

Vibrios no Epidémicos y *Vibrio cholerae* O1 Asociados a Enfermedad Diarreica Aguda. Evento Climatológico “El Niño” - 1998. Hospital Nacional Dos de Mayo

JIMMY IBARRA¹, ALVARO DELGADO² y DÉBORA ALVARADO³

¹Fac. Cs. Naturales y Matemáticas, UNFV; ²Dpto. Medicina Humana, Fac. Medicina-UNMSM-Hospital Nacional Dos de Mayo; ³Lab. Fisiología, Genética y Ecología Microbiana, Fac. Cs. Biológicas, UNMSM.

RESUMEN

OBJETIVOS: Aislar e identificar *Vibrio cholerae* O1 y especies de vibrios no epidémicos asociados a casos de enfermedad diarreica aguda (EDA) durante 1998, dentro del evento climatológico “El Niño” Oscilación del Sur (ENOS). **MATERIALES Y MÉTODOS:** Durante los meses de verano de 1998 se realizó 70 coprocultivos de pacientes con EDA admitidos en la sala de emergencia del Hospital Nacional Dos de Mayo de Lima. Se estudió colonias aisladas en Agar TCBS. Los aislados fueron sometidos a pruebas bioquímicas y serológicas para la identificación de *Vibrio cholerae* O1. La identificación de vibrios no epidémicos y otros vibrios patogénicos se realizó tomando en consideración las características descritas en el Manual de Sistemática Bacteriana de Bergey (1994). **RESULTADOS:** Los resultados indican que el mayor número de casos estudiados estuvieron asociados a *Vibrio cholerae* O1 como agente etiológico único (64,3%) o relacionados a otras especies de *Vibrio* (4,2%). Se relata 2 casos (2,9%) que involucraron a *V. vulnificus* y 3 (4,3%) a *V. parahaemolyticus* como agentes etiológicos de diarrea aguda. **CONCLUSIONES:** La asociación de *Vibrio cholerae* O1 con otras especies de vibrios no epidémicos permitiría establecer una relación directa entre las infecciones diarreicas estudiadas y el ENOS.

Palabras claves: *Vibrio cholerae*; Diarrea; *Vibriosis*; *Vibrio*; *Vibrio parahaemolyticus*.

NON-EPIDEMIC VIBRIOS AND *Vibrio cholerae* O1 ASSOCIATED WITH ACUTE DIARRHEA FROM CASES GIVEN DURING “EL NIÑO” SOUTHERN OSCILLATION (ENSO) 1998. HOSPITAL NACIONAL DOS DE MAYO SUMMARY

OBJECTIVE: Isolation and identification of *Vibrio cholerae* O1 and non-epidemic *Vibrio* species associated with acute diarrhea (AD) during the 1998 "El Niño" Southern Oscillation (ENSO). **MATERIAL AND METHODS:** During 1998 summer months, 70 stool samples from AD patients admitted in Hospital Nacional Dos de Mayo emergency room of Lima were cultured; TCBS Agar isolates were studied. Biochemical and serological tests were performed for identification of *Vibrio cholerae* O1. Non-epidemic vibrios and others pathogenic vibrios identification was performed according to Bergey's Bacterial Systematic Manual (1994). **RESULTS:** Most cases were associated to *Vibrio cholerae* O1 as unique etiologic agent (64,3%) or related to the others *Vibrio* species (4,2%). Two cases involving *Vibrio vulnificus* (2,9%) and 3 with *V. parahaemolyticus* (4,3%) as etiologic agents of AD, are described. **CONCLUSIONS:** *Vibrio cholerae* O1 association with others non-epidemic vibrios lets us assume a direct relationship between evaluated diarrheic infections and ENSO.

Key words: *Vibrio cholerae*; Diarrhea; *Vibrio* infections; *Vibrio*; *Vibrio parahaemolyticus*.

Correspondencia:

Biol. Jimmy Ibarra Trujillo
Av. Venezuela s/n Ciudad Universitaria UNMSM
Facultad de Ciencias Biológicas
E-mail: joit71@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Vibrio* son bacilos Gram negativos de amplia distribución en ambientes acuáticos marinos y de preferencia estuarinos; son frecuentemente aislados de agua de mar, sedimento, plancton y animales que tienen contacto con estas aguas ⁽¹⁻⁷⁾.

Vibrio cholerae es una de las 34 especies que integran actualmente el género *Vibrio* ^(1,5,8). Está agrupado en 155 serogrupos O ⁽⁹⁾ siendo apenas el serogrupo O1 y el O139 los causantes del cólera epidémico en el mundo. Los serogrupos No-O1 y No-O139 son considerados no epidémicos, al igual que otras especies del género ⁽¹⁰⁾.

Los vibrios coléricos no epidémicos tienen potencial para producir diarrea a través de mecanismos aún poco conocidos ^(11,12). Su enteropatógenidad parece ser de naturaleza multifactorial y asociada a hemolisinas, neuraminidasa, enterotoxinas termolábiles y enterotoxinas termoestables ⁽¹³⁾. Algunas especies de vibrios, como *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. furnissii*, *V. fluvialis*, *V. mimicus* y *V. metschnikovii* entre otros, también pueden presentar genes de virulencia y causar enfermedades diarreicas tan graves como el cólera ^(2,4,14).

En el Perú se ha venido reportando esporádicamente especies del género *Vibrio* asociadas a enfermedad diarreica y específicamente desde 1991, inicio de la epidemia latinoamericana, se reporta cólera como uno de los causantes más importantes de diarrea aguda en nuestro país ⁽¹⁵⁻¹⁸⁾.

Desde 1977 se ha considerado al *V. cholerae* un habitante natural de aguas salobres y sistemas estuarinos, esta afirmación ha sido corroborada por varios investigadores que no han podido establecer correlación entre la presencia de *Vibrio cholerae* y la de indicadores de contaminación fecal en ambientes acuáticos, como sí sucede con microorganismos entéricos como *Salmonella*. Recientemente Colwell (1996) ⁽¹⁹⁾ relacionó el resurgimiento del cólera en el mundo con cambios climáticos globales ocasionados, principalmente, por la oscilación térmica del hemisferio sur denominada "El Niño" (ENSO), que altera los parámetros hidrobiológicos normales del ecosistema marino, promoviendo la multiplicación excesiva de las poblaciones de fitoplancton y zooplancton, cuya importancia en la diseminación y persistencia de *V. cholerae* ya ha sido demostrada.

En el presente trabajo evaluamos coprocultivos so-

bre agar TCBS provenientes de pacientes atendidos ambulatoriamente con diagnóstico de diarrea aguda (EDA) durante el ENSO 1997 – 1998 para determinar los tipos de vibrios involucrados en estos casos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras y transporte

Las muestras clínicas fueron tomadas de 70 pacientes ambulatorios provenientes principalmente de los distritos de Cercado de Lima, La Victoria y El Agustino, atendidos en el servicio de emergencia del Hospital Nacional Dos de Mayo de Lima por presentar cuadro diarreico agudo durante los meses de verano de 1998, correspondientes a un período de incremento anormal en la temperatura superficial del mar en las costas de nuestro país. Las muestras fueron obtenidas mediante hisopado rectal y colocadas en medio de transporte Cary y Blair para su procesamiento en el laboratorio.

Cultivo e identificación de *V. cholerae*

El coprocultivo se realizó siguiendo la metodología recomendada por el Instituto Nacional de Salud - Ministerio de Salud ⁽²⁰⁾. Se seleccionó cultivos sacarosa positivos y negativos crecidos sobre agar TCBS, utilizando entre 15 y 18 mL por placa de petri y se sembraron sobre Agar Trypticase de Soya (TSA). Los aislados fueron almacenados hasta su identificación. La lectura de las placas de Agar TCBS se realizó entre las 18-24 horas, tal como recomiendan los fabricantes del medio.

Las colonias sacarosa positivas, sospechosas de *Vibrio cholerae*, se replicaron en los medios diferenciales recomendados para la identificación de la especie y los cultivos se incubaron a 37°C por 24 horas. También se realizó las pruebas de oxidasa y el "string test". Todos los aislados encontrados positivos para la especie, interpretados de acuerdo a sus características bioquímicas, fueron sometidos a pruebas serológicas con sueros específicos para la identificación del serogrupo O1 y los serotipos Inaba y Ogawa ⁽²⁰⁻²²⁾.

Identificación bioquímica de especies de *Vibrio* no epidémicas

La identificación de otras especies del género *Vibrio* y *V. cholerae* no aglutinantes con el antisero O1 se realizó tomando en consideración las características descritas

en el Manual de Sistemática Bacteriana de Bergey (8), seleccionando un total de 28 pruebas diferenciales para la identificación de especies de origen clínico.

Las pruebas realizadas fueron entre otras: producción de Indol y H₂S; RM-VP; descarboxilación de lisina y ornitina; producción de arginina dehidrolasa; hidrólisis de citrato, urea y gelatina; oxidación - fermentación de glucosa y fermentación de sacarosa, lactosa, arabinosa, celobiosa y manitol; reducción de NO₃; crecimiento a 0,1%, 6% y 8% de NaCl; motilidad y presencia de flagelo polar (coloración de Leifson). Estos medios fueron incubados a 37°C y leídos a las 24 h de sembrados.

RESULTADOS

De acuerdo al sexo, 45 pacientes (64%) fueron varones y 25 (36%) mujeres. Según la edad, el grupo etáreo más afectado fue 19-60 años con 54 pacientes (77%); los grupos etáreos menores de 18 años y mayores de 60 años correspondieron al 13% y 10% del total de casos respectivamente.

En la Tabla Nº 1 se describe el diagnóstico de laboratorio en los 70 casos de EDA estudiados, observándose que el mayor número de casos está asociados con la presencia de *Vibrio cholerae* como agente etiológico único o relacionado a otras especies de *Vibrio*.

Tabla Nº 1.- Diagnóstico de laboratorio en 70 casos de enfermedad diarreica aguda. Hospital Nacional Dos de Mayo-Lima. Enero-Marzo 1998.

Diagnóstico	n	%
Cólera		
<i>V. cholerae</i> O1	45	64,3
<i>V. cholerae</i> O1 + <i>V. cholerae</i> No-O1	1	1,4
<i>V. cholerae</i> O1 + <i>V. vulnificus</i>	1	1,4
<i>V. cholerae</i> + <i>Vibrio</i> sp.	1	1,4
Otras Vibriosis		
<i>V. vulnificus</i>	2	2,9
<i>V. parahaemolyticus</i>	3	4,3
Otras etiologías	17	24,3
Total	70	100,0

En la Tabla Nº 2 se establece las frecuencias de especies de *Vibrio* identificados a partir de las colonias aisladas en agar TCBS. Se observa que la especie más frecuente es *Vibrio cholerae* serogrupo O1, siendo el serotipo Ogawa el más común (61,29%), frente al serotipo Inaba encontrado con menos frecuencia (2,15%). Se determinó la presencia de 2 aislados (2,15%) correspondientes a *V. cholerae* No-O1. También se identificó, con una frecuencia de 3,22%, otras especies de vibrios como *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*; un aislado ubicado dentro del género *Vibrio* caracterizado por ser sacarosa (+) no pudo ser identificado con las pruebas bioquímicas utilizadas.

En el agar TCBS se ha aislado, además de los vibrios antes mencionados, cultivos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae en una frecuencia de 25,8%.

DISCUSIÓN

La Enfermedad Diarreica Aguda es una de las afecciones humanas que produce las tasas de morbilidad y mortalidad más altas en el Perú. Desde 1991, esta enfermedad ha tenido como principal agente etiológico al *Vibrio cholerae*. Una evaluación reciente de casos de EDA producidos entre 1991 y 1998 ha correlacionado el incremento de estos casos con elevaciones estacionales de la temperatura ambiental en nuestro país y específicamente con el evento

Tabla Nº 2.- Frecuencia de especies de *Vibrio* hallados en 93 colonias aisladas de Agar TCBS provenientes de casos de enfermedad diarreica aguda. Hospital Dos de Mayo-Lima. Enero-Marzo 1998.

Especie	n	%
<i>Vibrio cholerae</i> O1 Ogawa	57	61,29
<i>Vibrio cholerae</i> O1 Inaba	2	2,15
<i>Vibrio cholerae</i> No-O1	2	2,15
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3	3,22
<i>Vibrio vulnificus</i>	3	3,22
<i>Vibrio</i> sp. sacarosa positivo	1	1,07
Enterobacteriaceae	24	25,80
Total	93	100,00

climatológico "El Niño" ocurrido entre fines de 1997 y los primeros meses de 1998⁽²³⁾. En el Hospital Nacional Dos de Mayo, los casos de EDA atendidos por emergencia se elevaron en 4 veces su número desde la semana epidemiológica 47 de 1997, hasta la semana 12 de 1998, siendo *Vibrio cholerae* O1 Ogawa el agente más frecuente⁽²⁴⁾.

Para el presente estudio seleccionamos colonias sacrosa positiva y negativa crecidas sobre agar TCBS, provenientes de muestras fecales de pacientes con EDA. Los datos epidemiológicos nos indican que la mayor parte de estos pacientes eran varones con edades comprendidas entre los 18 y 60 años, lo que coincide con el reporte de Clendenes y col., con relación al brote de diarrea aguda registrado en personas que llegaron a esta sala de emergencia durante el verano de 1998⁽²⁴⁾.

Los cultivos estudiados correspondieron en su mayoría a casos de cólera, con *Vibrio cholerae* O1 como agente etiológico único. Estos resultados difieren con los obtenidos durante la estación de verano de 1997, en la cual no fueron registrados casos de cólera en el mismo hospital (información personal); esto confirmaría la relación entre el aumento de temperatura ambiental acontecido durante el ENSO 97-98 y la aparición abrupta de casos de cólera en el verano de 1998⁽²⁴⁾.

Vibrio cholerae ha sido aislado de ambientes acuáticos que incluyen varios rangos de salinidad (dulce-acuícolas, estuarinos y salobres), determinándose su asociación con elementos del plancton, donde sobreviven en condiciones de stress nutricional. El aumento anormal de la temperatura en la superficie del mar da lugar al incremento de la población de plancton y por consiguiente también de la población de vibriones, en particular *V. cholerae*, que habita en su superficie^(3,19). Otros organismos marinos también son utilizados como hábitat por diferentes especies del género *Vibrio*, éstos al ser consumidos crudos o semicrudos pueden producir un cuadro gastrointestinal entre otras afecciones^(2,4,7,25). Vilcapoma y col. (1992) reportaron la presencia de *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y otras especies de vibrios halofílicos en alimentos preparados con productos marinos frescos y procesados en nuestro país⁽²⁶⁾.

La asociación de *Vibrio cholerae* O1 con *Vibrio cholerae* No-O1 y otros vibrios no epidémicos observada en 3 de las muestras estudiadas, coincide con reportes hechos en otros países para casos de gastroenteritis producidas por *Vibrio*^(14,27). En nuestro estudio, casi la totalidad de casos de cólera tiene como agente a *Vibrio cholerae* Ogawa, que en los últimos años es el serotipo aislado con más frecuencia en

Latinoamérica^(22,24).

Se reporta a *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en relación con cuadros de enfermedad diarreica aguda en nuestro medio. Si bien *V. parahaemolyticus* está ampliamente relacionado con casos de diarrea y otros síntomas de enfermedad gastrointestinal^(2,4,14,27), *V. vulnificus* está principalmente asociado a casos de sepsis e infecciones de heridas, reportándose esporádicamente su relación con casos de gastroenteritis^(12,14,27,28). Klontz y col. (1998)⁽²⁸⁾ en un estudio realizado en 62 casos de infecciones por *V. vulnificus*, reportados en Florida entre 1981 y 1987, afirman que los casos de gastroenteritis asociados con esta bacteria están relacionados con sepsis en donde la bacteria no está asociada a otro patógeno bacteriano, lo que sugeriría el posible papel de este microorganismo en enfermedades gastrointestinales; a pesar de esto, sugiere la necesidad de un estudio viral para determinar el papel exacto que cumple esta bacteria en el proceso infeccioso. No se pudo hacer un seguimiento de las personas afectadas con *V. vulnificus*, debido a que fueron atendidas por emergencia, lo cual no asegura su permanencia en el Hospital.

Ambas especies son aisladas con mucha facilidad de ambientes marinos y frutos del mar en la estación de verano, sin embargo siempre el número de casos es menor a lo esperado. Esto puede deberse a los problemas que se tiene para su identificación en el laboratorio, a la poca virulencia de las cepas o a una alta dosis infecciosa necesaria para causar la enfermedad⁽²⁹⁻³²⁾. La presencia de estas especies en relación con cuadros de diarrea aguda alerta sobre la necesidad de adiestramiento del personal de salud en los hospitales públicos para la identificación de especies diferentes a *V. cholerae* O1.

Las enterobacterias reportadas en el presente estudio (Tabla Nº 2) fueron aisladas sobre agar TCBS por su capacidad de fermentación de la sacarosa, un medio de cultivo considerado altamente selectivo para *Vibrio*. Este medio es ampliamente utilizado porque está disponible comercialmente y no requiere autoclavado, sin embargo se han relatado variaciones en su selectividad incluso entre lotes diferentes de la misma marca comercial⁽²²⁾. La presencia de bacterias oxidasa negativas puede interferir con el diagnóstico de *V. metschnikovii*, único *Vibrio* que no produce oxidasa y que ha sido anteriormente descrito asociado a casos de diarrea en nuestro país⁽¹⁶⁾.

El incremento de casos de cólera y el hallazgo de otras especies del género *Vibrio* en concomitancia con cuadros de EDA reportados durante el ENSO 97-98, permite relacio-

nar la aparición de brotes de enfermedad diarreica asociados a estos organismos, con los cambios en la temperatura ambiental; esto plantearía la necesidad de un entrenamiento del personal de salud de los laboratorios hospitalarios para el reconocimiento presuntivo de especies diferentes a *V. cholerae*.

AGRADECIMIENTOS

A la Bióloga. Gloria Saez del Lab. de Servicios Microbiológicos, Parasitológicos y Ambientales (LASMPA) de la Fac. de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Univ. Federico Villarreal, al Br. Gilmer Loyola del Lab. de Microbiología y a la Lic. Maura Orosco Fernandez de la Unidad de Epidemiología del Hospital Nacional Dos de Mayo, por las facilidades brindadas para el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) **Bauman P, Furniss AL, Lee JV.** Genus I. *Vibrio* Pacini 1854,411. En: Krieg NR, Holt JG, editores. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins. 1984. Vol. 1. págs. 260-74.
- 2) **Blake PA, Weaver RE, Hollis.** Diseases of humans (other than cholerae) caused by vibrios. *Ann Rev Microbiol* 1980; 34: 341-67.
- 3) **Colwell RR, West PA, Maneval D, Remmers EF, Elliott I, Carlson NE.** Ecology of pathogenic vibrios in Chesapeake Bay. En: Colwell RR. *Vibrios in the environment*. New York, John Wiley & Sons. 1984. págs. 367-87.
- 4) **Rippey S.** Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7(4): 419-25.
- 5) **Farmer JJ, Hickman-Brenner FW.** The Genera *Vibrio* and *Photobacterium*. En: Ballows A, Truper H, Dworkin M, Hardek W, Schleifer K, editores. *The Prokaryotes - A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. Heidelberg, Springer - Verlag. 1992. Capítulo 157. págs. 2952-3011.
- 6) **Oliver J, Warner R, Cieland D.** Distribution and ecology of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting marine vibrios in coastal waters of the southeastern United States. *Appl Environ Microbiol* 1982; 44: 1404-14.
- 7) **De Paola A, Hopkins L, Peeier J, Wentz, E, McPhearson R.** Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in US coastal waters and oysters. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 2299-302.
- 8) **Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J, Williams S.** Bergey's manual of determinative bacteriology. 9na ed. Williams & Wilkins. EEUU. 1994. 787 págs.
- 9) **Shimada T, Arakawa E, Kenichiro I, Okitsu T, Matsushima A y col.** Extended serotyping scheme for *Vibrio cholerae*. *Curr Microbiol* 1994; 28: 175-8.
- 10) **Kaper JB, Morris JG, Levine MM.** Cholera. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 48-86.
- 11) **Morris JG.** Non-O group 1 *Vibrio cholerae*: A look at the epidemiology of an occasional pathogen. *Epidemiol Rev* 1990; 12: 179-91.
- 12) **Morris J.** Non-O group 1 *Vibrio cholerae* strains not associated with epidemic disease. En: Wachsmuth K, Blake P, Olsvik Ø. *Vibrio cholerae and cholera molecular to global perspectives*. Washington DC. American Society for Microbiology Press. 1994. págs. 103-5.
- 13) **Alvarado D.** Detecção de seqüências genéticas associadas a virulência em cepas de *Vibrio cholerae* nao-O1 e nao-O139 isoladas de ambientes marinhos do estado de Sao Paulo. Tesis Magister, Universidade de Sao Paulo - Brasil. 1997.
- 14) **Hlady WG, Klontz KC.** The epidemiology of *Vibrio cholerae* infections in Florida, 1981-1983. *J Infec Dis* 1996; 173: 1176-83.
- 15) **Batchelor RA, Wignall SF.** Non-toxigenic O1 *Vibrio cholerae* in Perú: a report of two cases associated with diarrhea. *Diagn Microbiol Infec Dis* 1998; 10: 135-8.
- 16) **Dalsgaard A, Alarcon A, Lanata C, Jensen T, Hansen H, Delgado F y col.** Clinical manifestations and molecular epidemiology of five cases of diarrhoea in children associated with *Vibrio metschnikovii* in Arequipa, Perú. *J Med Microbiol* 1996; 45: 494-500.
- 17) **Taylor Dalsgaard A, Glerup P, Hoybye LL, Paarup AM, Meza R, Bernal M.** Clinical manifestations and molecular epidemiology of 14 cases of diarrhea associated with *Vibrio furnissii* in Lima, Perú. Resumen Nº C-337. Programa de Resúmenes. 96 General Meeting American Society of Microbiology. Nueva Orleans, USA. 1996. págs. 60.
- 18) **Tauxe R, Seminario L, Tapia R, Libel M.** The Latin American epidemic. En: Wachsmuth K, Blake PA, Olsvik F, editores. *Vibrio cholerae and cholera - molecular to global perspectives*. Washington DC. Am Soc for Microbiol Press. 1994. págs. 53-67.
- 19) **Colwell RR.** Global climate and infectious disease: The cholera paradigm. *Science* 274: 2025-31. 1996 .
- 20) **INS - Ministerio de Salud - Perú.** Manual de laboratorio - Cólera. 2da edición. Lima - Perú. 1994. 31 pp.
- 21) **UNESCO/MIRCEN/FAO/UNEP/IUMS/Univ. Maryland.** International workshop on environmental and aquatic microbiology and biotechnology. Maryland, Maryland Biotech Inst. Univ Maryland. EEUU. 1993. pág. 58.
- 22) **Kay B, Bopp Ch, Wells J.** Isolation and identification of *Vibrio cholerae* O1 from fecal specimens. In: Wachsmuth K, Blake P, Olsvik Ø, editores. *Vibrio cholerae and cholera - molecular to global perspectives*. Washington DC. American Society for Microbiology Press. 1994. pág. 3-25.
- 23) **Lama JR, Seas C, Gotuzzo E.** The effect of the El Niño Southern Oscillation on the incidence of acute diarrhea in adults in Lima, Perú. Resumen PS 017, Proc. 24th International Congress of Internal Medicine. International Society of Internal Medicine. Lima - Perú. 1998. pág.47.
- 24) **Clendenes M, Carballo F, Huaroto L, Alvarez-Cano J, Ticona E.** Epidemic outbreak of acute diarrhea disease in adults in an emergency room. Abstr. PS 048, Proc. 24th International Congress of Internal Medicine. International Society of Internal Medicine. Lima - Perú. pág. 55. 1998.

- 25) **Rivera IG, Matte GR, Matte MH, Sato MIZ, Sanchez PS, Martins MT.** Potentially pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region on the atlantic coast of Brazil. *J Appl Bacteriol* 1994; 77: 281-7.
- 26) **Vilcapoma A, Flores A, Leon J, Alvarado D.** Determinación de la frecuencia de *Vibrio parahaemolyticus* y otros vibriones halofílicos en alimentos preparados con productos marinos frescos y procesados. *Rev Per Biol* 1992; 4: 17-20.
- 27) **Levine W, Griffin PM.** The Gulf Coast Vibrio Working Group. *Vibrio* infections on the Gulf Coast: results of first year of regional surveillance. *J Infect Dis* 1993; 167: 479-83.
- 28) **Klontz KC, Lieb S, Schreiber M, Janowski IHT, Baldy LM, Gunn RA.** Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections. *Ann Intern Med* 1988; 109: 318-23.
- 29) **Wright AC, Hill RT, Johnson JA, Roghman M, Colwell RR, Morris JG.** Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 717-24.
- 30) **Oliver J, Warnwr R, Cieland D.** Distribution of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting vibrios in the marine environment. *Appl Environ Microbiol* 1993; 45: 985-98.
- 31) **Morris JG, Black RE.** Cholera and other vibrioses in the United States. *N Engl J Med* 1985; 312: 343-50.
- 32) **Morris JG.** *Vibrio vulnificus* - A new monster of the deep? *Ann Intern Med* 1988; 109: 261- 2.