., Letouzey, M.-N., Gigi, J. and Wauters, G.: Severe Human Infections Cause by *Vibrio metschnikovii*, J. Clin. Microbiol., 1993: 31(9):2529-2530.
- 33 Hickman-Brenner, F. W., Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., Schreiber, M., Holmberg, S. D., Baldy, L. M., Lewis, C. S., Pickens, N. M., and Farmer, J. J.: *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* isolated from a stool sample of one patient, J. Clin. Microbiol., 1984; 20(1):125-127.
- 34 Hollis, D. G., Weaver R. E., Baker C. N. and Thornsberry C.: Halophilic *Vibrio* species isolated from blood cultures, J. Clin. Microbiol., 1976; 3:425-431.
- 35 Honda, S., Goto, I., Minematsu, I., Ikeda, N., Asano, N., Ishibashi, M., Kinoshita, Y., Nishibuchi, M., Honda, T., and Miwatani, T.: Gastroenteritis due to kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus*, Lancet, 1987; 1:331-332.
- 36 Honda, T., Goshima, K., Takeda, YI, Sugino, Y.,and Miwatani, T.: Demonstration of the Cardiotoxicity of the Thermostable Direct Hemolysin

(Lethal Toxin) produced by *Vibrio parahaemolyticus*. Infect. Immun., 1976; 13(1):163-171.

37 Honda, T., Ni, Y., and Miwatani, T.: Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin, Infect. Immun., 1988; 56:961-965

38 Honda, T., Ni, Y., Miwatani, T., Adachi, T. and Kim, J.: The thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is a pore-forming toxin. Can. J. Microbiol. 1992; 38:1175-1180.

39 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.

40 Honda, T., Yoh, M., Kongmuang, U., and Miwatani, T.: Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*, J. Clin. Microbiol., 1985; 22:383-386.

41 Hughes, J. M., Hollis, D. G., Gangarosa, E. J. and Thornsberry, C.: Non-cholera *Vibrio* infections in the United States: clinical, epidemiologic and laboratory features, Ann. Intern. Med., 1978; 88:602-606.

42 Huntley, J. S., Hall, A. C., Sathyamoorthy, V. and Hall, R. H.: Cation flux studies of the lesion induced in human erythrocyte membranes by the

thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 1993; 61:4326-4332.

43 Ichinose, Y., Tsuji, T., Kato, M., Neves, B. C., Kouichi, M., Ehara, M., and Hirayama, T.: A classical strain of *Vibrio cholerae* with diminished ability to process the proteolytically sensitive site in the A subunit of cholera toxin., *Infect. Immun.*, 1996; 64(3):1081-1083.

44 Janoff, E. N., Hayakawa, H., Taylor, D. N., Fasching, C. E., Kenner, J. R., Jaimes, E., and Rajj, L.: Nitric oxide production during *Vibrio cholerae* infection., *Am. J. Physiol.* 1997; 273:G1160-G1167.

45 Jean-Jacques, W., Rajashekaraiah, K. R., Framer III, J. J., Hickman, F. W., Morris, J. G. and Kallick C. A.: *Vibrio metschnikovii* Bacteremia in a Patient with Cholecystitis, *J. Clin. Microbiol.*, 1981; 14(6):711-712.

46 Kaper, J. B., Campen, R. K., Seidler, R. J., Baldini, M. M. and Falkow, S.: Cloning of the thermostable direct or Kanagawa phenomenon-associated hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*, *Infect. Immun.*, 1984; 45:290-292.

47 Karaolis, K. K., Johnson, J. A., Bailey, C. C., Boedeker, E. C., Kaper, J. B., and Reeves, P. R.: A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998; 95(6):3134-3139.

48 Karasawa, T., Mihara, T., Kurazano, H., Nair, G. B., Garg, S., Ramamurthy, T., and Takeda, Y.: Distribution of zot (zonula occludens toxin)

gene among strains of *V. cholerae* 01 and non-01., FEMS. Microbiol. Lett., 1993; 106:143-146.

49 Kishishita, M., Matsuoka, N., Kumagai, K., Yamasaki, S., Takeda, Y., and Nishibuchi, M.: Sequence variation in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*, Appl. Environ. Microbiol., 1992; 58:2449-2457.

50 Kothary M. H. and Kreger, A. S.: Production and Partial Characterization of an Elastolytic Protease of *Vibrio vulnificus*, Infect. Immun., 1985; 50(2):534-540.

51 Kothary, M. H., Claverie, E. F., Miliotis, M. D., Madden, J. M. and Richardson, S. H.: Purification and characterization of a Chinese Hamster Ovary Cell Elongation Factor of *Vibrio hollisae*. Infect.Immun., 1995; 63(7):2481-2423.

52 Lazar, S., and Waldor, M. K.: ToxR-independent expression of cholera toxin from the replicative form of CTXphi., Infect. Immun., 1998; 66(1):394-397.

53 Lee, J. V., Donovan, T. J. and Furniss, A. L.: Characterization, taxonomy, and emended description of *Vibrio metschnikovii*, Int. J. Syst. Bacteriol., 1978; 28:99-111.

54 Liljeqvist, S., Samuelson, P., Hansson, M., Nguyen, T. N., Binz, H., and Stahl, S.: Surface display of the cholera toxin B subunit on *Staphylococcus*

- xylosus* and *Staphylococcus carnosus*., Appl. Environ. Microbiol., 1997; 63(7):2481-2488.
- 55 Lin, Z., Kumagai, K., Baba, K., Mekalanos, J. J., and Nishibuchi, M.: *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* toxRS operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene, J. Bacteriol., 1993; 175:3844-3855.
- 56 Madico G., Checkley W., Gilman H., Bravo N. Cabrera L., Calderón M. and Ceballos A.: Active surveillance for *Vibrio cholerae* O1 and vibriophages in sewage water as a potential tool to predict cholera outbreaks, J Clin Microbiol, 34(12): 2968-2972 (1996).
- 57 Magalhaes, V., Branco, A., de Andrade Lima, R., and Magalhaes, M.: *Vibrio metschnikovii* among diarrheal patients during cholera epidemic in Recife Brazil, Rev.Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 1996; 38(1):1-3.
- 58 Manning, P. A.: The *tcp* gene cluster of *Vibrio cholerae*., Gene., 1997; 192(1):63-70.
- 59 McLaughlin J.C.: *Vibrio* "in" Manual of Clinical Microbiology, 6th edition, Murray, P.R. et al (Eds), American Society for Microbiology, Washington, D.C., (1995), 465-476.
- 60 Miliotis, M. D., Tall, B. D., and Gray, R. T.: Adherence to and Invasion of Tissue Culture Cells by *Vibrio hollisae*, Infect. Immun., 1985; 63(12):4959-4963.

- 61 Misaki, H., Matsumoto, M.: Purification of Lysophospholipase of *Vibrio parahaemolyticus* and Its Properties, J. Biochem. 83: 1395-1405, 1978.
- 62 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.
- 63 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.
- 64 Miyaki, M., Honda, T. and Miwatani, T.: Effects of divalent cations and saccharides on *Vibrio metschnikovii* cytolysin-induced hemolysis of rabbit erythrocytes, Infect. Immun., 1989; 57(1):158-163.
- 65 Miyaki, M., Honda, T. and Miwatani, T.: Purification and characterization of *Vibrio metschnikovii* cytolysin, Infect. Immun., 1988; 56(4):954-960.
- 66 Miyamoto, Y., Obsara, 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., 1980; 28(2):567-576.

- 67 Molenda, J. R., Johnson, W.G., Fishbein, M., Wentz, B., Wehlman, I. J. And Dadisman Jr., T.A.: *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis in Maryland: Laboratory Aspects. Appl. Microbiol. 24: 444-448, 1972.
- 68 Mooi F.R. and Bik E.M.: The evolution of epidemic *Vibrio cholerae* strains, Trends Microbiol, 5(4): 161-165 (1997).
- 69 Morris G. J. and Black E. R.: Cholera and Other Vibriones in the United States, N. Engl. J. Med., 1985; 312(6):343-350.
- 70 Morris J.G., Losonsky G.E., Johnson J.A., Tacket C.O., Nataro J.P., Panigrahi P. and Levin M.M.: Clinical and immunologic characteristics of *Vibrio cholerae* O139 Bengal infection in North American volunteers, J Infect Dis, 171: 903-908 (1995).
- 71 Morris, J. G., Rickey, W., Hollis, D. G., Weaver, R. E., Miller, H. G., Tacket, C. O., Hickman, F. W., Blake, P. A.: Illness caused by *Vibrio damsela* and *Vibrio hollisae*., Lancet., 1982; 1:1294-1296.
- 72 Moss, J., and M. Vaughan.: ADP-ribosylation of guanil nucleotide binding proteins by bacterial toxins., Adv. Enzymol., 61:303-379.
- 73 Nishibushi, M., and Kaper, J. B.: Duplication and variation of the thermostable direct haemolysin (*tdh*) gene in *Vibrio parahaemolyticus*, Mol. Microbiol., 1990; 4:87-99.

- 74 Nishibushi, M., and Kaper, J. B.: Nucleotide sequence of the thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*, J. Bacteriol., 1985; 162: 558-564.
- 75 Nishibushi, M., and Kaper, J. B.: Thermostable Direct Hemolysin Gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a Virulence Gene Acquired by a Marine Bacterium, Infect. Immun., 1995; 63(6):2093-2099.
- 76 Nishibushi, M., Doke, S., Toizumi, S., Umeda, T., Yoh, M., and Miwatani, T.: Isolation from a coastal fish of *Vibrio hollisae* capable of producing a hemolysin similar to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*, Appl. Environ. Microbiol., 1988; 54(8):2144-2146.
- 77 Nishibushi, M., Fasano, R., Rusell, G. and Kaper, J. B.: Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct hemolysin. Infect. Immun., 1992; 60:3539-3545.
- 78 Nishibushi, M., Ishibashi, M., Takeda, Y., and Kaper, J. B.: Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related DNA sequences in *Vibrio parahaemolyticus* and other *Vibrio* species by the DNA colony hybridization test, Infect. Immun., 1985; 49:481-486.
- 79 Obara, Y., Yamai, S., Nikkawa, T., Miyamoto, Y., Ohashi, M. and Shimada, T.: Histopathological changes in the Small Intestine of Sucking 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.

80 Okujo, N., and Yamamoto S.: Identification of the siderophores from
Vibrio hollisae and *Vibrio mimicus* as aerobactin, FEMS Microbiol. Lett., 1994;
118:187-192.

81 Osawa R., Okitsu T, Sata S. and Yamai S.: Rapid screening method for
identification of cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* O1 and O139, J Clin
Microbiol, 35(4): 951-953 (1997).

82 Pavia, A. T., Bryan, J. A., Maher, K. L., Hester, T. R., and Farmer, J. J.:
Vibrio carchariae infection after a shark bite., Ann.Int. Med. 1989; 111:85-86.

83 Qadri, F., Chowdhury, A., Hossain, J., Chowdhury, K., Azim, T.,
Shimada, T., Islam, K. M. N., Sack, R. B., and Albert, M. J.: Development and
evaluation of rapid monoclonal antibody-based coagglutination test for direct
detection of *Vibrio cholerae* O139 synonym bengal in stool samples., J. Clin.
Microbiol., 1994; 32(6):1589-1590.

84 Rank, E. L., Smith, I. B., and Langer, M.: Bacteremia Caused by *Vibrio*
hollisae, J. Clin. Microbiol. 1988; 26(2):375-376.

85 Roth J.A., Bolin C.A., Brogden K.A., Minion F.C. and Wannemuehler
M.J.: Virulence mechanisms of bacterial pathogens, 2nd edition, American
Society for Microbiology, Washington, D.C. (1995).

- 86 Sakazaki, R. And Balows, A.: "The Genera *Vibrio*, *Pleisomonas* and *Aeromonas*" in *The Prokaryotes*, Vol II; Starr, Stolp, Truper, Balows, Schlegel (eds.), Springer-Verlag; Berlin Heidelberg, New York, 1272-1285, 1981.
- 87 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.
- 88 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.
- 89 Sakurai, J., Matsuzaki, A., Miwatani, T.: Purification and Characterization of Thermostable Direct Hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 8(5): 775-780, 1973.
- 90 Sakurai, J., Matsuzaki, A., Takeda, Y. And Miwatani, T.: Existence of Two distinct hemolysins in *V. parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 9(5): 777-780, 1974.
- 91 Salyers A.A. and Whitt D.D.: *Bacterial pathogenesis, a molecular approach*, American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1994).
- 92 Satcher, D., Hughes, J. M., Cohen, M. L., Guerra de Macedo, C., Brandling-Bennett, D., Paganini, J. M., and Escutia, V.: *Métodos de*

laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*, Organización Panamericana de la Salud, 1992; 52.

93 Sciortino, C. V.: Serological reactivity of humans to a *Vibrio cholerae* common antigen., *Curr. Microbiol.*, 1998; 36(4):196-201.

94 Secretaría de Salud, Boletín "Epidemiología", Dirección General de Epidemiología, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 13(52): 7 (1996).

95 Secretaría de Salud, Boletín "Epidemiología", Dirección General de Epidemiología, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 14(53): 8 (1998).

96 Shirai, H., Ito, H., Hirayama, T., Nakatomo, Y., Nakabayashi, N., Kumagai, K., Takeda, Y., and Nishibuchi, M.: Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis, *Infect. Immun.*, 1990; 58:3568-3573.

97 Simpson, L. M. and Oliver, J. D.: Siderophore Production by *Vibrio vulnificus*, *Infect. Immun.*, 1983; 41(2):644-649.

98 Spira W. M., and Fedorka-Cray, P. J.: Purification of enterotoxins from *Vibrio mimicus* that appear to be identical to cholera toxin, *Infect. Immun.*, 1984; 45(3):679-684.

- 99 Tacket, C. O., Hickman, F., Pierce, G. V., and Mendoza, L. F.: Diarrhea associated with *Vibrio fluvialis* in the United States., *J. Clin. Microbiol.*, 1982; 16(5):991-992.
- 100 Taguchi, H., Yamaguchi, H., Osaki, T. Y., Yamamoto, T., Ogata, S., and Kamiya, S.: Flow cytometric analysis for adhesion of *Vibrio cholerae* to human intestinal epithelial cell., *Eur. J. Epidemiol.*, 1997; 13(6):719-724.
- 101 Takeda, Y., Hori, Y., Taga, S., Sakurai, J. And Miwatani, T.: Characterization of the Temperature-dependent Inactivating Factor of the Thermoestable Direct Hemolysin in *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun.*, 12(3): 449-454, 1975.
- 102 Takeda, Y., Taga, S. And Miwatani, T.: Evidence that Direct Hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is composed of Two Subunits. *FEMS Microbial Lett.*, 4: 271-274, 1978.
- 103 Takeda, Y.: Thermostable Direct Hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Pharmac. Ther.*, 19:123-146, 1983.
- 104 Takeshi, H., Yuxin, N., and Miwatani, T.: The thermostable direct hemolysin of *V. parahaemolyticus* is a pore-forming toxin., *Can. J. Microbiol.*, 1992; 38:1175-1180.
- 105 Tamamoto, T., Nakashima, K., Nakasone, N., Honma, Y., Higa, N., and Yamashiro, T.: Adhesive property of toxin-coregulated pilus of *Vibrio cholerae* 01., 1998; 42(1):41-45.

- 106 Testa J., Daniel, L. W. and Kreger, A. S.: Extracellular Phospholipase A2 and Lysophospholipase Produced by *Vibrio vulnificus*, *Infect. Immun.*, 1984; 45(2):458-463.
- 107 Trucksis, M., Conn, T. L., Fasano, A., and Kaper, J. B.: Production of *Vibrio cholerae* accessory cholera enterotoxin (Ace) in the yeast *Pichia pastoris*, *Infect. Immun.* 1997; 65(12): 4984-4988.
- 108 Vanderzant, C. And Nickelson, R.: Procedure for Isolation and Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Microbiol.* 23(1): 26-33, 1972.
- 109 Varela, P., Pollevick, G. D., Rivas, M., Chinen, I., Binsztein, N., Frasc, A. C. C., and Ugalde, R. A.: Direct detection of *Vibrio cholerae* in stool samples., *J. Clin. Microbio.*, 1994; 32(5):1246-1248.
- 110 Wright, A. C. and Morris, J. G.: The extracellular Cytolysin of *Vibrio vulnificus*: Inactivation and Relationship to Virulence in Mice, *Infect. Immun.*, 1991; 59(1):192-197.
- 111 Wright, A. C., Simpson L. M. And Oliver J. D.: Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections, *Infect. Immun.*, 1981; 34:503-507.
- 112 Xu, M., Iida, T., Yamamoto, K., Takarada, Y., Miwatani, T., and Honda, T.: Demonstration and characterization of simultaneous production of a thermostable direct hemolysin (TDH71) and a TDH-related hemolysin (TRHx) by a clinically isolated *Vibrio parahaemolyticus* strain, TH3766, *Infect. Immun.*, 1994; 62:166-171.

- 113 Yamamoto, K., Taeda, Y., Miwatani, T., and Craig, P. J.: Purification and some properties of a non-01 *Vibrio cholerae* enterotoxin that is identical to cholera enterotoxin, *Infect. Immun.*, 1983; 39:1128-1135.
- 114 Yamamoto, K., Takeda, Y., Miwatani, T., and Craig J. P.: Evidence that a non-01 *V. cholerae* produces enterotoxin that is similar but non identical to cholera enterotoxin. *Infect. Immun.*, 1983; 41:896-901.
- 115 Yamamoto, T., Kamano, T., Uchimura, M., Iwanaga, M., and Yokota T.: *Vibrio cholerae* 01 adherence to villi and lymphoid follicle epithelium: in vitro model using formalin-treated human small intestine and correlation between adherence and cell-associated hemagglutinin levels., *Infect. Immun.*, 1988; 56:3241-3250.
- 116 Yoh, M., Honda, T., and Miwatani, T.: Purification and partial characterization of a *Vibrio hollisae* hemolysin that relates to the thermostabile direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*, *Can. J. Microbiol.*, 1986; 32:632-636.
- 117 Yoh, M., Honda, T., Miwatani, T., Tsunasawa, S. and Sakiyama, F.: Comparative amino acid sequence analysis of hemolysins produced by *Vibrio hollisae* and *Vibrio parahaemolyticus*., *J. Bacteriol.* 1989; 171(12):6859-6861.
- 118 Yoh, M., Honga, T., and Miwatni, T.: Comparison of hemolysins of *Vibrio cholerae* non-01 and *Vibrio hollisae* with thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*, *Can. J. Microbiol.*, 1988; 34:1321-1324.

- 119 Yoh, M., Honga, T., and Miwatni, T.: Homogeneity of a hemolysin (Vh-rTDH) produced by clinical and environmental isolates of *Vibrio hollisae*, FEMS Microbiol. Lett., 1989; 61:171-176.
- 120 Yoshida S., Ogawa M. and Mizuguchi Y.: Relation of Capsular Materials and Colony Opacity to Virulence of *Vibrio vulnificus*, Infect. Immun., 1985; 47(2):446-451.
- 121 Zen-Yoji, 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.
- 122 Zen-Yoji, 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.