

Aislamiento de vibriófagos líticos y *Vibrio cholerae* a partir de muestras fecales de habitantes de algunas zonas endémicas para cólera ubicadas en el Municipio Páez, Estado Zulia, Venezuela

Neila Galué^{1,2}, Rodolfo Salas-A.^{1,2*}, Sandra Azuero de G.^{1,2}, Gisela Fuenmayor¹
Miriam Morales³ y Luis González²

¹Laboratorio de Postgrado en Microbiología, ²Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología, Dpto. de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia

³Servicio de Epidemiología, Hospital Universitario de Maracaibo, Edo. Zulia, Venezuela

Recibido: 2-09-94 Aceptado: 23-06-95

Resumen

Se estudió la presencia de *Vibrio cholerae* en 156 muestras fecales, 12 provenientes de habitantes del Pueblo de Sinamaica y 144 de la Laguna de Sinamaica, Municipio Páez, Estado Zulia. Adicionalmente, se estudió la presencia de vibriófagos líticos en tres muestras positivas para cólera y en 17 muestras adicionales, cólera negativas, seleccionadas al azar. Tres de las muestras estudiadas fueron positivas para *Vibrio cholerae* biotipo El TOR, serogrupo O1, serotipo Ogawa. Se empleó la cepa salvaje de *Vibrio cholerae* aislada, como célula blanco (hospedadora) para la propagación viral y estudio morfológico de las placas de lisis. El aislamiento de fagos se realizó por homogeneización de las heces y preservación en glicina 0,5 M, seguido por filtración en secuencia por membranas (Millipore) de 0,45 μm y 0,22 μm . Los filtrados se expusieron a la cepa hospedadora, a una densidad celular previamente estandarizada de 1×10^3 UFC/ml en Agar para Bacteriófagos. Se aislaron las entidades líticas responsables luego de incubación a 37°C, durante 24 h. Análisis de los resultados obtenidos indican que *V. cholerae* estuvo presente en tres de las 12 de las muestras fecales (25%) de los individuos muestreados en el Pueblo de Sinamaica y ausente en las muestras fecales de los individuos de la Laguna. Se logró el aislamiento de dos entidades líticas para *V. cholerae* capaces de causar dos patrones de lisis bacteriana, de zona estrecha y de zona amplia. Estos bacteriófagos fueron recobrados a partir de las muestras positivas (No. 1 y 2) para cólera.

Palabras claves: Bacteriófagos; fecal; *Vibrio cholerae*; vibriófagos.

Isolation of lytic vibriophages and *Vibrio cholerae* from fecal samples of individuals in cholera endemic areas located in Municipio Páez, Zulia State, Venezuela

Abstract

The presence of *Vibrio cholerae* was studied in 156 fecal samples, 12 from individuals of Pueblo de Sinamaica and 144 of Laguna de Sinamaica, Municipio Páez, Edo. Zulia.

* Autor para la correspondencia: Av 3F No. 76-70, Maracaibo, Venezuela. Fax: (061) 912816.

Additionally, the presence of lytic vibriophages was investigated in three cholera positive samples and in 17 cholera negative samples, randomly selected. Three *Vibrio cholerae* isolates were obtained in the samples studied, which corresponded to the biotype EL TOR, serogroup O1 and serotype Ogawa. The isolate of *V. cholerae* was employed as target host cells for viral propagation and plaque morphology study. Phage isolation was attained after fecal homogenization and preservation on glycine 0.5 M, followed by sequential filtration through 0.45 μm and 0.22 μm (Millipore) membranes. The filtrates were exposed to the target cell at a standardized cell concentration of 1×10^3 CFU/ml, on Bacteriophage Agar. Propagated lytic bacteriophages were isolated after incubation at 37°C for 24 hrs. Analysis of the results obtained indicated that *V. cholerae* was present in 3 out of 12 fecal samples (25%) from individuals located in Pueblo de Sinamaica and absent in the fecal samples of individuals from Laguna de Sinamaica. Two types of bacterial lytic plaques were observed, one of narrow zone and another of wide zone. These phages were recovered from cholera positive samples No. 1 and 2.

Key words: Bacteriophages; fecal; *Vibrio cholerae*; vibriophages.

Introducción

Vibrio cholerae, agente etiológico del cólera solamente en humanos, ha provocado siete pandemias desde el año 1816. Su alcance comprende Asia, Africa, Europa, Sur de Rusia, Australia, Canadá y América Latina (1-3). Su incidencia siempre cambiante amerita constante actualización.

El *V. cholerae* es un bacilo gram negativo curvo, de 0,5 x 3,0 μm , mótil, no esporulado, sin cápsula, aeróbico facultativo y quimioorganotrofo. En relación a su clasificación por sensibilidad antibiótica, el serogrupo O1 comprende dos tipos: CLASSICAL y EL TOR (4). El primer grupo se caracteriza por ser sensible a la polimixina B y a bacteriófagos del tipo IV. El segundo, es resistente a ambos factores (5-7). En la actualidad el cólera, con tendencia epidémica, es causado casi exclusivamente por *V. cholerae* O1, biotipo EL TOR, aunque en Bangladesh se han reportado casos provocados por el biotipo CLASSICAL. En relación a su incidencia y sobrevivencia en el medio ambiente, se ha aislado en muestras de aguas superficiales correspondientes a zonas endémicas y no endémicas. Este microorganismo puede sobrevivir como organismo de vida libre, en

algunos casos asociado con plantas y animales. Su aislamiento en el medio ambiente puede no estar relacionado con la presencia de un foco de enfermedad y su presencia exige una cuidadosa interpretación. En contraste, el biotipo CLASSICAL únicamente ha sido aislado en muestras de zonas con casuística colérica (8).

El *V. cholerae* al igual que otros hospedadores bacterianos puede ser infectado y colonizado por bacteriófagos (9-11). Estos virus pueden funcionar bajo ciclo lítico o lisogénico en la célula blanco. Los fagos líticos son capaces de provocar la ruptura de la célula hospedadora, provocando la formación de placas de lisis celular (12). El *V. cholerae* biotipo CLASSICAL, es raramente infectado por bacteriófagos lisogénicos, actividad común en el biotipo EL TOR (13). Algunos trabajos han demostrado la potencial relación entre la lisogenia de *V. cholerae* y la virulencia de la cepa problema (14). Se ha reportado que el *V. cholerae*, biotipo CLASSICAL y el biotipo EL TOR (14t), exhibieron respectivamente, cinco y seis cuadros líticos diferentes. Cepas de cólera, biotipo EL TOR, aisladas de casos clínicos desde 1961 hasta la fecha, presentan lisogenización por un bacteriófago *Kappa* (15). Otros informes sobre bacteriófagos especí-

ficos para los biotipos CLASSICAL y EL TOR señalan el aislamiento respectivo de nueve fagos líticos distintos y de cuatro fagos atemperados (16, 17). Sin embargo, existe controversia en cuanto a la caracterización viral del *V. cholerae* por bacteriófagos y su susceptibilidad (18). La importancia de los bacteriófagos radica en el rol que desempeñan al provocar cambios en la patogenia del *V. cholerae*, toxigenicidad y resistencia a la infección por otros fagos. La producción del factor C, en cepas Ogawa Clasica 029, parece deberse a la presencia del bacteriófago CP-T1. Esta conversión ha sido documentada lográndose detectar la conversión de Ogawa serotipo A-B a Hikojima serotipo A-B-C. Para las cepas del biotipo EL TOR, serotipo Ogawa, el bacteriófago CP-T1 también es capaz de producir cambios antigénicos (13). Los efectos de transducción viral han sido demostrados con los fagos CP-T2, VP-n y VP-T (19). El bacteriófago 0149 del grupo IV de la clasificación de Mukerjee (20) fue capaz de producir la conversión del *V. cholerae* biotipo EL TOR.

La falta de información sobre el comportamiento fenotípico del *V. cholerae* luego de la incorporación de material genético viral, foráneo, ha provocado un avance limitado en la biología molecular de esta bacteria. La producción de DNAsa extracelular y algunos aspectos restrictivos del hospedador son factores de importancia que modulan dicho fenómeno, así mismo la transducción bacteriana (21). Los virus lisogénicos atemperados descritos para *V. cholerae* biotipo EL TOR, el Vca-2 y Vca-3, ambos han sido relacionados con el bacteriófago atemperado *Kappa* (22-24). Así mismo, otras cepas virales lisogénicas para esta bacteria presentan un rango corto de hospederos y han sido denominadas fagos tipo *Kappa* (25)

En la presente investigación, se estudió la presencia de *V. cholerae* en muestras fecales de individuos de una zona endémica para cólera. Así mismo, la sensibilidad de la cepa salvaje de *V. cholerae* aislada, frente a

bacteriófagos líticos cultivados de las mismas muestras.

Materiales y Métodos

Población de estudio

La población estuvo conformada por individuos, sin distinción de sexo, con diarrea cólica aguda. Se incluyeron sus contactos e individuos asintomáticos, potencialmente portadores del vibrio, todos, habitantes del Pueblo de Sinamaica y Laguna de Sinamaica, Municipio Páez, Estado Zulia, Venezuela.

Individuos muestreados

Se obtuvieron 156 muestras de heces provenientes del mismo número de individuos. De éstas, 12 correspondieron a habitantes del Pueblo de Sinamaica y 144 a habitantes de la Laguna de Sinamaica. Se muestrearon tres casos con cólera agudo. Se tomó como base el 5% de la población endémica, estimada en 3.500 personas (1991, Censo Epidemiología Sanitaria, Hospital Universitario de Maracaibo) en razón de la ausencia de un número mayor de casos clínicos. Las muestras fecales se obtuvieron a través de la Medicatura de Puerto Cuervito, Laguna y Pueblo de Sinamaica, incluyendo aquellas colectadas a domicilio en las zonas muestreadas. La colecta de las muestras estudiadas correspondió al mes de Agosto, 1993.

Colecta y transporte de las muestras fecales

La materia fecal se colectó en envases de plástico estéril, previamente rotulados. Una de las muestras fue obtenida por hisopado rectal, seguido por siembra inmediata en el medio de transporte Cary-Blair y medio de cultivo Agua Peptona Alcalina (APA),

(26). Las muestras se transportaron al laboratorio bajo refrigeración, en un lapso no mayor de cuatro horas antes de su procesamiento. Los medios de cultivo empleados correspondieron a la casa comercial BBL.

Procesamiento de las muestras

Aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae*: Las muestras fueron cultivadas en medio Agar Sal-Sucrosa Tiosulfato-Citrato-Bilis (TCBS) (27). Las cepas aisladas se caracterizaron por la morfología colonial, celular y reacción de gram bajo microscopía de campo claro, pruebas de oxidasa, reacción en el medio triple azúcar hierro (TSI) y Lisina Hierro Agar (LIA), decarboxilación de la lisina, arginina y ornitina, fermentación de azúcares como glucosa, sacarosa, rafinosa, ramnosa, melobiosa, salicina, manosa, manitol y xilosa, producción de indol y acetil metil carbinol, crecimiento en caldo nutriente con 0,5% de NaCl y prueba de motilidad (28, 29). El análisis de las mismas, permitió identificar la cepa de *Vibrio cholerae* aislada. Adicionalmente, se realizaron pruebas serológicas por aglutinación para determinar el serogrupo y serotipo de la bacteria *Vibrio cholerae* (Wellcome, O1 polyvalent serum, lot. K760010). La cepas se mantuvieron en APA. Las muestras fecales una vez procesadas se mantuvieron bajo congelación a -20°C .

Con el propósito de incrementar las probabilidades de aislamiento de *V. cholerae* de las muestras estudiadas, principalmente de individuos portadores asintomáticos, se procedió a recultivar las mismas al cabo de una semana y al cabo de dos meses. Se sembraron en APA y se incubaron a 37°C durante 6 horas. Transcurrido este tiempo, se sembraron en TCBS e incubaron a 37°C por 24 horas. Las bacterias cultivadas fueron caracterizadas según la reacción de la oxidasa.

Aislamiento de vibriófagos: Las muestras fecales positivas para el aisla-

miento de *V. cholerae* y un grupo de muestras negativas tomadas al azar (No. 5,6,7, 9,27,31,34,58,98,119,124,139,144, 147,151,153 y 154), fueron homogeneizadas en un vortex, ajustado a un volumen de 90 ml de solución de glicina 0,5 M, pH 9,51 (30-32). El homogeneizado se filtró con gasa-algodón, prefiltro AP-20 y membranas $0,45\ \mu\text{m}$ y $0,22\ \mu\text{m}$ (Millipore), en forma secuencial. El filtrado se cosechó estérilmente y fue procesado de inmediato.

El alicuota filtrado, de aproximadamente 90 ml, se mezcló con 10 ml de una suspensión de 1×10^3 UFC/ml de la cepa hospedadora salvaje aislada, propagada en Caldo Nutriente (CN) suplementado con NaCl al 0,5%. Previamente, se estudió el patrón de crecimiento de la cepa de *Vibrio cholerae* en cuestión, con la finalidad de estandarizar las condiciones necesarias para obtener la densidad celular bacteriana mencionada. La mezcla filtrado-cepa hospedadora, se dispensó en Medio Agar Nutriente Doble Concentración (ANDC) fundido, hasta obtener un volumen final de 200 ml. Esta preparación se vertió en placas de petri estériles y se incubó a 37°C durante 18 horas. Transcurrido el período de incubación, se detectaron los halos de lisis bacteriana como unidades formadoras de placa (UFP), (33).

Curva de crecimiento bacteriano: Se estableció la concentración bacteriana adecuada de la célula blanco hospedadora, luego de preparar una curva de crecimiento con *Vibrio cholerae* durante las primeras siete horas (7 h) del crecimiento celular. Este estudio, se realizó con la finalidad de obtener un cultivo idóneo con una densidad celular ajustada a 1×10^3 UFC/ml (34, 35), para ser inoculado con los bacteriófagos aislados logrando su propagación. Se estableció la concentración celular óptima equivalente a 1×10^3 UFC/ml, durante el intervalo 2-3 horas de crecimiento bacteriano. El coeficiente de regresión logrado con el modelo de crecimiento bacteriano, fue $r = 0,98$ (Tabla 1, Figura 1).

Tabla 1

Unidades formadoras de colonias/ml de cultivos de *V. cholerae* con la correspondiente densidad óptica y tiempo de crecimiento en horas

| Hora | UFC/ml de los Cultivos (Réplicas) | | | | | |
|------|-----------------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | X | D.O. |
| 0 | INCONT | 270 | 2.600 | 4.000 | 2.900 | 0,036 |
| 1 | 180 | 1.600 | 1.500 | 2.300 | 1.800 | 0,031 |
| 2 | 70.000 | 30.000 | 100.000 | 400.000 | 22.000 | 0,080 |
| 3 | 2.000.000 | 20.000.000 | 200.000.000 | 100.000.000 | 530.000.000 | 0,170 |
| 4 | 1.000.000 | 10.000.000 | 400.000.000 | 920.000.000 | 330.000.000 | 0,180 |
| 5 | 4.000.000 | 10.000.000 | 10.000.000 | 80.000.000 | 2.600.000 | 0,180 |
| 6 | 10.000.000 | 30.000.000 | 7.000.000 | 30.000.000 | 19.000.000 | 0,214 |
| 7 | 3.000.000 | 60.000.000 | 100.000.000 | 30.000.000 | 49.000.000 | 0,207 |

D.O. densidad óptica

INCONT. incontables

UFC. Unidades formadoras de colonias

Propagación fágica: Una porción del halo de lisis celular (UFP), fue removido asépticamente con un sacabocados estéril de 5,0 mm de diámetro. El taco obtenido fue colocado en caldo de propagación fágica. El mismo, contenía una suspensión de 1×10^3 UFC/ml de la cepa hospedadora.

La cosecha viral, obtenida siguiendo la técnica antes descrita, fue sometida a estudio con el propósito de caracterizar el tipo de lisis celular.

Se preparó un cultivo de *V. cholerae* hasta obtener una densidad celular óptima de $2,2 \times 10^3$ UFC/ml, incubado durante 18 horas a 37°C. Una vez propagado el virus y cosechado por centrifugación, se inoculó 0,1 ml de la suspensión viral en tubos conteniendo el cultivo propagador bacteriano y se incubó durante 18 horas a 37°C. Los bacteriófagos aislados, capaces de producir placas de lisis, se inocularon en Agar para Bacteriófagos en un volumen 200 ml, pos-

teriormente plaqueados e incubados a 37°C por 12-18 horas.

Resultados

Aislamiento e identificación de *V. cholerae*

Las colonias sacarosa positivas y cultivadas en medio TCBS, se caracterizaron mediante la metodología descrita anteriormente. No se observaron colonias de *V. cholerae* atípico en las muestras estudiadas (4-156).

Las muestras fecales positivas en el estudio, correspondieron a tres individuos con cólera activo, lográndose el aislamiento de *Vibrio cholerae*, biotipo EL TOR, serogrupo 01, Ogawa. El hallazgo de esta bacteria representó el 25% del total de los aislados bacterianos de muestras fecales de indivi-

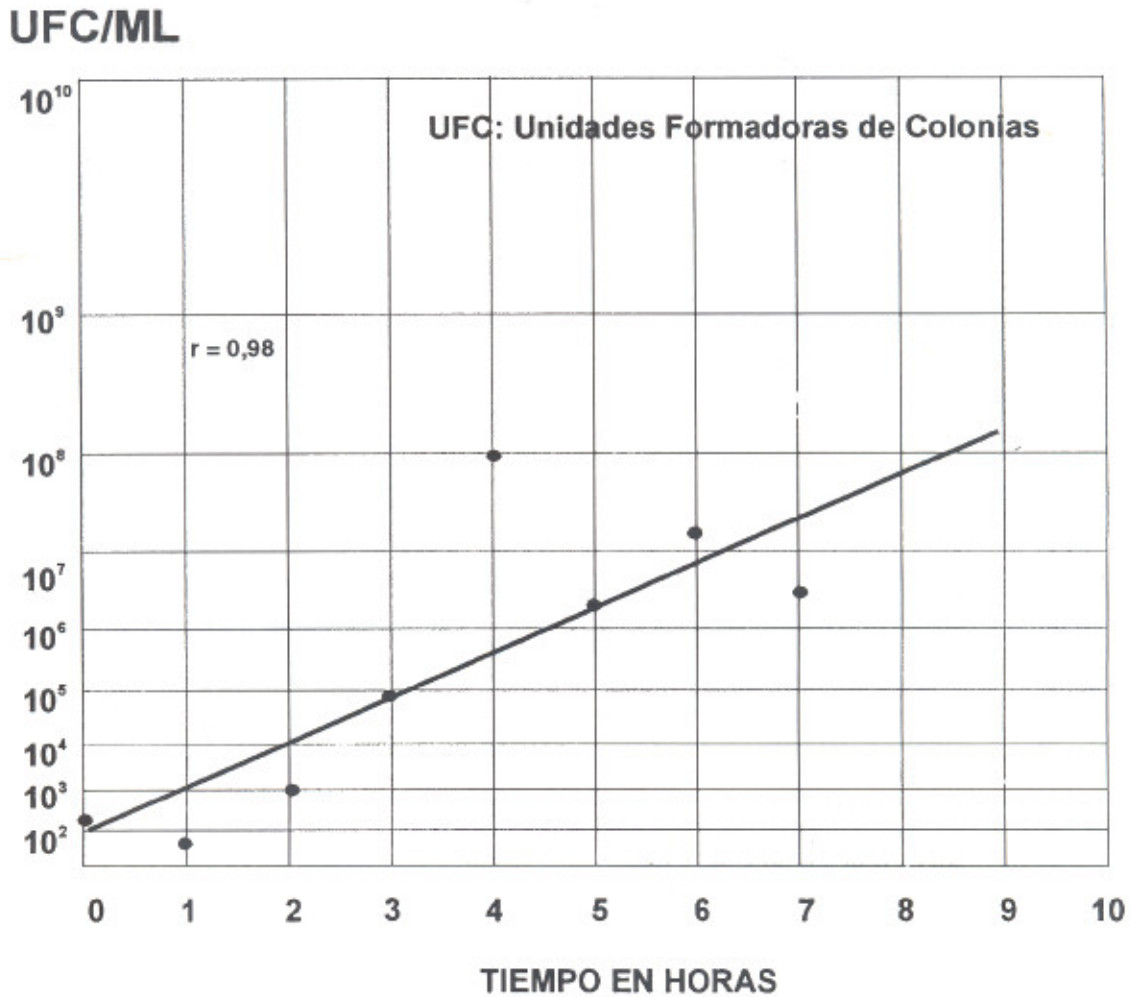


Figura 1. Curva de crecimiento de la cepa *V. cholerae* EL TOR según la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ml vs tiempo de crecimiento.

duos del Pueblo de Sinamaica. Las muestras fecales 1 y 2, correspondieron a dos pacientes hospitalizados con diarrea sospechosa para cólera. La tercera muestra positiva para cólera fue aislada de un paciente de tres años de edad. El recultivo de las muestras fecales (negativas) congeladas, al cabo de una semana y al cabo de un mes, no arrojaron resultados distintos a los obtenidos inicialmente.

Aislamiento de vibriófagos

Se logró la detección de entidades virales capaces de causar lisis bacteriana en la cepa de *Vibrio cholerae*, aislada en el presente estudio. El tipo de lisis observada en el cultivo bacteriano confluyente, correspondió a dos morfologías diferentes. Un tipo de placa estrecha más numerosa, con 4,0 mm de diámetro, con cierta opacidad. La otra placa de lisis lograda fue escasa, amplia y transparente, de 40 mm de diámetro. Estos microorganismos líticos, fueron aislados a

partir de dos de las muestras cólera positivo (No. 1 y 2, Pueblo de Sinamaica).

Propagación fágica

Como resultado del estudio de propagación fágica, se observó una escasa propagación de ambas cepas virales en la cepa bacteriana hospedadora salvaje. Se lograron 3 UFP/ml por la cepa de lisis total y 20 UFP/ml por la cepa de lisis parcial. El proceso de propagación viral se realizó en tres oportunidades, lográndose esencialmente los mismos resultados.

Es de hacer notar que la totalidad de las muestras fecales que arrojaron resultados negativos para la presencia de cólera, resultaron también negativos para la presencia de partículas virales.

Discusión

Aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae*

El resultados del estudio bacteriológico de las muestras fecales 1 y 2, provenientes de dos pacientes hospitalizados con diarrea sospechosa para cólera, fueron positivas para el biotipo EL TOR, como agente causal. La otra muestra positiva para cólera (No.3), fue aislada de un paciente de tres años de edad. El resto de las muestras resultaron negativas para la presencia de esta bacteria.

El recultivo de las muestras fecales congeladas para el aislamiento de *V. cholerae*, al cabo de una semana y al cabo de un mes, no arrojaron resultados distintos a los obtenidos inicialmente. La baja incidencia de *V. cholerae* aislado en las muestras fecales quizás se deba a una combinación de factores; el desarrollo de resistencia por parte de la población, recientemente expuesta al vibrio durante la epidemia; la

circunstancia endémica de la zona para cólera; la existencia de la fase no-cultivable de la bacteria y finalmente a la efectividad de las medidas sanitarias implementadas en la zona, durante la epidemia de 1993.

Aislamiento y propagación de vibriófagos

La observación de dos tipos de morfología en las placas de lisis bacteriana, podría atribuirse a la presencia de dos entidades virales distintas (36). La cepa salvaje de *V. cholerae*, biotipo EL TOR, no propagó adecuadamente las partículas virales aisladas, aun cuando fueron recuperadas de las respectivas muestras fecales. La comparación del tipo de entidad viral aislada, con aquellos reportados en la literatura hace necesaria una caracterización e identificación viral, a través del estudio de su patrón electroforético, serológico, morfológico y tamaño bajo microscopía electrónica (37).

Aunque la muestra No. 3 fue positiva para Vibrio cholerae, no se logró el aislamiento viral. La ausencia de éxito en la recuperación viral podría deberse a que la misma, fue obtenida por hisopado rectal. Quizás una mayor cantidad de materia fecal, con presencia de células blancas, sea un factor limitante. Esta observación puede inferirse basado en la ausencia de vibriófagos en las muestras fecales procesadas, cólera negativo.

Conclusiones

La metodología implementada permitió la detección de *Vibrio cholerae*, biotipo EL TOR, serogrupo O1, serotipo Ogawa en las muestras fecales estudiadas, de individuos ubicados en la zona endémica para cólera, Pueblo de Sinamaica, Municipio Páez, Estado Zulia. La positividad para cólera representó el 25% del total de muestras procesadas. Los resultados obtenidos corresponden

a la fecha y condiciones de estudio indicadas.

Se detectó la ausencia de *V. cholerae* en las muestras fecales de individuos de la otra zona endémica estudiada, Laguna de Sinamaica, Municipio Páez, Estado Zulia.

La cepa salvaje de *V. cholerae* aislada, fue susceptible a la lisis por fagos aislados de la misma muestra fecal, de individuos del Pueblo de Sinamaica. Se detectaron dos patrones de lisis bacteriana, total y parcial, empleando la cepa salvaje como blanco. La especificidad de los vibriófagos aislados y patrón de lisis obtenido podrían tener aplicabilidad en la fagotipia de cepas coléricas. Análisis de los resultados obtenidos indicaron una escasa propagación viral en la cepa de *V. cholerae*. Así mismo, el aislamiento de vibriófagos coléricos del tracto intestinal se encuentra condicionado a la presencia de *V. cholerae* como célula hospedadora.

Agradecimiento

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia, Maracaibo (Venezuela), Proyecto No. 1443-93. Se agradece en particular a Magaly Silva, representante del Centro Cultural Paraujano de la Laguna de Sinamaica; a Alí Fernández del Movimiento de Indígenas Paraujanos de LUZ; a Foad Harraka y Raiza Borges de la Medicatura del Pueblo de Sinamaica; a Xiomara Olivares y el personal de la Medicatura de Puerto Cuervito, Arelis Camacho y Xiomara Correa; finalmente a Jovito por su gentil colaboración y guía en la recolección de las muestras de la Laguna de Sinamaica, Puerto Cuervito.

Referencias Bibliográficas

1. YOUMANS G.P., PATERSON P.Y., SOMMERS H.M.: *The Biological and Clinical Basis of Infectious Diseases*. 2nd. ed. W.B. Saunders Co. 1980, pp. 535-539
2. GLASS R.I., CLAESON M., BLAKE P.A., WALDMAN R.J., PIERCE F.: Cholera in Africa: lesson on transmission and control for Latin America. *Lancet* 338(8770):791-795.
3. PETERS J.: From the Center of Disease Control. Cholera outbreak-Peru, Ecuador and Colombia. *JAMA* 265(17): 2175, 1991.
4. MORRIS J.G.: Non-O group 1 *Vibrio cholerae*: look at the epidemiology of an occasional pathogen. *Epidemiol Rev* 12:179-191, 1990.
5. GLASS R.I.: Plasmid-borne multiple drug resistance in *Vibrio cholerae* serogroup O1, biotype El TOR. Evidence for point-source outbreak in Bangladesh. *J Inf Dis* 147(2): 204-209, 1983.
6. GOYAL S. M., GERBA CH. P., BITTON G.: *Phage ecology*. John Wiley and Sons. New York (USA), 1987, pp. 321.
7. MATSUZAKU S., TANAKA S., KOG T., TAWATA T.: Broad host-range vibriophage, VP40, isolated from sea water. *Microbiol Immunol* 36(1):93-97, 1992.
8. JOKLIK W.K., WILLETT H.D., AMMOS B. D.: *Zinsser Microbiología*. P. 1413. 17va. Ed. Editorial Méica Panamericana, 1983.
9. CHATTERJEE S. N., DAS J., BAURA D.: Electron microscopy of cholera phages. *Ind J Med Res* 53: 934-937, 1965.
10. CHATTOPADHYAY S., KINCHINGTON D., GOSH R.: Characterization of *Vibrio* EL TOR typing phages: properties of the EL TOR phage C4. *J Gen Virol* 68:1411-1416, 1967.
11. CHOWDHRY R., DAS J.: Infection by cholera phage. *J Virol* 57(3):960-967, 1986.
12. GUTIERREZ T.: Serie biológica. Microorganismos. Departamento de Asuntos Científicos. Unión Panamericana, Secretaría General. OEA. *Monografía* No. 6. México (México), 1969, pp.

13. GUIDOLING A., MANNING P.: Genetics of *Vibrio cholerae* and its bacteriophages. *Microbiol Rev* 51(2):285-289, 1987.
14. CHOWDHURY R., BISWAS K. S., DAS J.: Abortive replication of cholera phage phi 149 in *Vibrio cholera* biotype EL TOR. *J Virol* 63(1):392-397, 1989.
15. WESTON L., DRECLER H., RICHERDSON H.: Characterization of vibriophage VA-1. *J Gen Virol* 21:155-158, 1973.
16. MITRA S. N.: Mutation induced by Vibriophage PS 166 infection changes biotype, a phage of *Vibrio cholerae*. *J Med Microbiol* 30(2):137-141, 1989.
17. MUKHERJEE S.: Bacteriophage typing of cholerae. *Bull WHO* 28:337-345, 1963.
18. GHOSH A.N., ANSARI M.Q., DATTA G.: Cholera phages. *J Gen Virol* 70(8):2241-3, 1989.
19. OGC J. G., TIMME T. I., ALEMOAMMAD M.M.: General transduction in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 31:737-741, 1981.
20. MUKHERJEE S.: Principles and practice of typing *Vibrio cholerae*. *Meth Microbiol* 12:51-115, 1978.
21. BELLET K., KEIN B., ALTRERI M., OCHSENSCHLAGER D.: *Vibrio fluvialis* and unusual pediatric enteric pathogen. *Pediat Emerg Core* 5(1):27-28, 1989.
22. CHATTERJEE S. N., DAS J., BAURA D.: Electron microscopy of cholera phages. *Ind J Med Res* 53: 934-937, 1965.
23. DEANS R. J. JACKSON E. N.: Restriction endonucleases Hind III cleavage site map of bacteriophage. *Virol* 95: 359, 1979.
24. DEE S. W.: *Coliphage. An optimization study*. Denver Water Department. Colorado, 1979, pp. 4.
25. GOLDBERG S., MURPHY J.R.: Molecular epidemiological studies of United States Gulf Coast *Vibrio cholerae* strains: Integration site for mutator vibriophage Vca-3. *Infect Immun* 42:224-230, 1983.
26. FARMER J.J., HICKMAN-BRENNER F.W., KELLY M.T.: *Vibrio*. In Lenette EH (ed.): *Manual of Clinical Microbiology*, 4th ed. Chap. 282-301. Washington, D.C., American Society for Microbiology. 1987.
27. DAVIS B., DULBECO R., EISEN H., HENSBURG H.S., WOOD W.B.: *Tratado de Microbiología*. Editorial Salvat. 3ra ed. Bogotá (Colombia), 1988, pp. 1559.
28. KRIEG N.R., HOLT L.G.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volumen 1, 9th ed. Williams & Wilkins. Baltimore (USA), 1984, pp. 964.
29. TORANZOS, G.: *Protocols for the isolation of coliphages. Advances in the detection of bacterial enteropathogens, virus and parasites in residual waters*. University of Arizona. Tucson (USA), 1992, pp. 45-70.
30. MONTIEL M. M.: Comparación de dos metodologías para el aislamiento de virus de camarones capturados del Lago de Maracaibo (Trabajo Especial de Grado). La Universidad del Zulia. Maracaibo (Venezuela), 1992, pp. 83.
31. SIDDIQUI K., BHATTACHARYYA F.: Role of temperate phage in determining lytic phage sensitivity and serotype of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 37(3):847-851, 1982.
32. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diarrhoeal diseases control (CDC) *PROGRAMME* 57(5):719-734, 1979.
33. MORRIS G. J., PICARDI J. L., LIED D., LEE J., TODERS A., GUNNR A., BLAKE P.A.: Isolation of nontoxigenic *Vibrio cholerae* O group 1 from a patient with severe gastrointestinal disease. *J Clin Microbiol* 19(2):296-297, 1984.
34. MUBASHIR M., KHAN A., BAGAI R., IGBAL J., GHAFOR A., ZUBERI S., BURNEY M. I.: Causative agent of acute diarrhoea in the first 3 years of life: hospital based-study. *J Gastroenterol Metapol* 5(3):265-270, 1990.

35. GERDES J. C., ROMIC W.R.: Complete and defective bacteriophages of Classical *Vibrio cholerae*: Relationship to the *Kappa* type bacteriophage. **J Virol** 15(5):1231-1238, 1975.
36. GOYAL S. M., GERBA CH. P., BITTON G.: **Phage ecology**. John Wiley and Sons. New York (USA), 1987, p 321.