

## Susceptibilidad a los antimicrobianos y factores de virulencia en cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda

Luis Enrique Cabrera-Rodríguez<sup>1</sup>, Laura Bravo-Fariñas<sup>2</sup>, María Margarita Ramírez-Álvarez<sup>2</sup>, Alina Llop-Hernández<sup>2</sup>, Anabel Fernández-Abreu<sup>2</sup>, Luis Morier<sup>3</sup>, Graciela Borrego-Hernández<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología Clínica, Centro Municipal de Higiene y Epidemiología de Güines, La Habana, Cuba. <sup>2</sup>Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Ciudad de la Habana, Cuba. <sup>3</sup>Laboratorio de Cultivos de Células, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Ciudad de la Habana, Cuba. <sup>4</sup>Laboratorio de Microbiología Clínica, Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de Holguín, Holguín, Cuba

### RESUMEN

**Introducción.** Las infecciones intestinales causadas por *Vibrio cholerae* no-O1 tienen un incremento en el ámbito mundial.

**Objetivo.** Conocer la susceptibilidad bacteriana a drogas de elección y alternativas y determinar la presencia de algunos factores de virulencia como: las enzimas extracelulares (DNasa, gelatinasa, lecitinasa, elastasa y hemolisina), adherencia a células HEp-2 y presencia de fimbrias.

**Materiales y Métodos.** Se realizó un estudio en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", en 65 cepas de *Vibrio cholerae* no-O1, aisladas de heces de pacientes con Enfermedad Diarreica Aguda, procedentes de 7 Laboratorios de Microbiología clínica de los Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología del país (Ciudad de la Habana, Camagüey, Las Tunas, Holguín, Granma, Santiago de Cuba y el Centro Municipal de la Isla de la Juventud), en el período comprendido de enero a diciembre de 2006.

**Resultados.** El 32.3 % y el 30.7 % de las cepas presentaron resistencia a la sulfonamida y a la ampicilina, respectivamente. Se apreciaron niveles de sensibilidad superiores al 85% con fluoroquinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol y trimetoprim-sul-

fametoxazol. Las enzimas hemolisina y gelatinasa estuvieron presentes en el 100% de las cepas.

**Conclusiones.** Las cepas estudiadas muestran baja resistencia a los agentes antimicrobianos analizados, excepto sulfonamida y ampicilina. Al menos dos factores de virulencia de los investigados estuvieron presentes en todas las cepas.

**Palabras clave:** *Vibrio cholerae* no-O1, factores de virulencia, susceptibilidad a antimicrobianos, enfermedad diarreica aguda

### ABSTRACT

**Antimicrobial susceptibility and virulence factors of *Vibrio cholerae* no-O1 isolates isolated from patients with acute diarrhea.**

**Introduction.** The intestinal infections caused for *Vibrio cholerae* no-O1 are increasing in the world.

**Objective.** To know the antimicrobial susceptibility to the drug of choice and alternative ones and to determine the presence of some virulence factors as: extracellular enzymes (Dnase, gelatinase, lecitinase, elastase and hemolysin), HEp-2 cells adherence and presence of fimbrias.

**Solicitud de sobretiros:** Dra. Laura Bravo Fariñas, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Autopista Novia del Mediodía Km. 6, La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: laura@ipk.sld.cu

**Recibido:** el 24 de abril de 2008. **Aceptado para publicación:** el 3 de octubre de 2008

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb081933.pdf>

**Materials and Methods.** A total of 65 isolates of *Vibrio cholerae* no-O1 were obtained from patients with acute diarrhea in 7 provincial laboratories of microbiology in Cuba from January to December 2006.

**Results.** The figures for resistance of sulphonamide and ampicillin were 32.3% and 30.7%, respectively. Sensitivity levels over 85% were recorded for the antibiotics fluoroquinolones, tetracycline, chloramphenicol and trimetoprim-sulphamethoxazole. Hemolysin and gelatinase enzymes were found in 100% of the isolates.

**Conclusions.** The studied isolates show low resistance towards the tested antimicrobials except for sulfonamide and ampicilline. At least two of the investigated virulence factors were found in all isolates.

**Key words:** *Vibrio cholerae* no-O1, virulence factor, antimicrobial susceptibility, acute diarrheic disease.

## INTRODUCCIÓN

Los miembros del género *Vibrio* (*V.*) son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos y oxidasa positiva, que pertenecen a la familia *Vibrionaceae*, según la segunda edición del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (1). Este género está integrado por 65 especies, de las cuales 12 resultan patógenas para el hombre y de ellas las de mayor trascendencia clínica son: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (2). *V. cholerae*, de acuerdo con el lipopolisacárido capsular, tiene más de 200 serogrupos, divididos en O1 y no-O1. Sólo los serogrupos O1 y O139 son los responsables de epidemias y pandemias de cólera (3).

*V. cholerae* no-O1 es bioquímicamente idéntico a *V. cholerae* O1 y ha sido asociado con casos esporádicos y brotes de gastroenteritis aguda en diferentes países, aunque la mayoría de las cepas no producen la toxina colérica (TC), sino que sintetizan una enterotoxina termoestable (ST), constituyendo el principal mecanismo asociado a la patogenicidad (4,5). Otros factores de virulencia

presentes son: la producción de las enzimas extracelulares (gelatinasa, elastasa, lecitinasa), citolisinas, citotoxinas, hemolisinas, producción de polisacárido capsular y hemaglutininas (5,6).

En los últimos 20 años las infecciones intestinales por los microorganismos del género *Vibrio* se han incrementado a escala mundial (2). Los serogrupos de *V. cholerae* no-O1 están involucrados en la emergencia de una nueva variante de *V. cholerae*. Esta hipótesis es sustentada por la génesis de *V. cholerae* O139, evolucionado por la transferencia horizontal de genes del serogrupo O1 a los serogrupos no-O1, lo que le confirió a este serogrupo el potencial epidémico (7,8). Por lo antes expuesto, se propone conocer la susceptibilidad a los antimicrobianos y la presencia de algunos factores de virulencia asociados a la patogenia, en cepas de *V. cholerae* no-O1 aisladas de heces de pacientes con Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) en el país.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 65 cepas de *V. cholerae* no-O1, aisladas de heces de pacientes con Enfermedad Diarreica Aguda, procedentes de 7 Laboratorios de Microbiología Clínica de los Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología del país (Ciudad de la Habana, Camagüey, Las Tunas, Holguín, Granma, Santiago de Cuba y del Centro Municipal de la Isla de la Juventud), pertenecientes al cepario del Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades Diarreicas Agudas del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (LNR/EDA/IPK), en el período comprendido de enero a diciembre de 2006.

Para la confirmación de género, las 65 cepas mantenidas en medio de conservación de Pasteur fueron inoculadas en Caldo Cerebro-Corazón e incubadas a 37°C durante 18 a 24 horas en condiciones de aerobiosis. Posteriormente, se sembró una asada en placas de Agar MacConkey y Agar Tiosulfato-Citrato-Sales Biliares (TCBS) incubándose en las mismas condiciones de temperatura, aireación y tiempo antes mencionadas, al cabo de

## Factores de virulencia en *Vibrio cholerae* no-O1

las cuales se seleccionaron, al menos, 3 colonias por placa, que fueron inoculadas en los medios de diferenciación primaria Agar Hierro y dos azúcares de Kligler y Agar Hierro-Lisina. Se escogieron aquellas colonias que después del crecimiento durante 18 a 24 horas las cepas presentaron codificación genética para la enzima citocromo oxidasa. A éstas se les realizó el estudio fisiológico correspondiente para ubicarlas en el género *Vibrio* (1).

Para la identificación de especies, la serotipificación (Antígeno O) y el estudio de la sensibilidad al compuesto vibriostático O/129 se realizaron según lo descrito en la literatura especializada (1).

A las cepas se les determinó la susceptibilidad a las drogas antimicrobianas de elección y alternativas utilizando el método de difusión en agar (Kirby-Bauer) (9).

**Drogas de elección:** tetraciclina (TE) 30µg, doxiciclina (DO) 30µg, cloranfenicol (CL) 30µg, trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) 1.25/23.75µg, ampicilina (AM) 10µg y sulfonamidas (SSS) 300µg.

**Drogas alternativas:** ácido nalidíxico (NA) 30µg, ciprofloxacina (CIP) 5µg y ofloxacina (OF) 5µg.

Para la lectura e interpretación se usó el protocolo recomendado por el Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI) de los Estados Unidos de América, 2005 (10).

A las cepas se les determinaron los siguientes factores de virulencia: la producción de las enzimas extracelulares (DNasa, gelatinasa, elastasa, lecitinasa y hemolisina), citotoxicidad en células Vero y presencia de fimbrias.

La actividad de DNasa fue investigada según McFaddin (11). Un halo rosado alrededor de las colonias en Agar DNasa con 0.01% de azul de toluidina indicó actividad de nucleasa.

La enzima elastasa se determinó por la metodología establecida por Scharmann (12). Se inoculó por punteo en la superficie del medio Agar elastina, incubándose hasta 7 días a 37°C. Un halo transparente alrededor de la colonia indicó la presencia de la enzima elastasa.

El estudio de la enzima gelatinasa se realizó por la técnica descrita por Blazevic (13). Se inoculó por punteo en la superficie del medio Agar gelatina, incubándose 24 horas a 37°C. Una opacidad alrededor de la colonia indicó producción de la enzima gelatinasa.

La presencia de la enzima lecitinasa se determinó por el protocolo recomendado por Boiko (14).

Se inoculó por punteo en la superficie del medio Agar lecitina, incubándose 48 horas a 37°C. Un halo transparente alrededor de la colonia indicó la presencia de la enzima.

Para demostrar la beta-hemolisina, se siguió la técnica descrita por Robinson (15). Se tomó una asada del cultivo y se inoculó en estría por agotamiento en Agar Triptona-Soya suplementado con sangre de carnero al 5%, incubándose 24 horas a 37°C. Un halo transparente alrededor de la colonia indicó la presencia de la enzima beta-hemolisina.

Para determinar la capacidad de adherencia a células HEp-2, se procedió según el método de Carrello (16). Se utilizó la línea celular HEp-2 ATCC-CCL 1992, procedente del Laboratorio de Cultivo de Células del IPK. Se preparó una suspensión bacteriana de *V. cholerae* no-O1, se inoculó 1 ml de la misma en cada pocillo de la placa de células HEp-2 y se incubó a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 90 minutos.

Para determinar la presencia de fimbrias se procedió según el método de Nishikawa (17). Se preparó una suspensión bacteriana y una suspensión al 3% de glóbulos rojos humanos, grupo O de varios donantes. Se mezclaron 20µl de ambas en una lámina portaobjeto, se agitó durante 5 minutos y se consideraron positivas aquellas pruebas en las que se observó aglutinación de los glóbulos rojos.

## RESULTADOS

En el Cuadro 1 se observa el comportamiento de las pruebas de susceptibilidad de las 65 cepas de *V. cholerae* no-O1, frente a las 9 drogas

antimicrobianas investigadas, expresándose los resultados en categoría de interpretación de: sensible, intermedio y resistente.

**Cuadro 1**  
Susceptibilidad a los antimicrobianos de las cepas de *Vibrio cholerae* no-O1

Drogas antimicrobianas	Sensible		Intermedio		Resistente	
	No. de cepas	%	No. de cepas	%	No. de cepas	%
Sulfonamida <sup>e</sup>	29	44.6	15	23.1	21	32.3
Ampicilina <sup>e</sup>	28	43.0	17	26.3	20	30.7
Trimetoprim-sulfametoxazol <sup>e</sup>	56	86.2	1	1.5	8	12.3
Tetraciclina <sup>e</sup>	60	92.3	2	3.1	3	4.6
Ácido nalidíxico <sup>a</sup>	62	95.4	1	1.5	2	3.1
Cloranfenicol <sup>e</sup>	61	93.8	4	6.2	0	0
Doxiciclina <sup>e</sup>	64	98.5	1	1.5	0	0
Ciprofloxacina <sup>a</sup>	65	100	0	0	0	0
Ofloxacina <sup>a</sup>	65	100	0	0	0	0

Leyenda: <sup>e</sup>drogas de elección, <sup>a</sup>drogas alternativas

Analizando el resultado de las cepas frente a las drogas de elección se observó que el 32.3% y el 30.7% de las cepas presentaron resistencia a la sulfonamida y a la ampicilina respectivamente. Se obtuvieron valores de sensibilidad superiores al 85% con los antibióticos: doxiciclina, cloranfenicol, tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol.

En relación con la susceptibilidad a las drogas alternativas se apreció 100% de sensibilidad para la ciprofloxacina y ofloxacina y de 95.4% para el ácido nalidíxico.

De las 65 cepas, 2 (3%) resultaron multirresistentes (resistencia a 3 o más grupos de drogas antimicrobianas). El patrón de multirresistencia es TE<sup>-</sup>, NA<sup>-</sup>, SXT<sup>-</sup>.

Todas presentaron, al menos, un factor de virulencia. Las enzimas hemolisina y gelatinasa estuvieron presentes en el 100% de las cepas investigadas y la adherencia a células HEp-2 se observó en el 87.6% de las cepas. El resto de las enzimas, elastasa, lecitinasa y DNasa resultaron positivas en 86.1%, 80% y 73.8%, respectivamente (Figura1).

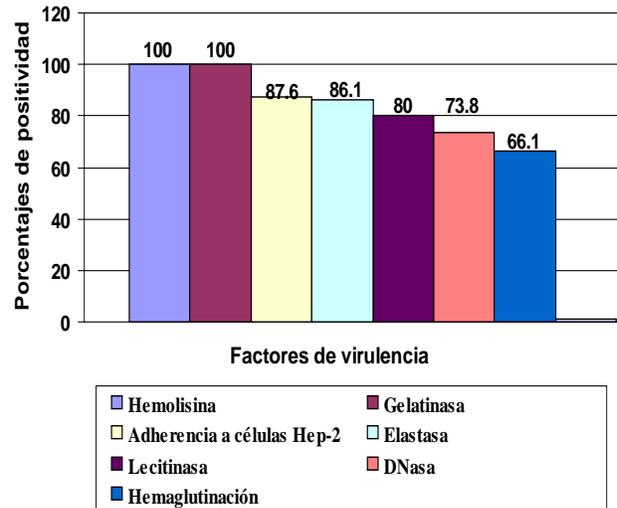


Figura 1. Presencia de factores de virulencia

## DISCUSIÓN

Los miembros de la familia *Vibrionaceae* son agentes etiológicos de EDA en áreas tropicales y subtropicales de todos los continentes. Desde las décadas pasadas, se ha incrementado a escala mundial la incidencia de gastroenteritis aguda de forma esporádica y en brotes por *V. cholerae* no-O1 (2).

Analizando en este estudio los resultados de la susceptibilidad a los antimicrobianos en cepas de *V. cholerae* no-O1, se observó una resistencia moderada a la sulfonamida. Similar nivel de resistencia fue obtenido por Iwanaga y cols., en Laos (18). Sin embargo, el valor de resistencia para la sulfonamida del presente estudio no coincide con el obtenido en una investigación epidemiológica hecha por Mohanthy y cols., entre los años 1998 y 2002, en un hospital de nivel terciario en el norte de la India, sobre los patrones de resistencia contra los antimicrobianos en cepas de *V. cholerae*, registrándose 90.2% de resistencia a la sulfonamida en estas cepas (19).

Morris y cols., en 1985, comenzaron a detectar resistencia a la ampicilina en cepas de *V. cholerae* no-O1, procedentes de 9 países de los continentes Africano, Euroasiático y Americano (20). El porcentaje de resistencia para la ampicilina obtenido en este trabajo es semejante al publicado por autores nacionales e internacionales (21,22).

## Factores de virulencia en *Vibrio cholerae* no-O1

En el LNR/EDA/IPK, Bravo y cols. en 2000 y 2004 realizaron varios estudios sobre el comportamiento de la susceptibilidad a los antimicrobianos en cepas de *V. cholerae* no-O1 aisladas de pacientes con diarreas, observándose valores de sensibilidad por encima del 80% a tetraciclina, ácido nalidíxico y trimetoprim-sulfametoxazol (22,23), encontrándose en esta investigación correspondencia con los resultados obtenidos por los autores citados anteriormente.

El patrón de multiresistencia (TE<sup>-</sup>, NA<sup>-</sup>, SXT) encontrado en la presente investigación coincide con el hallado en Perú (24), no así con el obtenido en la India y en Argentina (25,26). La diferencia pudiera deberse a la cantidad de cepas estudiadas en el presente estudio y al uso racional de los agentes antimicrobianos en Cuba.

Las infecciones intestinales por *V. cholerae* no-O1 generalmente provocan gastroenteritis ligera, considerándose la diarrea autolimitada, siendo necesaria la prescripción de la terapia antimicrobiana en niños y ancianos con diarreas severas, en pacientes con factores de riesgos (diabetes mellitus, malnutrición, inmunodeficiencias, entre otros) y en las infecciones extraintestinales (septicemia, celulitis, otitis, etc.) (27).

Son escasos los estudios sobre factores de virulencia (producción de enzimas extracelulares, presencia de fimbrias y adherencia a células HEp-2) realizados en América Latina y en el Caribe, en cepas de *V. cholerae* no-O1 aisladas de pacientes con EDA (28).

La hemolisina producida por *V. cholerae* O139 y por *V. cholerae* no-O1 es idéntica a la hemolisina El Tor de *V. cholerae* O1 y es considerada un factor de virulencia para causar diarreas, especialmente cuando las cepas carecen de toxinas bien definidas como la TC (29).

Observando el comportamiento de este factor de virulencia en nuestro trabajo, todas las cepas produjeron la enzima hemolisina. Este resultado es similar a los encontrados por Singh y cols. en la India y por Binost y cols. en Argentina (30,28).

Cuando se revisa la bibliografía científica internacional en relación con la producción de proteasas, lipasas, citotoxinas, entre otras, en el género *Vibrio* (7,14), se señala que las mismas son comunes en este género, implicadas en la producción de hemorragias, edema y en la alteración de los sistemas de defensa del organismo, favoreciendo el desarrollo de los procesos infecciosos. En las cepas de este estudio, se evidenció la producción de las enzimas DNasa, gelatinasa, lecitinasa y elastasa, coincidiendo con lo señalado en las monografías revisadas sobre propiedades y mecanismos de virulencia en las especies del género *Vibrio*, realizada por los autores antes citados. La caracterización fenotípica permite establecer significativos avances en la fisiopatología de las infecciones intestinales causadas por este microorganismo.

La adherencia bacteriana a las células del huésped susceptible representa un paso importante para la colonización tisular y es mediada por moléculas llamadas adhesinas, destacándose en *V. cholerae* la proteína de membrana externa (Omp U) y la toxina reguladora de Pili (tox R) (31). En lo relativo a la alta capacidad de adherencia de las cepas de *V. cholerae* no-O1 de este trabajo a la línea celular HEp-2, se observa concordancia con lo publicado por Dalsgaard y cols. y por Israll y cols., apreciándose que predominó un patrón de adherencia difuso en las cepas de *V. cholerae* O1 y *V. cholerae* no-O1 (32,33).

Otro factor de virulencia en los microorganismos pertenecientes al género *Vibrio* es la presencia de fimbrias, estructura que favorece la colonización y adherencia microbiana (34). En esta investigación se observó, a través de la prueba de hemaglutinación con eritrocitos humanos, la presencia de fimbrias en las cepas objeto de estudio. Nuestros resultados concuerdan con los datos obtenidos en experimentos sobre mecanismos de enteropatogenicidad, expresión de hemaglutininas y patrones de virulencia en cepas de *V. cholerae* O1, *V. cholerae* O139 y *V. cholerae* no-O1 aisladas de pacientes hospitalizados con

diarrea aguda, en los Estados Unidos de América y en Rusia, que demostraron porcentajes de positividad para este factor de virulencia de 61.5%, 55.7% y 70%, respectivamente (35,36).

Los mecanismos de producción de virulencia no están bien esclarecidos en estos serogrupos (37). Los factores de virulencia estudiados en las cepas que incluyó esta investigación pudieran ayudar a dilucidar la patogénesis de *V. cholerae* no-O1 como agente etiológico de la EDA.

Los resultados de esta investigación muestran un bajo grado de resistencia a los agentes antimicrobianos analizados, excepto sulfonamida y ampicilina; estos resultados pudieran deberse a que las cepas en estudio han interactuado poco con los grupos de drogas antimicrobianas antes señalados, debido a que en Cuba se hace un uso racional de los antibióticos. Sin embargo, es necesario continuar una vigilancia estricta de la susceptibilidad bacteriana a las drogas de elección en estos microorganismos, para detectar cambios en los patrones de resistencia en las cepas circulantes en las diferentes provincias y regiones del país.

En este trabajo se describen, por primera vez, algunas propiedades de virulencia de *V. cholerae* no-O1 aislados de pacientes con EDA en Cuba. Futuras investigaciones deben relacionarse con los mecanismos genéticos de virulencia y de resistencia contra los antimicrobianos en estos microorganismos.

#### REFERENCIAS

1. **Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG.** Taxonomic outline of the prokaryotes. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2<sup>nd</sup> ed. Release 4.00; Oct 2004. [Citado el 10 de febrero del 2005]. Disponible en URL: <http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline>
2. **Lesmana M, Subekti DS, Tjaniadi P, Simanjuntak CH, Punjabi NH, Campbell JR, et al.** Spectrum of *Vibrio* species associated with acute diarrhea in North Jakarta, Indonesia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 43:91-7.
3. **Chatterjee SN, Chaudhuri K.** Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*. I. Physical and chemical characterization. *Biochem Biophys Acta* 2003; 1639:65-79.
4. **Nair GB, Oku Y, Takeda Y, Ghosh A, Ghosh RK, Chattopadhyay S, et al.** Toxin profiles of *Vibrio cholerae* non-O1 from environmental sources in Calcutta, India. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54:3180-2.
5. **Farfan M, Miñana D, Fusté MC, Lorén JG.** Genetic relationships between clinical and environmental *Vibrio cholerae* isolates based on multilocus enzyme electrophoresis. *Microbiology* 2000; 146:2613-26.
6. **Shinoda S.** Protein toxins produced by pathogenic vibrios. *J Nat Toxins* 1999; 8:259-69.
7. **Bhattacharya MK, Dutta D, Bhattacharya SK, Deb A, Mukhopadhyay AK, Nair GB, et al.** Association of a disease approximating cholera caused by *Vibrio cholerae* of serogroups other than O1 and O 139. *Epidemiol Infect* 1998; 120:1-5.
8. **Boyd EF, Waldor MK.** Alternative mechanism of cholera toxin acquisition by *Vibrio cholerae*: generalized transduction of CTX $\Phi$  by bacteriophage CP-T1. *Infect Immun* 1999; 67:5898-905.
9. **Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45:493-6.
10. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eleventh informational supplement. Wayne; 2005. CLSI Document M100-S15.
11. **Mc Faddin JF.** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Baltimore: William and Wilkins; 2002.
12. **Scharmann W.** Elastase in *Pseudomonas* and *Aeromonas* Zentralbl Bakteriol 1972; 220:435-42.
13. **Blazevic DJ, Ederer GM.** Principles of biochemical test in diagnostic microbiology. New York, J. Wiley. 1975.
14. **Boiko AV.** Pathogenicity factors of various *Vibrios* and *Aeromonas*. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2000; 79:104-8.
15. **Robinson J, Beaman J, Wagener L, Burke V.** Comparison of direct plating with the use of enrichment culture for isolation of *Aeromonas* spp from faeces. *J Med Microbiol* 1986; 22:315-7.
16. **Carrello A, Solburn K, Budden J, Chong B.** Adhesion of clinical and environment *Aeromonas* isolates to HEp-2 cells. *J Med Microbiol* 1988; 26:19-27.
17. **Nishikawa Y, Kimiura T, Kishi T.** Mannose-resistant adhesion of motile *Aeromonas* to INT 407 cells and the differences among isolates from humans food and water. *Epidemiol Infect* 1991; 107:171-9.
18. **Iwanaga M, Toma C, Miyazato T, Insisiengmay S, Nakasorte N, Ehara M.** Antibiotic resistance conferred by a class I integron and SXT constin in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Laos. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:2364-9.

Factores de virulencia en *Vibrio cholerae* no-O1

19. **Mohanthy S, Kapil A, Das BK.** Seasonality and antimicrobial resistance pattern of *Vibrio cholerae* in a tertiary care hospital of North India. *Trop Doct* 2004; 43:249-51.
20. **Morris JG, Tenney JH, Drusmo GL.** In vitro susceptibility of pathogenic *Vibrio* species to norfloxacin and six other antimicrobial agents. *Antimicrob Agent Chemother* 1985; 28:442-5.
21. **Tjaniadi P, Lesmana M, Subekti D, Machpud N, Komalarini S, Santoso W.** Antimicrobial resistance of bacterial pathogens associated with diarrheal patients in Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68:666-70.
22. **Bravo L, Cabrera L, Ramírez M, Castañeda N, Fernández E, Garrigó E.** Sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas de pacientes en Cuba. *Rev Esp Quimioterap* 2004; 17:200-1.
23. **Bravo L, Ramírez M, Maestre JL, Llop A, Cabrera R, García B.** *Vibrio cholerae* no-O1 toxigénico. *Rev Cubana Med Trop* 2000; 52:106-9.
24. **Ibarra JO, Flores LE, García RH, Alvarado T.** Estudio preliminar de la resistencia de *Vibrio cholerae* O1, brote epidémico 1998, a antimicrobianos. *Rev Peru Biol* 2000; 7:3-6.
25. **Neelam K, Manjula M, Vikas G, Varsha G.** Outbreak of cholera in & around Chandigarh during two successive years (2002,2003). *Indian J Med Res* 2005; 122:404-407.
26. **Organización Panamericana de la Salud.** Resistencia antimicrobiana en las Américas: Magnitud del problema y su contención. Washington DC: OPS; 2003.
27. **World Health Organization.** Management of the patient with cholera. [Citado el 20 de julio del 2005]. Disponible en URL: <http://www.who.int/csr/resources/publications/cholera/whocddser9115rev1.pdf>.
28. **Bidinost C, Saka HA, Aliendro O, Sola C, Panceta-Duttari G, Carranza P, et al.** Virulence factors of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* isolated in Córdoba, Argentina. *Rev Argentina Microbiol* 2004; 36:158-63.
29. **Sack D, Sack R, Nair G, Siddique A.** Cholera. *Lancet* 2004; 363:223-33.
30. **Singh DV, Matte MH, Matte GR, Jiang S, Sabena F, Shukla BN.** Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 strains: Clonal relationships between clinical and environmental isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:910-21.
31. **Israll AM, Balotescu C, Lazar V, Cernat R, Dinu C.** Factors influencing the capacity of cellular substrate adherence of *Vibrio cholerae* O1 and non O1 strains. *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol* 2002; 47:119-24.
32. **Dalsgaard A, Albert MJ, Tavior DN, Shimada T, Meza R, Serichantelergs O, et al.** *Vibrio cholerae* non-O1 serogroups obtained from an outbreak of diarrhea in Lima, Peru. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2715-22.
33. **Israll A, Balotescu C, Camian M, Dinu C, Bucurenci N.** Comparative study of different methods for detection of toxic and other enzymatic factors in *Vibrio cholerae* strains. *Roum Arch Microbiol Immunol* 2004; 63:63-77.
34. **Chiavelli DA, Marsh JW, Taylor RK.** The Mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:3220-5.
35. **Mathur J, Waldor MK.** The *Vibrio cholerae* ToxR-regulated porin OmpU confers resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* 2004; 72:3577-83.
36. **Telesmanich NR, Bezuglova EV, Mishankin MB, Vinokur NI.** Role of lectin (hlyA) in the hemolytic and hemagglutinating activity *Vibrio cholerae*. *Zh Microbiol Epidemiol Immunobiol* 2004; 5:12-6.
37. **Gibotti A, Saridakis HO, Pelayo JS, Tagliari KC, Paseto Falcão D.** Prevalence and virulence properties of *Vibrio cholerae* non-O1, *Aeromonas* spp. and *Plesiomonas shigelloides* isolated from Cambé Stream (State of Paraná, Brazil). *J Appl Microbiol* 2000; 89:70-5.