

Detección de *Vibrio cholerae* no 01 en algunos ambientes acuáticos de Colombia

Emilia M. Valenzuela de Silva¹, José R. Mantilla¹, Carlos A. Agudelo²

Resumen

Para detectar *Vibrio cholerae* spp. ambiental en algunas de las zonas de Colombia donde tuvo lugar la epidemia de 1991 a 1993, se tomaron muestras de agua y se procesaron de acuerdo con los métodos recomendados. A los aislados resultantes se les practicaron pruebas bioquímicas, de crecimiento y de susceptibilidad a antibióticos. De las 11 muestras de agua, se seleccionaron de manera preliminar 690 colonias cuyas características correspondían a *Vibrio cholerae*. La selección definitiva separó 49 aislamientos que luego se redujeron a 19 y en la identificación definitiva se obtuvieron 4 aislamientos de *Vibrio cholerae* no 01, provenientes de Tumaco. Estos aislados resultaron resistentes a la mayoría de antibióticos utilizados, no productores de toxina ni con genes que codificaran tal función. La presencia de estos aislados no 01 puede indicar que se están constituyendo reservorios acuáticos, lo cual es un indicador de que el cólera en Colombia está pasando a una fase de endemia.

Palabras claves: *Vibrio cholerae* no 01, vibrios, tropical, reservorio, ambiente, marino, bioquímica, toxina

Introducción

Antes del brote epidémico que tuvo lugar en Latinoamérica en 1991, 1992 y 1993, en Colombia no se había detectado ningún tipo de vibrio en humanos ni en ambientes acuáticos, o no se había estudiado de manera suficiente estos tipos de bacterias. En general, se acepta que los vibrios son parte de la flora autóctona de la mayoría de estuarios (1-7) que tienen condiciones apropiadas de temperatura, salinidad y radiación solar (8, 9), como las que se encuentran en áreas marinas tropicales.

En Colombia, la primera onda epidémica de cólera tuvo lugar entre 1991 y 1993; se detectaron 30.492 casos y se produjeron 464 defunciones (10). En 1994 y 1995 se mantuvieron algunos de los focos

epidémicos con un número bajo de casos y se presentaron casos aislados en algunas zonas del país. Cepas recuperadas de pacientes fueron identificadas, en su gran mayoría, como *Vibrio cholerae* 01, El Tor, Inaba, y unas pocas del subtipo Ogawa (11).

La experiencia internacional indica que un brote de este tipo puede derivar con cierta rapidez en una situación endémica si se mantienen durante un tiempo suficiente las condiciones sanitarias y epidemiológicas que facilitaron la epidemia.

De otra parte, debido a que los recientes brotes epidémicos de India y Bangladesh han sido provocados por el *Vibrio cholerae* 0139, el cual ha sido aislado también en ambientes acuáticos (12,13), a nivel internacional se ha acentuado el interés por estudiar el *Vibrio cholerae* no 01.

El presente estudio se llevó a cabo para detectar *Vibrio cholerae* spp. ambiental en algunas de las zonas de Colombia donde tuvo lugar la epidemia de 1991 a 1993.

¹ Instituto de Biotecnología, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

² Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Salud en el Trópico, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.

Materiales y metodos

Sitios de estudio: se tomaron muestras de agua en la isla de San Andrés, Coveñas, Tumaco, Leticia, Guasca, Cachipay y Villapinzón, estos tres últimos ubicados en Cundinamarca y en Prado (Tolima). Tumaco y San Andrés fueron dos de los focos más intensos durante la primera onda epidémica del cólera. En Tumaco se han presentado casos también durante 1994 y 1995. En Coveñas y Leticia se han presentado casos aislados. En Guasca, Cachipay, Villapinzón y Prado no se presentaron casos de cólera durante el brote epidémico y se escogieron como sitios control por esta razón.

Muestras: las muestras de agua se tomaron en junio y julio de 1994: una muestra de agua de mar en San Andrés, en el área de corales, en Tumaco y Coveñas en la orilla del mar, cerca a la desembocadura del principal efluente. En Leticia se tomó una muestra de agua del río Amazonas. En Guasca, Cachipay, Villapinzón y Prado se tomaron muestras de agua de río.

Procesamiento y análisis de muestras: las muestras de agua se tomaron según la técnica descrita previamente (14). Las gasas amarradas a una malla de alambre se sumergieron en el agua durante 24 horas y luego se transportaron en una bolsa de plástico hermética a temperatura ambiente.

Las gasas se incubaron durante seis a ocho horas en medio de enriquecimiento (agua peptonada alcalina, pH 8,4 a 37° C durante 6 a 8 horas). A continuación se realizó un conjunto de procedimientos y técnicas descritas previamente (15-31).

1. Selección preliminar: se llevó a cabo con medio tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) a 37° durante 18 a 24 horas. A todos los medios de cultivo se les añadió NaCl hasta una concentración final de 1%. De las 11 muestras de agua analizadas, se escogieron las colonias cuyas características morfológicas (colonias amarillas, de 2 a 4 mm ligeramente aplanadas) correspondían a las descritas para *Vibrio cholerae*.
2. Selección definitiva: los aislados obtenidos en la selección preliminar, se cultivaron en agar nutritivo para comprobar su pureza en un

medio no selectivo, y se les hicieron las siguientes pruebas (23): Gram, N,N dimetil 1,4 fenilendiamonio cloruro; 1 naftol, u oxidasa (Bactident-oxidasa, Merck), motilidad (método de tubo), indol (21), fermentación de glucosa (32), sensibilidad al fosfato de 2,4-diamino 6,7-diisopropilopteridina, O/129, usando la técnica de difusión en discos (DIFCO) de 150 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (25). Adicionalmente se realizó la prueba de la cuerda con desoxicolato de sodio al 0,5%. Estas pruebas permiten seleccionar algunas especies de vibrio.

Como controles positivos y negativos en todas las pruebas bioquímicas se utilizaron cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *S. typhimurium*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

3. Identificación preliminar: se llevó a cabo por medio de las pruebas recomendadas en el manual Bergey (24): deslizamiento en medio sólido, pigmentación, arginina dihidrolasa (33), reducción de nitratos (28), gas de glucosa, Voges Proskauer, crecimiento a 42° C, utilización de sacarosa, celobiosa, D- gluconato, á amino butirato y putrescina, todas ellas como única fuente de carbono. Se consideraron como probable *Vibrio cholerae* los aislados que coincidieron con un 75% o más de las características de esta especie.
4. Identificación definitiva: a los aislamientos obtenidos en la identificación preliminar se les hizo la prueba de aglutinación con antisuero polivalente 01 (DIFCO), siguiendo las indicaciones del fabricante. Todos los aislamientos estudiados resultaron negativos en la prueba de aglutinación y se les practicaron las siguientes pruebas de identificación, propuestas por APHA (1989): orto-nitrofosfogalactósido, ONPG (28), decarboxilación de aminoácidos (lisina y ornitina), crecimiento a 42° C, crecimiento sin NaCl, crecimiento con 3%, 6%, 8% y 10% de NaCl, fermentación de azúcares (ácido de L-arabinosa, m-inositol y sacarosa), producción de amilasa, gelatinasa y lipasa (34), utilización como única fuente de carbono de L-citrulina, etanol, D- glucuronato, L- leu-

cina y D-xilosa (29, 30,35). Los aislamientos que coincidieron en el 70% o más de las pruebas con las características de *Vibrio cholerae* se consideraron *Vibrio cholerae* no 01.

5. Pruebas complementarias: a los aislamientos identificados se les estudiaron, además de los ya indicados, requerimientos nutricionales de histidina, serina, ácido glutámico, manosa, galactosa y sorbitol (24) y la susceptibilidad a antibióticos por medio de la difusión en discos, en agar Mueller-Hinton (25). Se utilizaron los siguientes antibióticos: ácido nalidíxico (30 µg), polimixina B (300 u), ampicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), tetraciclina (30 µg) y gentamicina (10 µg).

Como control se utilizaron 10 cepas de *Vibrio cholerae* 01, El Tor, Inaba, recolectados durante el brote epidémico de 1991-1993, en diferentes lugares del país.

Toxina: la producción de enterotoxina colérica se estudió en los aislados identificados como *Vibrio cholerae* no 01, por medio de la técnica de VET-RPLA (Oxoid), aglutinación en látex, en dos medios de cultivo (36,37). Como control positivo se utilizaron tres cepas de *Vibrio cholerae* 01 obtenidas durante la fase epidémica. Como control negativo se utilizó *E. coli* HB101.

La presencia de genes que codifican la producción de toxina colérica se estudió por medio de sondas de DNA. Se utilizó la hibridación en colonias. Brevemente, las colonias se dejaron crecer en filtros de nitrocelulosa y se trataron con SDS-NaOH. El ADN desnaturalizado se fijó a 80° C en horno al vacío durante 2 horas (38). El DNA plasmídico se aisló de cepas de *E. coli* K₁₂C₆₀₀ que contenían el plásmido pEWD_{299'} clonado por otros grupos de investigación. Este plásmido fue digerido con la endonucleasa Hind III y los fragmentos separados por electroforesis en geles de agarosa para obtener la sonda (39) que se marcó radioactivamente con (alfa³²P) d ATP de 3.000 Ci mmol, mediante el procedimiento *Randon Primer* (United States Biochemical C) siguiendo las indicaciones del fabricante, y se purificaron por cromatografía. Los filtros se prehibridizaron y se hibridizaron a 42 ° C durante 14 horas, y se lavaron a 68° C en condiciones de alta rigurosidad (0,2 x SSC y 0,1 %

SDS). Los filtros se pusieron en contacto con una película de rayos X, que se reveló siguiendo las instrucciones del fabricante.

Resultados

Procesamiento de muestras: de las 11 muestras de agua se seleccionaron de manera preliminar 690 colonias cuyas características morfológicas correspondían a las descritas para *Vibrio cholerae*. La selección definitiva separó 49 aislamientos, 29 provenientes de Tumaco, 15 de San Andrés y 5 de Coveñas. La identificación preliminar redujo estos aislamientos a 19 y en la identificación definitiva se obtuvieron 4 aislamientos de *Vibrio cholerae* no 01, provenientes de Tumaco. La presencia de otros vibrios será examinada en otra publicación.

Pruebas bioquímicas y de crecimiento: en las tablas 1 y 2 se encuentran los resultados obtenidos en las pruebas de selección e identificación, con los cuatro aislamientos de *Vibrio cholerae* no 01. Estos resultados indican que las características bioquímicas de los cuatro aislamientos ya señalados están muy próximas a las de *Vibrio cholerae* y distantes de las de otros vibrios. En efecto, se presenta una alta concordancia entre los cuatro aislamientos, los *Vibrio cholerae* 01 autóctonos y las características que se atribuyen a las especies de *Vibrio cholerae* en los textos de referencia (15, 23, 24). Sin embargo, como era de esperar, hay también diferencias entre ellos.

En las tablas 1 y 2 se observa que los resultados de las pruebas realizadas a los aislados de *Vibrio cholerae* no 01 difieren con los obtenidos en las cepas epidémicas, pero no con el dato de los manuales de referencia (23, 24) en relación al requerimiento de Na⁺, la fermentación arabinosa, y la utilización de ácido propiónico; los resultados de los aislados no 01 coinciden con las cepas epidémicas, pero no con el dato de los manuales de referencia en las pruebas Voges Proskauer, crecimiento en NaCl al 6 y 8%, y utilización de galacturonato. Estos mismos aislados no 01, no coinciden con las cepas epidémicas ni con los datos de los manuales en las pruebas de ONPG, utilización amino butirato, celobiosa y sorbitol. De otra parte, los aislados no 01 presentan diversidad en los resultados en las siguientes pruebas:

Tabla 1. Resultados de las pruebas bioquímicas de aislados de *Vibrio cholerae*

Pruebas	Vibrio cholerae no 01 Aislamientos				Vibrio cholerae1 01	Vibrio cholerae 2
	001	012	013	021		
Producción arginina dihidrolasa		+	+	+	+	++
Producción lisina decarboxilasa	+	+	+	+	+	++
Producción ornitina decarboxilasa	+	+	+	+	+	++
Gas de glucosa						
Acido de m-inositol						
Acido de sacarosa	+	+		+	+	++
Voges Proskauer						+
ONPG					+	++
Crecimiento a 43 ° C	+	+	+	+	+	++
Requerimiento de Na ⁺					+	
Crecimiento con 3 % NaCl	+	+	+	+	+	++
Crecimiento con 6 % NaCl	+	+	+	+	+	
Crecimiento con 8 % NaCl	+	+	+	+	+	
Crecimiento con 10 % NaCl	+			+	+	
Citocromo oxidasa	+	+	+	+	+	++
Reducción de NO ₃ -	+	+	+	+	+	++
Inhibición por O/129(10 µg)			+		+	++
Inhibición por O/129(150 µg)	+	+	+	+	+	++
Deslizamiento en medio sólido						
Producción de amilasa	+	+	+	+	+	++
Producción de gelatinasa	+	+	+	+	+	++
Producción de lipasa	+	+	+	+	+	++
Utilización de sacarosa	+	+	+	+	+(9/10)	++
Utilización de xilosa				+		
Utilización de etanol		+	*		+(9/10)	
Utilización de glucuronato		+	*	+		
Utilización de putrescina	+	+	+		+(8/10)	
Utilización de a amino butirato	+	+	+	+		
Utilización de D-gluconato	+	+	+	+	+	++
Prueba de la cuerda	+	+	+	+	+	++
Indol	+	+	+	+	+	++
Fermentación de arabinosa					+	
Utilización de citrulina				+	*	
Utilización de celobiosa	+	+	+	+		
Pigmentación						
Utilización de leucina					-(9/10)	

† Positivo; - Negativo; * No se hizo

(1) Resultados obtenidos con 10 aislados de *Vibrio cholerae* 01, El Tor, Inaba, que fueron recolectados durante el brote epidémico de 1991-1993, en diferentes lugares del país. (9/10) indica que 9 de los 10 aislados dieron el resultado indicado; si no se indica, los 10 aislados dieron el mismo resultado.

(2) Resultados que se obtienen con aislados de *Vibrio cholerae* según el Manual Bergey y APHA (23,24) . Según estas fuentes: - (negativo); † (del 11 al 89 % de las cepas son positivas); †† (90 % o más de las cepas son positivas).

Tabla 2. Otros requerimientos nutricionales de los aislados de *Vibrio cholerae*

	<i>Vibrio cholerae</i> no 01				<i>Vibrio cholerae</i> ¹ 01	<i>Vibrio cholerae</i> ²
	Aislamientos					
	001	012	013	021		
Sorbitol	+	+	+	+	-	-
Galacturonato	+	+	+	+	+	-
Histidina	+	+	+	+	+	+
Serina	+	+	+	+	+(9/10)	+
Acido valérico	-	-	-	-	-	-
Acido propiónico	+	+	+	+	-	++
Manosa	+	+	+	+	+	+
Acido heptanoico	+	-	-	-	-	-
Acido glutámico	+	+	+	+	+(7/10)	++
Galactosa	+	+	+	+	+(9/10)	++
Acido a ceto glutárico	+	+	+	+	+	++

+ Positivo; - Negativo;

(¹) y (²): Ver Cuadro 1.

crecimiento en NaCl al 10 %, inhibición por O/129 (10 µg), utilización xilosa, etanol, glucuronato, putrescina, utilización citrulina y ácido heptanoico. En las demás pruebas se presentó una completa concordancia entre los resultados de los aislados no 01, de las cepas epidémicas y los datos de los manuales de referencia.

Susceptibilidad a los antibióticos: sólo dos de los cuatro aislados de *Vibrio cholerae* no 01 resultaron sensibles a la ampicilina. Estos mismos aislados mostraron resistencia a los demás antibióticos y los dos aislados restantes fueron resistentes a todos los antibióticos (tabla 3).

Toxina: los aislados de *Vibrio cholerae* no 01 resultaron negativos en la prueba de producción de toxina colérica y también negativos con respecto a la presencia de genes que pudieran codificar tal función.

Tabla 3. Susceptibilidad de aislados de *Vibrio cholerae* a los antibióticos

	<i>Vibrio cholerae</i> no 01			
	Aislamientos			
	001	012	013	021
Acido nalidíxico (30 µg)	R	R	R	R
Polimixina B (300 µg)	R	R	R	R
Ampicilina (10 µg)	S	S	R	R
Cloranfenicol (30 µg)	R	R	R	R
Tetraciclina (30 µg)	R	R	R	R
Gentamicina (10 µg)	R	R	R	R

R = Resistente; S = Sensible

Discusión

De las numerosas pruebas bioquímicas y de crecimiento que existen para identificar *Vibrio cholerae*, se consideran más significativas las siguientes (15): oxidasa [+], fermentación de glucosa sin producción de gas [+], fermentación de sacarosa [+], arginina dihidrolasa [-], lisina decarboxilasa [+], ornitina decarboxilasa [+], crecimiento en NaCl al 0 % y 1 % [+], Voges Proskauer [+], susceptibilidad al O/129 [+]. Como se planteó en los resultados, se presenta una alta concordancia en éstas y otras pruebas entre los cuatro aislados no 01, los aislados epidémicos y los datos de los textos de referencia. Sin embargo, hay una mayor probabilidad de encontrar diferencias dentro de una misma especie, cuando se trabaja con poblaciones bacterianas amplias. Esto se explica por la variedad genotípica y fenotípica, que puede existir entre las cepas 01 y no 01, en la especie de *Vibrio cholerae*, y entre las características de aquéllas y las que establecen los manuales de referencia, las cuales se plantean también como probabilidades poblacionales (23, 24).

A pesar de que esta variedad es reconocida y aceptada, conviene reseñar el alcance de algunas de las diferencias encontradas. *Vibrio cholerae* tiene un requerimiento bajo de Na⁺ y puede crecer con concentraciones inferiores a 0,1 mM, pues la presencia de otras sales puede asegurar su desarrollo. El sodio probablemente permite el correcto funcionamiento de los mecanismos de transporte y contribuye a mantener la estabilidad y actividad catalítica de las enzimas. Gran parte de

otros vibrios, que son más halófilos, requieren concentraciones de 100 mM o más de Na⁺ (24).

La capacidad de utilizar celobiosa (40,41), la putrescina y otros elementos, se considera una característica típicamente fenotípica y, por tanto, puede presentarse variación. Por el contrario, las diferencias encontradas con respecto a la ONPG y la sensibilidad al O/129 (10 μg) parecen deberse a características atípicas para las cuales no hay explicación.

Con frecuencia se ha reportado sensibilidad de *Vibrio cholerae* a gran parte de los antibióticos (15-24, 42-46), pero también se ha reportado resistencia (47, 48). La amplia resistencia encontrada tiene una importancia no despreciable, pues este hallazgo indica que se trata de bacterias con un potencial patógeno considerable. Por fortuna es posible descartar la capacidad y el potencial toxigénico en estas bacterias. La amplia resistencia llama la atención sobre la necesidad de buscar poblaciones bacterianas con plásmidos R que transmiten esta característica por conjugación (49).

La identificación de cuatro aislados de *V. cholerae* no 01 plantea una problemática que requiere de análisis. En las aguas marinas tropicales de las costas atlántica y pacífica de Colombia se dan, en general, condiciones apropiadas de temperatura y salinidad para el desarrollo de esta bacteria. Sólo ciertas condiciones son desfavorables para el desarrollo de *V. cholerae* en aguas marinas, como una salinidad de 35 ppt y temperaturas elevadas de 28 a 30 °C o más (50, 51). Pero, se ha señalado que aún en tales condiciones desfavorables *V. cholerae* puede permanecer viable en estado de latencia pero no ser cultivable en los medios estándares (8, 50) y, por tanto, no ser detectable.

No es posible demostrar de manera fehaciente, ni descartar la presencia de *V. cholerae* no 01 antes del brote epidémico en el país, por carencia de estudios al respecto. Sin embargo, a pesar de que los esporádicos monitoreos de aguas marinas no tenían como objetivo esta bacteria, hasta antes de iniciarse la epidemia no se había reportado *V. cholerae*. De otra parte, los escasos análisis de agua realizados por entidades oficiales con muestras de agua tomadas de efluentes y estuarios, en Tumaco

y otros sitios, al comienzo de la epidemia y durante la misma, resultaron negativos para *V. cholerae*. En tercer lugar, las evidencias obtenidas por los métodos de epidemiología molecular no favorecen la tesis de un antecedente no 01 de las cepas toxigénicas y epidémicas (16). Todo esto indicaría que la presencia de *V. cholerae* no 01, puede ser resultado de la transformación de cepas toxigénicas o epidémicas y de su adaptación al medio ambiente, o que las bacterias no 01 arribaron a nuestro medio por un mecanismo similar al que utilizó *V. cholerae* 01, igualmente desconocido.

Cualquiera que haya sido el proceso y mecanismo, la presencia de este tipo de bacterias permite formular la hipótesis de que se está conformando un reservorio ambiental. Este hecho tiene una importancia epidemiológica precisa. De acuerdo con la experiencia obtenida en otros continentes, en una epidemia de cólera que tiene lugar en un área previamente no infectada se encuentra que, entre otras características, la transmisión se produce de un modo simple y no son comunes los reservorios ambientales. En contraste, en el cólera endémico la transmisión se produce por múltiples medios y es posible encontrar reservorios acuáticos (10). Por tanto, la presencia de cepas de *Vibrio cholerae* no 01 en el agua puede indicar que se están conformando reservorios ambientales y que, después de la primera onda epidémica, se están creando las condiciones para una situación de tipo endémico. Por tanto, parece indispensable realizar estudios que permitan confirmar este proceso y vigilar su desarrollo.

Agradecimientos

A la doctora Elizabeth Castañeda, del Instituto Nacional de Salud, por las cepas de *Vibrio cholerae* 01. Al doctor Felipe Cabello, del New York Medical College, por la cepa de *E. coli* para obtener las sondas.

Referencias

1. Colwell R.R., Seidler, R.J., Kaper, J. et al. 1981. Occurrence of *Vibrio cholerae* serotipo 01 in Maryland and Louisiana estuaries. *Appl. Envir. Microbiol.* 41, 555-558.
2. Guthrie R.K. and Scovill M.A. 1984 Recovery of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* from aquatic microcosms. *Wat. Res.* 18, 1055-1057.

3. Hood M.A., Ness G.E., Rodrick G.E. *et al.* 1983 Distribution of *Vibrio cholerae* in two Florida estuaries. *Microb. Ecol.* 9, 65-75.
4. Kaper J., Lockman H., Colwell R.R. *et al.* 1979 Ecology, serology, and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 91-103.
5. Kodama H., Gyobu Y., Tokuman, N. *et al.* 1984 Ecology of non-O1 *Vibrio cholerae* in Toyama Prefecture. *Microbiol. Immun.* 28, 311-325.
6. Lee J.V., Bashford D.J., Donovan T.J. *et al.* 1982 The incidence of *Vibrio cholerae* in water, animals and birds in Kent, England. *J. Appl. Bact.* 52, 281-291.
7. West P.A. and Lee J.V. 1982 Ecology of *Vibrio* species, including *Vibrio cholerae* in natural waters of Kent, England. *J. Appl. Bact.* 52, 435-448.
8. Baker R.M., Singleton F.L. and M.A. Hood. 1983 Effects of nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 930-940.
9. Fujioka R.S., Hashimoto H.H., Siwak E.B. *et al.* 1981 Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 690-696.
10. Agudelo CA. 1994 Cólera en Colombia. *Colombia. Ciencia y Tecnología.* 12, 3-5.
11. Castañeda E., Muñoz N., de Vargas C. *et al.* Diagnóstico bacteriológico del cólera. *Biomédica*, 12 (3 y 4): 131-136.
12. Ramamurthy T., Garg S., Sharma R. *et al.* 1993 Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India. *Lancet*, 341 (8846): 703-704.
13. Albert M.J., Ansaruzzaman M., Bardhan P.K. *et al.* 1993 A large epidemic of cholera-like disease in Bangladesh caused by *Vibrio cholerae* O139. *Lancet*, 342: 387-390.
14. Dutka B., 1991. Microbiological and Toxicity Methods. Ministry of the Environment. National Water Research. Institute Burlington, Ontario.
15. CDC/NCID. Laboratory Methods for the Diagnosis of *Vibrio cholerae*.
16. Wachsmuth K.I., *et al* 1993. The molecular epidemiology of cholera in Latin America. *J. Infect. Dis.* 6, 621-626.
17. Kaper, J.B. *et al* 1981. Molecular characterization of environmental and nontoxicogenic Strains of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 32 (2): 661-667.
18. Chen, F. *et al* 1991. Genetic diversity among toxigenic and nontoxicogenic *Vibrio cholerae* O1 isolated from the Western hemisphere. *Epidemiol. Infect.* 225-233.
19. Kaper, J.B., Bradford, H.B., Roberts, N.C. Falkow, S. 1982. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* in the U.S. Gulf Coast. *J. Clin. Microbiol.* 16 (10): 129-134.
20. Kay, *et al.* 1984 *Vibrio cholerae* non O1 isolated from five people with diarrhea in Lima. *Lancet* ii 218.
21. Venkateswaran, K., Takai, T., Navarro, I.B. Nakano, H., Hashimoto, H., and Siebeling, R.J. 1989. Ecology of *Vibrio cholerae* non-O1 and *Salmonella* spp. and role of zooplankton in their seasonal distribution in Fukuyama coastal waters, Japan, *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1591-1598.
22. Islam MS. *et al.* 1994. Isolation of *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal from the aquatic environment in Bangladesh: implications for disease transmission. *App. Env. Microbiol* 60 (5): 1684-1686.
23. American Public Health Association, American Water Works Association and the Water Pollution Control Federation and the water Pollution Control Federation, *Standad Methods for the examination of water and waste water.* 18th ed. Washington, D.C. American Public Health Association 1989.
24. Holt, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Williams and Wilkins, Baltimore. Volume 1, 1984.
25. Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., 1966. Antibiotic suceptibility testing by standardized single disk method. *A.J.Clin. Pathol.* 45: 493.
26. Finkelstein, R.A., *et al* 1992. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation virulence, and detachment. *Infect. Immun.* 60 (2): 472-478.
27. Ratner S. and O. Rochouansky. 1956 *Arch. Biochem. Biophys.* 63, 277.
28. Mac Faddin. 1980. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires.
29. Lee J.V. *et al* 1981. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis*. *The Journal of Applied Bacteriology* 1, 73-94.
30. Stainer R. Y. Palleroni N.J. and M. Duodoroff. 1966. The Aerobic *Pseudomonas*: A taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* 43, 159-271.
31. Merck, 1990. Manual de Medios de Cultivo.
32. Mossel, D.A.A. *et Marting.* 1961 Milieu simplifié permettant l'étude des divers modes d'action des bacteries sur les hydrates de carbone. *Ann. Inst. Pasteur de Lille*, 12, 225-226.
33. Thornley, M.J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram negative on the basis of arginine metabolism. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 37-52.
34. Cowann S.T. Steel K.J. 1979. Manual para la identificación de bacterias de importancia médica 2a. Ed. Compañía Editorial Continental S.A. México.
35. Stainier R. y Ingraham J.L. Wheelis M.L. Painter P.R. *The Microbial World* 5a. Ed 1986. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
36. Almeida R.J., Hickman-Brenner F.W., Sowers, E.G., Pühr N.D., Farmer III J.J. and Wachsmuth I.K. 1990 Comparison of a latex agglutination assay and an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting cholera toxin. *J. Clin. Microbiol.* 28, 128-130.

37. Dubey R.S., Lindblad M. and Holmgren J. 1990 Purification of El Tor cholera enterotoxins and comparisons with classical toxin. *J. General Microbiol.* 139, 1839-1847.
38. Grunstein M. and Hogness D.S. 1975 Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72, 3961-3965.
39. Moseley S.L. 1982 Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* by colony hybridization using three enterotoxin gene probes. *J. Infect. Dis.* 145, 863-869.
40. Burke A., et al. 1986 Investigation of cholera acquired from the riverine environment in Queensland. *Medical Journal of Australia* 144, 229-234.
41. Desmarchelier P and J.L. Reichelt, 1981. Phenotypic characterization of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* from Australia. *Current Microbiology.* 5, 123-127.
42. Janda, J.M. et al 1988. Current perspective on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 1, 245-267.
43. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. Colera 1991. Serie de Notas e informes técnicos No. 19.
44. Brock TD, Madigan MT. *Biology of Microorganisms* 6a. Ed. 1991. Prentice Hall Engelwood Cliffs. New Jersey.
45. Mostow, P., Richardson, K. 1990. High Frequency of spontaneous mutation of classical *Vibrio cholerae* to a nonmotile phenotype. *Infect. Immun.* 58 (1): 3633-3639.
46. Cook, W.L. et al. 1984. Persistence of plasmids, cholera toxin genes, and Prophage DNA in classical *Vibrio cholerae*. *Infect Immun.* 45 (1): 222-226.
47. Ouellette, M. et al. 1988. Genetic, biochemical and molecular characterization of strains of *Vibrio cholerae* multiresistant to antibiotics. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 105-113.
48. Amaro, C. et al. 1988. R. Plasmids in environmental *Vibrio cholerae* non-01 Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (11): 2771-2776.
49. Barja, J.L. et al. 1990. Plasmids and factors associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae* non-01 in Bangladesh. *J. Med. Microbiol.* 33, 107-114.
50. Rojas Y.A. and Hazen T.C. 1989 Survival of *Vibrio cholerae* in treated and untreated rum distillery effluents. *Wat. Res.* 23 (1): 103-113.
51. Rivera S., Lugo T. and Hazen T.C. 1989 Autoecology of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in tropical waters. *Wat. Res.* 23 (7): 923-931.