

Aislamiento de *Vibrio* sp en pescado fresco del mercado de La Viga en México, D.F.

Rosario de la Rosa Gallegos*
José Fernando Núñez Espinosa*
Leandra Mireya Nicoli Tolosa*

Resumen

Con el objetivo de aislar e identificar *Vibrio cholerae* 01 de pescados frescos del centro distribuidor La Viga en México, D.F., se analizaron 120 pescados de tres especies: Lisa (*Mugil cephalus*), sierra (*Scomberomorus maculatus*) y bagre (*Arius* sp). El tamaño de la muestra se determinó por conveniencia. Las muestras fueron analizadas mediante las técnicas descritas por el Método Microbiológico Internacional de la Food and Drugs Administration (FDA). Se observó una gran cantidad de vibrios sp, pero se aisló *Vibrio cholerae* 01. Diez pescados tuvieron vibrios que producen algún tipo de infección: *Vibrio cholerae* no-01, *V. harveyi* y *V. vulnificus*. Estos fueron aislados de 4 bagres y 1 lisa procedentes de Nayarit, Guerrero, Tamaulipas y Campeche; 2 sierras y 1 bagre procedentes de Tamaulipas y 2 bagres, uno de Tamaulipas y el otro de Campeche. Fue significativo identificar otros tipos de vibrios, también importantes, por el hecho de estar asociados a *Vibrio cholerae* y por ser capaces de producir daños serios al hombre.

Introducción

Desde tiempos remotos, el cólera ha sido una enfermedad muy común y por la cual muchas personas han muerto.^{9,12,17}

El cólera es una infección gastrointestinal aguda, grave, que se caracteriza por la aparición brusca de diarrea acuosa y abundante, vómitos, deshidratación rápida, acidosis, colapso circulatorio y en los casos no tratados se produce la muerte dentro de las 24 horas de su aparición.^{27,29,33,34}

La enfermedad es producida por una bacteria del género *Vibrio*, que pertenece a la familia Vibrionaceae, que incluye los géneros: *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*.¹⁰

Actualmente existen más de veinte especies de *Vibrio*,

de las cuales sólo 12 se han encontrado en muestras clínicas humanas.^{1,7,26} El *Vibrio cholerae* 01 penetra a la mucosa del intestino delgado y coloniza el epitelio, a partir de aquí se multiplican los gérmenes que producen una exotocina causante de diarrea. La toxina colérica se combina con los receptores de la mucosa y afecta al Adenosin de Monofosfato (AMP) cíclico. Su acción estimula la secreción de agua y electrolitos de la mucosa intestinal principalmente a nivel del duodeno. Esta secreción de líquidos produce la intensa diarrea característica de la enfermedad.^{21,26,34}

Las bacterias del género *Vibrio* son bacilos Gramnegativos que miden de 0.5 a 0.8 μ de diámetro por 1.4-2.6 μ de largo, son móviles en medios líquidos por su flagelo polar, anaerobios facultativos, no forman endosporas, con metabolismo respiratorio fermentativo y quimiorganotrofos.^{3,10,16} Se encuentran en hábitats acuáticos con diferentes grados de salinidad, también se pueden encontrar en agua dulce, en donde sobreviven unas horas y algunas semanas si ésta se encuentra contaminada con materia orgánica y tiene un pH entre 6 y 9.^{2,6,8} Todos utilizan D-glucosa, D-fructuosa, Maltosa y Glicerol. La mayoría de las especies son oxidasa-positivas. Esta bacteria es frágil y sensible a desinfectantes como el cloro, a la ebullición, a la desecación y a los antibióticos como las tetraciclinas.^{14,17,19}

Vibrio cholerae 01 y no-01 son especies patógenas para el hombre y para animales marinos, se han encontrado en muestras clínicas humanas. El *Vibrio cholerae* 01 incluye dos clases de biotipos, el clásico y la variante El Tor. Los dos biotipos se encuentran separados en dos serotipos principales: El Ogawa y el Inaba y raramente el Hikojima.¹⁰

El reservorio natural es el hombre; el cólera se mantiene siguiendo un ciclo de transmisión hombre-medio ambiente-hombre.

La dosis infectante en el humano es de cerca de 10^8 - 10^{10} bacterias vivas por gramo.²⁵ El periodo de incubación puede ser de horas hasta un promedio de 2 a 5 días.^{20,24,25}

La transmisión se realiza por la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas con diarrea o vómitos de enfermos. Una de las barreras que tienen los seres hu-

Recibido para su publicación el 31 de marzo de 1993.

* Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. 04510 México, D.F.

manos frente al ingreso de gérmenes por la vía oral es la acidez gástrica; cuando ésta se encuentra disminuida, la bacteria prolifera más fácilmente. El cólera clínico generalmente está limitado a los grupos socioeconómicos más bajos.^{26,27,33}

La infección provoca una respuesta serológica significativa de anticuerpos aglutinantes, vibriocidas y antitóxicos, y una mayor resistencia a la reinfección, que es más duradera contra el serotipo homólogo. En las zonas endémicas, la mayoría de las personas adquieren anticuerpos al principio de la edad adulta, por eso es común que ataque a niños entre 2 y 9 años. La inmunidad activa parcial a la enfermedad es inducida por vacunas anticoléricas, pero la protección dura alrededor de 6 meses y no evita la infección asintomática.^{4,14,18,28}

Durante mucho tiempo se mantuvo la creencia de que el pez era portador de la infección vibriónica en el medio marino, pero trabajos recientes han demostrado que se puede aislar fácilmente el germen de los distintos invertebrados marinos y bentónicos.²²

Los peces que viven en las profundidades del mar, sin estar infectados dentro de su propio hábitat, pueden llegar a contaminarse durante el proceso de pesca y manipulación posterior. Se ha observado que los animales marinos próximos a la costa, se contaminan con los desechos humanos vertidos en ellos. El hecho de que los pescados se conserven congelados, no significa que el *V. cholerae* esté muerto, ya que puede sobrevivir por largo tiempo en estas condiciones.²³ Teóricamente estos alimentos poseen un alto riesgo de infección si el producto es ingerido crudo o si hay contaminación cruzada con otros alimentos.^{10,11,25,30,35}

Cuando en una comunidad existe la enfermedad y no hay un adecuado control de las aguas negras, éstas pueden contener la bacteria y contaminar el mar y, como consecuencia, a los productos marinos. Por lo tanto, los mariscos crudos o mal cocidos, que proceden de áreas marítimas contaminadas, pueden ser responsables de epidemias.²⁶

Existe preocupación por el consumo de productos pesqueros contaminados con el *Vibrio cholerae*, así como de pescados congelados, refrigerados o enfriados con hielo, ya que el tiempo de supervivencia del *V. cholerae* biotipo El Tor en pescados y mariscos frescos, es de 2 a 5 días a 30-32°C y, de 4 a 14 días a 5-10°C.^{22,25,33}

La venta de alimentos en la vía pública, práctica tradicional en México, propicia la contaminación microbiana debido a la falta de higiene personal de los vendedores, habilitación escasa, uso de utensilios inapropiados, acumulación de basura, falta de agua potable y servicios sanitarios, lo que ocasiona brotes de enfermedad transmitida por alimentos, como es el caso de cólera.

De acuerdo con el número de casos clínicos de cólera registrados en México, según las investigaciones epidemiológicas, los alimentos no son considerados la fuente principal de contaminación; sin embargo, en algunos productos alimenticios como es el caso de los pescados y mariscos, cuyo hábitat se ve afectado por las descargas de aguas negras, aumenta la probabilidad de

riesgo. Por lo que se intentó aislar, identificar y determinar la frecuencia de *Vibrio cholerae* 01 en las muestras de pescados frescos trabajados.

Material y métodos

Ubicación de espacio y tiempo

El presente trabajo se realizó en el Centro Distribuidor de Pescados y Mariscos La Viga, localizado en Calzada de la Viga 124, Delegación Venustiano Carranza, en México, D.F.; entre abril y agosto de 1992.

Universo de trabajo.

Se trabajó con 120 pescados crudos de las especies: lisa (*Mugil cephalus*), sierra (*Scomberomorus maculatus*) y bagre (*Arius* sp); provenientes de aguas costeras, aunque la tercera también se encuentra en aguas profundas; todas con gran demanda en el mercado.

Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra se determinó por conveniencia,⁵ debido a que en México se carece de información sobre alimentos contaminados con *Vibrio cholerae* 01.

Los criterios de selección fueron:

- Elegir las especies de pescados con mayor demanda, durante todo el año.
- Considerar especies procedentes de las zonas marítimas con alto riesgo de contaminación con aguas negras.
- Tomar un pescado de cada especie en 40 locales de la Viga.

$$\frac{120 \text{ pescados}}{3 \text{ especies}} = 40 \text{ muestras de cada especie,} \\ 3 \text{ de cada local}$$

Toma de muestras

Los locales se seleccionaron con base en un diseño de muestra sistemático,^{13,32} identificándolos en un plano del mercado de La Viga. Los pescados se tomaron de la capa más superficial del producto estibado y enfriado con hielo. Se depositaron en bolsas de plástico individuales, identificadas con la siguiente información:

- Fecha de recolección.
- Número del local.
- Nombre del producto.
- Procedencia de captura.

Para el transporte de las muestras se usaron cajas isotérmicas con refrigerante, mantenidas a menos de 10°C; el tiempo de transporte fue menor a 3 horas. Se enviaron al Laboratorio de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Análisis bacteriológico

Las muestras fueron analizadas según el Método Microbiológico Internacional de la FDA⁴ para identificación de *Vibrio cholerae* (Figura 1), (Cuadro 1).

Cuadro 1 PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA DIFERENCIACION DE ALGUNAS ESPECIES DE <i>Vibrio</i> SP.			
Pruebas bioquímicas	<i>V. Cholerae no-01</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. harveyi</i>
TCBS	A	V	A/V
mCPC	P	A	Sin de- terminar
Oxidasa	R(+)	R(+)	R(+)
TBI	R(+)	R(+)/R(-)	R(+)/R(-)
LIA	R(+)	R(+)	R(+)
MIO	R(+)	R(+)	R(+)
SIM	R(+)	R(+)	R(+)
Arginina	R(-)	R(-)	R(-)
Urea	R(-)	R(-)	R(-)
Indoi	R(+)	R(+)	R(-)
Voges Proakauer	R(+)/R(-)	R(-)	R(+)/R(-)
Orec en NaCl			
0%	R(+)	R(-)	R(-)
3%	R(+)	R(+)	R(+)
6%	R(-)	R(+)	R(+)
8%	R(-)	R(-)	R(+)/R(-)
10%	R(-)	R(-)	R(+)/R(-)
Crec a 42°C	R(+)	R(+)	R(+)/R(-)
Dubitol	R(-)	R(-)	R(-)
Manitol	R(+)	R(+)/R(-)	R(+)
Sacarosa	R(+)	R(-)	R(+)
Lactosa	R(-)	R(+)	R(+)/R(-)
Colonias	Total 5	Total 2	Total 3

A= Amarillo R(+)= Positivo
V= Verde R(-)= Negativo
P= Púrpura

Las cepas aisladas e identificadas a partir de las pruebas bioquímicas,²⁵ se enviaron al Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) "Dr. Manuel Martínez Báez" para su serotipificación.

Resultados

A partir de los 120 pescados analizados se determinaron 10 (100%) cepas de *Vibrio* sp, de las cuales 5 (50%) fueron *V. cholerae* no-01, 3 (30%) *V. harveyi* y 2 (20%) *V. vulnificus*.

El 40%⁴ de las cepas de *V. cholerae* no-01 fueron aisladas de Bagres y el 10%¹ de Lisa. Los pescados Bagres procedían de las costas de Nayarit, Guerrero y La Pesca, Tamaulipas; la Lisa procedía de Campeche.

De las 3 (30%) cepas de *V. harveyi*, 2 (20%) fueron aisladas de pescados de Sierra, procedentes de San Fer-

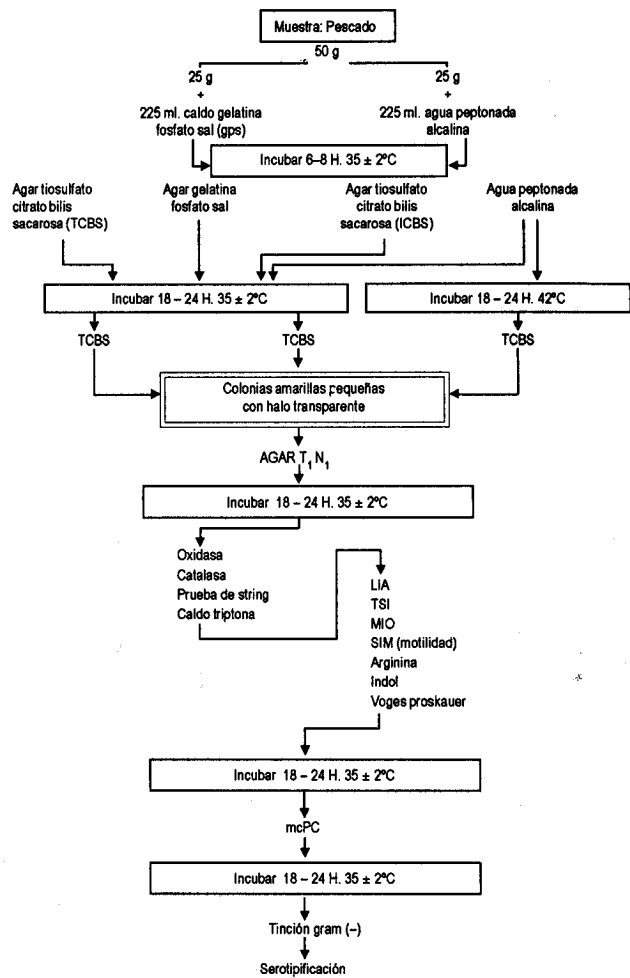


Figura 1. Aislamiento *Vibrio cholerae*

nando, Tamaulipas; y 1 (10%) fue aislada de Bagre procedente de Matamoros, Tamaulipas.

Finalmente, 2 (20%) cepas de *V. vulnificus* fueron aisladas de Bagres, con distintas procedencias; uno de La Pesca, Tamaulipas y el otro de Campeche (Cuadro 7).

Se usaron dos medios de aislamiento:

1. Aislamiento en agar de tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS), en el cual crecieron 3,840 colonias típicas a *V. cholerae* a una temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$, y 144 colonias a 42°C , lo que dio un total de 3,984 colonias (Cuadro 2).
2. Aislamiento en agar triptona al 1% y cloruro de sodio al 1% ($T_1 N_1$) 178 colonias no crecieron (Cuadro 3).

El porcentaje de pescados por especie, sospechosos a *V. cholerae* fue:

El 75% (30/40) de bagres; el 72.5% (29/40) de lisas y el 72.5% (29/40) de sierras (Cuadro 4).

Según las pruebas bioquímicas se consideran dos fases: En la primera fase, de 3,806 colonias aisladas del medio $T_1 N_1$ se obtuvieron 453 colonias sospechosas a *V. cholerae*. Estas colonias son representativas de 88 muestras (Cuadro 5).

El 94.44% (34/36) de colonias típicas a *V. cholerae*, fueron aisladas de siembra de agar modificado de

Cuadro 2
NUMERO DE COLONIAS CON MORFOLOGIA TIPICA
A *Vibrio cholerae* AISLADAS EN TCBS A PARTIR DE 120
MUESTRAS

Número de muestras	Núm. de colonias GPS/Agua pept. (35 + 2°C)	Núm. de colonias Agua peptonada (42°C)	Total
120	3,840	144	3,984

Cuadro 3
NUMERO DE COLONIAS TIPICAS A *Vibrio cholerae*,
DE 3,984 COLONIAS SEMBRADAS EN MEDIO T₁ N₁

Aislamiento Siembra	%	No aislamiento Siembra	%
3,806	95.53	178	4.46
3,984		3,984	

Cuadro 4
PORCENTAJE DE PESCADOS POR ESPECIE
SOSPECHOSOS A *Vibrio cholerae*

Especie	Muestras	Sospechosos a <i>V. cholerae</i>	%
Bagre	40	30	75.00
Lisa	40	29	72.50
Sierra	40	29	72.50
Total	120	88	73.33

celobiosa-polimixina B-colicitina (mCPC) (Cuadro 6).

Según la tinción Gram, el 3.6% (10/36) fueron cepas Gram (-) (Cuadro 6).

En cuanto a la relación de aislamientos con procedencia de captura y serología para *Vibrio cholerae* 01, se observó que ninguna de las 10 cepas correspondió a *V. cholerae* 01 (0%), en tanto que cinco de las 10 cepas (50%), fueron positivas a *V. cholerae* no-01 (Cuadro 7).

Discusión

Del estudio realizado en el mercado de La Viga, en México, D.F., no se aisló *Vibrio cholerae* 01 en muestra alguna. Sin embargo, sí se encontraron otras especies de vibrios igualmente importantes para el hombre, como es el caso del *Vibrio cholerae* no-01, causante de gastroenteritis, infecciones en heridas, septicemias primarias y secundarias, y otitis. El *V. vulnificus* produce gastroenteritis, infecciones en heridas y septicemia mortal en personas con enfermedades hepáticas (cirrosis) u otras enfermedades como diabetes. El *V. harveyi* causa gastroenteritis.¹⁵

Cuadro 5
PRUEBAS BIOQUIMICAS POSIBLES
PARA LA DETERMINACION DE *Vibrio cholerae*

PRIMERA FASE

Prueba bioquímica	Reacción	Col. Sospechosas a <i>V. cholerae</i> /Total	%	Muestras de pescados (+) /Total	%
Caldo triptona (0% NaCl)	+				
Oxidasa	+	453/3,806	11.90	88/120	73.33
Catalasa	+				
"String"*	+				

*Pba. de hilo mucoso (Desoxicolato).

SEGUNDA FASE

Prueba bioquímica	Reacción	Col. Sospechosas a <i>V. cholerae</i> /Total	%	Muestras de pescados (+) /Total	%
TSI	+				
LIA	+				
MIO	+	36/453	7.94	43/88	49.42
SIM (motilidad)	+				
Arginina	-				
Indol	+				
Voges	+/-				
Pros-Kauer					

Cuadro 6
PRUEBAS COMPLEMENTARIAS POSIBLES SEGUN
CARACTERISTICAS TIPICAS DE LA COLONIA,
PARA LA DETERMINACION DE *Vibrio cholerae*
COLONIA TIPICA/TOTAL DE COLONIAS

Prueba	Colonia típica/total de colonias	%
m CPC	34/36	94.44
Tinción Gram (-)	10/36	3.6

Es importante señalar que el *V. cholerae* no-01 se encuentra con frecuencia en el agua de los estuarios, así como en pescados y mariscos, más que el serotipo 01.¹⁵

Según Thrusfield,³¹ la probabilidad de fracaso para detectar casos en una población, cuando la prevalencia es de 1%, es de 0.366 = 3.6%, trabajando con 100 muestras; por lo que será necesario seguir investigando, al respecto, con muestras más grandes, puesto que todavía la prevalencia no se conoce y pudiera ser muy baja.

Cabe mencionar que las más altas tasas de mortali-

Cuadro 7
POSITIVIDAD A *Vibrio cholerae* 01 SEGUN SEROLOGIA (AGLUTINACION EN PLACA)

Núm. de muestras trabajadas	Especie	Procedencia	Local	Pruebas bioquímicas		Prueba de aglutinación en placa			
				V. <i>Vulnificus</i> %	V. <i>harveyi</i> %	V. <i>cholerae</i> %	V. <i>cholerae</i> no-01 %	%	
2	Bagres	Nayarit	48-C			-	0	2	
1	Bagre	Guerrero	32-A			-	0	1	50
1	Bagre	La Pesca, Tamps.	29			-	0	1	
1	Lisa	Campeche	1			-	0	1	
2	Sierras	Sn. Fdo., Tamps.	17		2		0		
1	Bagre	Matamoros, Tamps.	39-A		1	30	-	0	
1	Bagre	La Pesca, Tamps.	29	1			-	0	
1	Bagre	Campeche	1	1	20		-	0	
Total 10									

dad por *V. cholerae* 01 en el país se han dado en los estados de Morelos, Tamaulipas y Campeche;²⁷ coincidentemente, 5 de las 10 muestras positivas a vibrios sp provenían del estado de Tamaulipas y 2 de Campeche, por lo que no sería difícil pensar que el *V. cholerae* 01 pudiera estar presente.

En México todavía no se han registrado casos de aislamiento de *V. cholerae* 01 en alimentos, lo cual posiblemente se deba a que los hábitos gastronómicos difieren de los de otros países.

La educación para la salud se fortalece gracias al programa de control que están llevando a cabo la Secretaría de Salud y el Grupo Especial de Lucha Mundial contra el cólera, que incluye la elaboración de normas técnicas, presentación de documentales, anuncios por diversos medios de comunicación, asesorías a médicos y maestros, así como de capacitación a personal de la misma Secretaría, para recomendar diversas formas de prevenir posibles brotes de esta enfermedad.

La llegada del cólera a un país trae consigo problemas económicos y políticos.

Los ingresos por turismo internacional y exportaciones de pescados y mariscos sufren reducciones y se desencadenan reacciones de temor e incluso pánico entre la población local. Si un gobierno es incapaz de prepararse para contender con un brote y tomar acciones rápidamente en cuanto éste se presente, puede producirse un retraso importante en la investigación e identificación temprana de las formas o vehículos de transmisión, así como en la instrumentación de medidas de control y el aprovisionamiento de ayuda internacional. Estos esfuerzos requieren un amplio apoyo gubernamental no sólo de las autoridades sanitarias, sino también de otras dependencias con autoridad en materia de agua, servicios sanitarios, desarrollo urbano, finanzas, transporte y comercio.

Ya que no existe ninguna forma de erradicar al vibrio del ecosistema acuático, en lo futuro el control debe enfocarse hacia la prevención, para evitar la transmisión secundaria; además deberá procurarse la accesibilidad del tratamiento y el desarrollo de una vacuna efectiva.

Abstract

By means of techniques accounted by the International Microbiological Method of the FDA for identification of *Vibrio cholerae*, the procedure in this study pretended to isolate and identify *Vibrio cholerae* 01 in three fish species of great demand in a common fish market in Mexico City. Results were negative, but other kinds of *Vibrio* sp, such as *Vibrio cholerae* Non-01, *Vibrio harveyi* and *Vibrio vulnificus*, were determined. These *Vibrio* species were isolated from species captured in the states of Tamaulipas, Campeche, Guerrero and Nayarit in Mexico. Identifying other species of *Vibrio* is also important, due to the *Vibrio cholerae* association and its impact on human health.

Literatura citada

1. Alm, R.A. and Manning, P.A.: Biotype-specific probe for *Vibrio cholerae* serogroup 01. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 823-824 (1990).
2. Brayton, P.R., Tamplin, M.L. and Colwell, R.R.: Enumeration of *Vibrio cholerae* 01 in Bangladesh waters by fluorescent-antibody direct viable count. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 1865-1862 (1987).
3. Finch, M.J., Valdespino, J.L. and Wells, J.G.: Non-01 *Vibrio cholerae* infections in Cancun, Mexico. *J. Trop. Med. Hyg.*, 36: 393-397 (1987).
4. Food and Drug Administration: Bacteriological Analytical Manual. *F.D.A. Bureau of Foods*, Division of Microbiology, Washington, D.C., 1991.
5. Guerrero, R.G.C. y Medina, E.: Epidemiología. 2a ed. *Fondo Educativo Interamericano*, México, D.F., 1986.
6. Hackney, C.R. and Dicharry, A.: Seafood-born bacterial pathogens of marine origin. *Food Technol.*, 1: 104-108 (1988).
7. Haishima, Y., Kondo, S. and Hisatsune, K.: O-antigenic lipopolysaccharides isolated from a marine *Vibrio*, bio-serogroup 1875 possessing an antigenic factor in common with 01 *Vibrio cholerae*. *J. Gen. Microbiol.*, 134: 1827-1833 (1988).
8. Islam, M.S.: Effect of various biophysicochemical conditions on toxigenicity of *Vibrio cholerae* 01 during survival with a green algae *Rhizoclonium fontanum*, in an artificial aquatic environment. *Can. J. Microbiol.*, 36: 464-468 (1990).

9. Kaysner, Ch. A., Wekell, M.M. and Stott, R.F.: Incidence of *Vibrio cholerae* from estuaries of the United States west coast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 1344-1348 (1987).
10. Krieg, R.N., Murray, G.E.R., Brenner, J.D., Bryant, P.M., Holt, G.J., Moulder, W.J., Pfennig, N., Sneath, H.A.P., Stanley, T.J. and Williams, T.S.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins*, Baltimore, Maryland, 1984.
11. Kuyakanond, T., Nakamura, S., Manmontri, W. and Iwanaga, M.: *Vibrio cholerae* serogroup 01 in northeast Thailand. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 872-875 (1990).
12. Maimone, F., Coppo, A. and Procacci, P.: Clonal spread of multiple resistant strains on *Vibrio cholerae* 01 in Somalia. *J. Infect. Dis.*, 153: 802-803 (1986).
13. Mendenhall, W.: *Introduction to Probability and Statistics*. 5th ed. *Wadsworth International Iberoamericana*, New York, 1982.
14. Mitra, S., Ghosh, A. and Ghosh, R.K.: Metabolic reactions responsible for glucose stimulation of alkaline phosphatase in *Vibrio cholerae*. *J. Gen. Microbiol.*, 132: 2601-2603 (1986).
15. Mitscherlich, E. and Marth, E.H.: *Microbial Survival in the Environment. Bacteriae and Rickettsiae Important in Human and Animal Health*. *Springer-Verlag*, Berlin, 1984.
16. Mulder, G.D., Ries, T.M. and Beaver, T.R.: Non-toxicogenic *Vibrio cholerae* wound infection after exposure to contaminated lake water. *J. Infect. Dis.*, 159: 809-810 (1989).
17. Ogg, J.E., Ryder, R.A. and Smith, R.H.L.: Isolation of *Vibrio cholerae* from aquatic birds in Colorado and Utah. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 95-99 (1989).
18. Oku, Y., Uesaka, Y. and Hirayama, T.: Development of a highly sensitive bead-ELISA to detect bacterial protein toxins. *Microbiol. Immunol.*, 32: 807-816 (1988).
19. Perez-Rosas, N. and Hazen, T.C.: *In situ* survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in tropical coral reefs. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 1-9 (1988).
20. Rabadan, P.M. and Vilalta, E.: Non-01 *Vibrio cholerae* bacteremia. *Rev. Infect. Dis.*, 11: 667 (1989).
21. Rabbani, G.H., Butler, T. and Knight, J.: Randomized controlled trial of berberine sulfate therapy for diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Dis.*, 155: 979-983 (1987).
22. Roberts, R.T.: *Patología de los Peces. Mundi-Prensa*, Madrid, España, 1981.
23. Ruiz, D.M.F.: *Recursos Pesqueros de las Costas de México*. 2a ed. *Limusa*, México, D.F., 1985.
24. Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología: Boletín de Información sobre Cólera en América. *Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos*, México, D.F., 1991.
25. Secretaría de Salud, Subsecretaría de Organización y Desarrollo: Manual de Procedimientos para Aislamiento y Caracterización de *Vibrio cholerae* 01. *Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos*, México, D.F., 1991.
26. Secretaría de Salud, Subsecretaría de Organización y Desarrollo: Manual Sobre Cólera para Personal de Salud. *Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos*, México, D.F., 1991.
27. Sepúlveda, A.J., Valdespino, J.L. and Gil, E.: Boletín Quincenal de Cólera/Diarreas Infecciosas. *Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos*, México, D.F., 1991.
28. Sistema Nacional de Salud, Dirección General de Epidemiología: Boletín Mensual de Epidemiología. *Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos*, México, D.F., 1992.
29. Subsecretaría de Organización y Desarrollo: Cólera/Diarreas Infecciosas. Boletín Quincenal. *Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos*, México, D.F., 1991.
30. Subsecretaría de Organización y Desarrollo: Cólera/Diarreas Infecciosas. Boletín Quincenal. *Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos*, México, D.F., 1992.
31. Thrusfield, M.: *Epidemiología Veterinaria. Acribia*, Zaragoza, España, 1990.
32. Wayne, D.D.: *Bioestadística, Base Para el Análisis de las Ciencias de la Salud*. *Limusa*, México, D.F., 1977.
33. Wistrom, J.: A case of Non-01 *Vibrio cholerae* bacteremia from northern Europe. *J. Infect. Dis.*, 160: 732-733 (1989).
34. Wolfgang, J.K., Hilda, W.P. and Bernard, A.: *Zinser Microbiology*. 17th ed. *Appleton-Century-Crofts*, New York, 1984.
35. Yamamoto, T. and Yokota, T.: *Vibrio cholerae* 01 adherence to human small intestinal M cells *in vitro*. *J. Infect. Dis.*, 160: 168-169 (1989).