

ANGELA CRISTINA TORRES DE ARAÚJO FIGUEIRÔA

**CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS
DO GÊNERO *VIBRIO* EM OSTRAS E PEIXES CAPTURADOS
NO LITORAL PERNAMBUCANO**

Recife, 2003

ANGELA CRISTINA TORRES DE ARAÚJO FIGUEIRÔA

CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS DO GÊNERO

***VIBRIO* EM OSTRAS E PEIXES CAPTURADOS NO LITORAL PERNAMBUCANO**

Tese apresentada ao Mestrado de Nutrição da UFPE, na área de concentração em Ciências dos alimentos, como requisito final à obtenção do Grau de Mestre.

Orientador: Dr. Ernesto Hofer

Tese aprovada em: 22 / 8 / 95

Membros da banca examinadora:

- Alzira Maria Paiva de Almeida
- Nonete Barbosa Guerra
- Maria Iêda Siqueira Linhares

Recife, 2003

À minha mãe, pelo incentivo e acalento
nos momentos mais difíceis.
Ao meu pai (In memoriam)

A Fernando.

Às minhas filhas, Fernanda e Carolina

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Ernesto Hofer, destacado pesquisador Nacional, pela orientação, estímulo, e apoio, decisivos para a concretização de nosso Mestrado.

Ao Dr. Alexandre Bezerra, então Secretário Adjunto de Saúde do Estado de Pernambuco, que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa no Laboratório Central Dr. Milton Bezerra Sobral.

A Waldêny Colaço Mariz, então Chefe da Divisão de Bromatologia e Química do Laboratório Central Dr. Milton Bezerra Sobral.

A Ulisses Ferraz, químico do LACEN, responsável pelas determinações químicas.

Ao Laboratório de Referência Nacional de Cólera, FIOCRUZ - RJ, pelas análises bacteriológicas complementares nas amostras isoladas.

A todos, que direta ou indiretamente, ao longo do curso e da pesquisa, contribuíram para que pudéssemos concluir este trabalho.

SUMÁRIO

Resumo.....	7
1. Introdução.....	8
2. Objetivos.....	17
3. Metodologia.....	18
3.1. Amostragem.....	18
3.2. Preparo das amostras.....	18
3.2.1. Peixes.....	18
3.2.2. Ostras.....	19
3.2.3. Mariscos.....	20
3.2.4. Água.....	20
3.2.5. Mechas.....	21
3.3. Identificação de vibrios.....	21
3.4. Análise estatística.....	22
4. Resultados.....	24
4.1. Isolamento de Vibrio no litoral pernambucano.....	24
4.2. Efeito da concentração de NaCl no isolamento primário de Vibrio.....	26
4.3. Efeito da temperatura no isolamento de Vibrio	28
4.4. Influência do pH, salinidade e temperatura da água no isolamento de Vibrio	30
4.5. Influência da sazonalidade no isolamento de Vibrio	30
4.6. Perfil bioquímico dos vibrios patogênicos isolados.....	31
5. Discussão.....	33
6. Conclusões.....	37
Summary.....	39
7. Referências Bibliográficas.....	40

Comentário:

RESUMO

No período de outubro de 1992 a setembro de 1993, foram estudadas 139 amostras de ostras, mariscos, peixes, água e mechas (swab de Moore), procedentes de três pontos distintos do litoral pernambucano.

De 629 culturas de vibrios halofílicos isolados, 451 (71,7%), foram caracterizadas em espécies de **Vibrio** potencialmente patogênicas para o homem, assim distribuídas: **V. alginolyticus**, 220 (48,7%); **V. parahaemolyticus**, 204 (45,2%); **V. fluvialis**, 15 (3,3%); **V. vulnificus** 10 (2,2%), **V. furnissii**, 1 (0,2%) e **V. cincinnatiensis**, 1 (0,2%).

No processo de enriquecimento foi utilizado água peptonada alcalina pH 8.5 nas concentrações de 1% e 4% de NaCl, e incubadas nas temperaturas de 37° e 42°. A concentração de 1% de NaCl apresentou maior eficiência no isolamento da maioria das espécies identificadas. A diferença de temperatura não influenciou no resultado. Todas as amostras analisadas apresentaram positividade para alguma espécie de **Vibrio**. Fatores abióticos como salinidade, pH e temperatura da água favorecem esta disseminação no litoral.

Vibrios halofílicos estão amplamente distribuídos na biocenose do litoral pernambucano, favorecendo a sua veiculação para o homem e por conseguinte torna-se um problema de saúde pública, devendo a sua pesquisa ser introduzida na rotina laboratorial.

INTRODUÇÃO

Durante muitos anos os estudos sobre a família **Vibrionaceae** se concentraram na espécie **Vibrio cholerae**, sorogrupo O₁, devido ser o agente responsável por sete pandemias de cólera. Somente a partir dos três últimos decênios, as investigações sobre outros membros do gênero **Vibrio** despertaram algum interesse nos pesquisadores, resultando na descoberta e reconhecimento de outras espécies potencialmente patogênicas para o homem.

Além deste aspecto, observou-se que a taxonomia dessa família avançou nos dois últimos decênios de forma extraordinária estabelecendo a nítida distinção entre os gêneros **Vibrio**, **Aeromonas**, **Plesiomonas** e **Photobacterium** assim como, vem possibilitando a melhoria da definição das espécies dentro de cada gênero. (Colwell, 1984; Janda, 1988; Kelly, 1991; OMS, 1991).

Atualmente, são reconhecidas 35 espécies do gênero **Vibrio**, 12 das quais potencialmente patogênicas para o homem, citando-se como de importância médica as seguintes: **Vibrio cholerae**, **Vibrio parahaemolyticus**, **Vibrio fluvialis**, **Vibrio furnissii** e **Vibrio vulnificus**. Outros organismos implicados como patógenos oportunistas são: **V. alginolyticus**, **Vibrio damsela**, **Vibrio holissae**, **Vibrio mimicus**, **Vibrio metschnikovii**, **Vibrio cincinnatiensis** e **Vibrio carchariae**. (Morris, 1985; West, 1989; Kelly, 1991).

O primeiro vibrião não colérico a ser reconhecido como patógeno humano foi **Vibrio parahaemolyticus**, uma bactéria halofílica, estuarina e comum em moluscos. Embora responsável por cerca de 40 a 60% dos casos de intoxicação alimentar ocorridas no Japão, o **Vibrio**

parahaemolyticus, permaneceu por quase 20 anos praticamente desconhecido em outros países. Com a evolução dos estudos passou a ser considerado como mais um agente da gastroenterite em humanos, sendo veiculado por alimentos marinhos. (Hofer, 1974; Gelli, 1975/76; Baumann, 1984; Hofer & Silva, 1986; Chan, 1989; Wong, 1992). Sua patogenicidade está relacionada com a produção de uma hemolisina capaz de produzir a lise total nos eritrócitos humanos. Essa reação é conhecida como fenômeno Kanagawa (KP) e, curiosamente, as amostras ambientais de ***Vibrio parahaemolyticus*** são predominantemente negativas. Por outro lado, os isolados de processos entéricos são quase exclusivamente KP+ (West, 1989). Embora raro, pode também ser causa de infecções cutâneas particularmente, em indivíduos após contatos recreativos com a água do mar. (Colwell, 1984). Sua ecologia tem sido extensivamente estudada com relatos da Indonésia, Japão, Coréia e Vietnã. (Baumann, 1984; Colwell, 1984; Chan, 1989;). É importante destacar que ***Vibrio parahaemolyticus*** e outros vibrios halofílicos foram isolados em 7 tipos de alimentos marinhos em Hong Kong e cinco em Taiwan. (Chan, 1989; Wong, 1992).

Por outro lado, outras espécies de vibrios ambientais como o ***Vibrio vulnificus*** vem atraindo cada vez mais as atenções. (Morris, 1988; Venkateswaran, 1989; Kelly, 1991). O primeiro relato de infecção humana por esta espécie, foi reportado em 1970 retratando um caso de infecção cutânea e diarreia em um homem que teve como história retrospectiva, o recolhimento de mariscos do mar. Por serem a maioria das infecções atribuídas ao ***Vibrio parahaemolyticus*** o reconhecimento da severidade e frequência de infecções por ***Vibrio vulnificus***, só tornou-se aparente

depois de 1970 e estão invariavelmente, associadas ao consumo de moluscos bivalvos crus contaminados ou pelo contato com ambiente aquático natural. Contudo, muitos casos passam despercebidos possivelmente pelo desconhecimento desses patógenos, tanto do ponto de vista laboratorial como clínico (Chan, 1989; Kelly, 1991; Rodrigues, 1992).

Em 1977, surge uma nova espécie, ***Vibrio fluvialis***, isolada de um caso de diarreia, emergindo como enteropatógeno potencial e presente em ambiente aquático natural. Um outro caso de gastroenterite por ***Vibrio fluvialis***, foi relatado por Spellman et. al, 1986 após consumo de ostras cruas contaminadas. Foi isolado também de águas costeiras, mariscos e outros alimentos marinhos. (Rodrigues, 1986; Chan, 1989).

Entre os vibrios considerados como oportunistas para o homem surge o ***Vibrio alginolyticus***, como causa de infecções mistas em feridas, tendo preferência nas localizações o ouvido externo e médio. Frequentemente está presente em ambiente marinho e frutos do mar, ocorrendo com elevada densidade em águas marinhas. As infecções humanas estão, invariavelmente, associadas com recente exposição ao ambiente aquático salino. (Baumann, 1984; Colwell, 1984; West, 1989; Wong, 1992).

Outras espécies reconhecidas como novos patógenos humanos incluem ***Vibrio damsela***, ***Vibrio holissae***, ***Vibrio mimicus***, ***Vibrio metschnikovii***, ***Vibrio furnissii***, presentes no ambiente marinho e responsáveis por casos de diarreia aguda, septicemia, infecções cutâneas e meningite. Salienta-se que o ***Vibrio metschnikovii*** é conhecido desde 1884. (Kelly, 1991).

Os organismos mais recentemente descritos *como patógenos de origem marinha, incluem o **Vibrio cincinnatiensis** e o **Vibrio carchariae***, sendo o primeiro isolado de um caso de septicemia e meningite em um homem idoso, imunodeprimido. Meningites causadas por esta espécie são raras, porém, fatais. O ***Vibrio carchariae***, por sua vez, foi isolado de infecções humanas extra intestinais, tendo como forma de transmissão a mordedura por certos tubarões. (Kelly, 1991).

Do ponto de vista ecológico os víbrios ocorrem naturalmente em sistemas aquáticos e a distribuição das espécies neste ecossistema são influenciadas pela temperatura, salinidade, concentração de nutrientes, pH e o potencial de associação com sedimentos da superfície de organismos. (Venkateswaran, 1989; Wong, 1992). Sem dúvida alguma, a temperatura da água talvez seja o fator mais importante na atuação sobre a prevalência/incidência de víbrios patogênicos em ambiente aquático natural. Os víbrios patogênicos são freqüentemente encontrados em ambientes cuja temperatura da água situa-se entre 10° C a 30° C . Essa variação é sazonal e geográfica. (De Paola, 1983; Hofer & Silva, 1984;).

Quanto às características halofílicas as espécies patogênicas de vibrio ocorrem mais comumente em águas cuja salinidade situa-se entre 0,5 a 30 ‰, resultando, portanto, na localização em áreas costeiras ou estuarinas. (Tison, 1986; West, 1989). Contudo, em ambientes de água doce a baixa salinidade é compensada pela interação entre a temperatura elevada e concentração de nutrientes. (De Paola, 1983). Também como fator de importância para a manutenção desses microrganismos no ecossistema, refere-se ao pH, sempre mais favorável na faixa de

neutralidade para alcalinidade. Outro aspecto está relacionado com a associação entre os vibrios e a grande variedade de organismos aquáticos do ambiente, incluindo zooplankton, crustáceos, moluscos e peixes. Os vibrios normalmente produzem a enzima quitinase responsável pela adsorção e fixação das bactérias na quitina presente no exoesqueleto, escamas e carapaças dos animais. (Kelly, 1988; West 1989). Torna-se evidente que a associação desses fatores ecológicos propiciam a manutenção dos vibrios no ambiente aquático. O número de bactérias presentes na água, determinam a contaminação de moluscos bivalvos, em decorrência dos alimentos que são introduzidos pela filtração da água com material de plancton, principalmente o zooplankton, colonizados por espécies de vibrios. Deste modo, com frequência, os moluscos são incriminados como veiculadores de agentes etiológicos de importância médica. (Gelli, 1979).

No Nordeste brasileiro são os estuários o ambiente típico de ocorrência das concentrações populacionais de ostras. Os estuários são classificados segundo características da salinidade e sob este aspecto Emery e Stevenson (1957) distinguem 02 tipos principais: normal ou positivo, no qual a salinidade é reduzida rio acima e o segundo hipersalino ou negativo, ocorrendo, geralmente, em locais onde a evaporação excede o influxo de água doce e a salinidade é mais elevada do que no oceano. A mistura e a circulação das águas num estuário são fenômenos complexos, resultantes da conjugação de vários fatores, podendo as águas marinhas e continentais, num determinado tempo estarem completamente ou parcialmente misturadas, ou ainda, estratificadas. (Fernandes, 1981).

Nesta biocenose a flora bacteriana ocupa uma posição de destaque resultante da liberação dos nutrientes através da decomposição da matéria orgânica, vindo a se constituir num substancial suprimento

alimentar para as formas de animais filtradores.

As ostras estuarinas do Nordeste brasileiro, são encontradas principalmente fixadas às raízes dos mangues, na região entre marés, onde ficam alternativamente imersas pelas variações semi-diurnas da maré.

As ostras são organismos sésseis, profundamente afetadas pelo ambiente, filtradores e como tal, coletam partículas em suspensão na água. No entanto, são capazes de uma seleção dessas partículas, que pode ser quantitativa, baseada no tamanho e densidade e, qualitativa, observada em ostras do gênero ***Crassostrea***. O mecanismo seletivo é extremamente complexo, envolvendo a ação concomitante de cílios encontrados nas brânquias e palpos labiais e de muco. O movimento dos cílios cria uma corrente de água que penetra no corpo e ao atravessar as brânquias passa por finíssimos poros que retêm as partículas que estavam em suspensão na água. As partículas selecionadas são ingeridas e as retidas eliminadas como pseudo fezes por movimento brusco das valvas. (Fernandes, 1981). A filtração é influenciada por condições fisiológicas como maturação sexual e das características ambientais como salinidade, temperatura e pH da água, que provocam o fechamento das valvas ou impedem os movimentos ciliares.

As ostras são afetadas pelas partículas que ingerem e como filtradoras, são capazes de acumular grandes concentrações de organismos que podem ser tóxicos, como bactérias, dinoflagelados, vírus e fungos. Elas podem morrer pela ação das toxinas microbianas, ou quando não são sensíveis às mesmas, acumulam tais substâncias tóxicas ou microrganismos e são capazes de produzirem intoxicação ou toxinfecção no

homem, resultante do consumo de ostras in natura. (Gelli, 1975/76; Fernandes, 1981).

Sob este prisma, destacam-se várias investigações realizadas no Brasil, mostrando a presença de vibrios ambientais envolvidos em processos entéricos quase sempre associados ao consumo de ostras e outros alimentos marinhos contaminados com estes microrganismos.

Gelli, (1975/76), investigando 101 amostras de ostras e outros alimentos marinhos no litoral de São Paulo, isolaram o ***Vibrio parahaemolyticus*** em 75% destas amostras. Outro estudo realizado em São Paulo por Leitão e Arima, (1976), detectou a presença de ***Vibrio parahaemolyticus*** em 100% das ostras pesquisadas, o mesmo ocorreu com Hofer & Silva, (1986). Por outro lado, os estudos de Gelli et al., (1979), no litoral de São Paulo e norte do Paraná, relatam a influência sazonal na incidência numérica de ***Vibrio parahaemolyticus*** e ***Escherichia coli*** em ostras, chamando atenção para a importância médica do aspecto sanitário relacionado com as determinações microbiológicas realizadas. Zebral, (1985), identificou 4 cepas de ***Vibrio*** lactose positiva, a partir de mexilhões da baía de Guanabara, RJ. Ainda na esfera ecológica, Rodrigues & Hofer, (1986), caracterizaram 390 espécies do gênero ***Vibrio*** do ecossistema água/ostra da baía de Sepetiba, RJ, em ***Vibrio cholerae*** não O₁, ***Vibrio alginolyticus***, ***Vibrio parahaemolyticus***, ***Vibrio fluvialis***, ***Vibrio harveyi***, ***Vibrio damsela***, e ***Vibrio. vulnificus***.

Na esfera clínica os primeiros relatos de ***Vibrio parahaemolyticus*** e ***Vibrio cholerae*** não O₁ em processos entéricos humanos foram efetuados por Hofer, (1983 e 1987). Por outro lado, Magalhães, V. et al, (1990),

isolaram o ***Vibrio fluvialis*** em paciente adulto com gastroenterite, o que parece tratar-se do primeiro relato no Brasil, como afirmam os autores. Nesse mesmo ano Magalhães, V. identificou o ***V. parahaemolyticus*** a partir de casos clínicos e ostras, o que também ocorreu em investigação de Magalhães, M. (1991). Mais recentemente, Magalhães, V. et al, (1992), apresentaram a análise de 3.250 amostras de fezes diarréicas no Recife, onde destacaram 55 linhagens de vibrios distribuídos nas espécies ***Vibrio parahaemolyticus***, ***Vibrio furnissii***, ***Vibrio cholerae*** não O₁, ***Vibrio alginolyticus***, ***Vibrio fluvialis*** e *Vibrio* sp.

As pesquisas acima relatadas mostram que a ocorrência de infecções com espécies de ***Vibrio***, estão intimamente relacionadas à presença destes patógenos no ambiente e alimentos marinhos. Do ponto de vista sanitário, torna-se um grave problema de saúde pública, uma vez, que ostras podem ser consumidas in natura, favorecendo portanto, a veiculação de toxinfecções por agentes de etiologias diversas, como bactérias, vírus e fungos. (Gelli, 1975/76; Eiroa, 1980; Feachem, 1983). A função da ostra como reservatório natural, favorece a disseminação de microrganismos incluindo os vibrios marinhos, os quais também encontram no organismo humano condições para desenvolver alguns quadros mórbidos. (De Paola, 1981; Feachem, 1983).

Considerando os aspectos citados e a importância desses microrganismos como patógenos humanos, além da presença marcante dos mesmos no ambiente marinho favorecidos pelas condições ambientais do Nordeste brasileiro, tornou-se a razão de se avaliar a presença de espécies potencialmente patogênicas do gênero ***Vibrio*** em nosso meio.

2. OBJETIVOS

- Avaliar a distribuição de espécies halofílicas do gênero **Vibrio** potencialmente patogênicas para espécie humana, oriundas de pescado no litoral pernambucano;
- Analisar as possíveis influências laboratoriais que possam interferir na fase de isolamento de representantes do gênero **Vibrio**.

3. METODOLOGIA

3.1 Amostragem

Durante o período de outubro de 1992 a setembro de 1993, foram analisadas 127 espécimens marinhos capturados em três pontos de pesca distintos do litoral pernambucano (figura 1), assim distribuídos:

1. Itapissuma (litoral Norte), 32 amostras de ostra (**Crassostrea rizophorae**), segundo Fernandes, (1981); 8 amostras de peixes da costa, representadas por sardinha (1), carapeba (2), camorim (2), tainha (3).
2. Praia de Suape (litoral Sul), 38 amostras de mariscos.

3. Estuário do Pina (cidade do Recife), 29 amostras de ostras (***Crassostrea rizophorae***); 12 amostras de mariscos; 04 amostras de peixes da costa, representadas por sardinha (1), saúna (1), ubarana (1) e carapeba (1) e 04 amostras de peixes do alto-mar, representadas por dourado (1), cavala (1) e cioba (2).

Foram coletadas 03 amostras de água e 01 mecha de Moore colocada nos três pontos, totalizando 09 e 03 amostras, respectivamente.

3.2. Preparo das amostras

3.2.1. Peixes

Para os peixes recém chegados do mar, foi utilizado a técnica do “swab” em superfície, que consistiu em esfregá-lo na superfície externa dos peixes e guerras, inocular imediatamente nos meios de enriquecimento e transportá-los ao laboratório em temperatura ambiente, onde permaneceram por 18h. A partir daí, foi realizado um segundo enriquecimento, retirando-se em torno de 5 alçadas da película superficial do enriquecimento anterior posto que os vibriões migram preferentemente para estas zonas, submetendo as amostras a duas concentrações diferentes de sal.

Os meios de cultura utilizados no processo de enriquecimento e distribuídos em volumes de 10 ml por tubo, foram os seguintes:

- Água peptonada alcalina com 1 g% de NaCl, pH 8.5;
- Água peptonada alcalina com 4 g% de NaCl, pH 8.5.

As amostras enriquecidas com APA a 1%, foram incubadas a 37° e 42° C por 6 a 8 h, enquanto aquelas enriquecidas a 4% de NaCl, foram incubadas a 37° C por 24 h. Após este período, foram subcultivadas em Agar TCBS (Tiosulfato citrato sais biliares e sacarose da Difco) e incubaram-se a 37° C por 24 h.

Foram selecionadas em torno de 10 colônias suspeitas de *Vibrio* sacarose positivas (colônias amarelas) e sacarose negativas (colônias verdes) e inoculadas no meio de triagem Rugai modificado por Pessoa & Silva, (1972), sendo incubadas a 37° C por 24 h.

3.2.2. Ostras

As ostras foram obtidas diretamente dos barcos de pesca, no momento em que chegavam à praia e transportadas ao laboratório em isopor com a própria água do mar/estuário e gelo, onde permaneceram sob refrigeração a 4° C por 16 a 18 h. Sendo após este período lavadas e escovadas para remover o excesso de detritos da superfície externa da concha. Normalmente, foram usadas 10 ostras para se obter 25 g (líquido + carne) para 225 ml dos meios de enriquecimento, que em seguida foram homogeneizadas em triturador estéril. Os meios de enriquecimento, foram os mesmos utilizados para a pesquisa em peixes, sendo 225 ml de APA com 1% de NaCl, dividido em 02 alíquotas de 125 ml cada, incubadas a 37° e 42° C e 225 ml em APA com 4% de NaCl, incubadas a 37° C seguindo o esquema anterior.

3.2.3. Mariscos

Foram utilizados os mesmos critérios de processamento e de enriquecimento descritos para ostras.

3.2.4. Água

As amostras foram analisadas do ponto de vista microbiológico segundo o esquema de isolamento e identificação de *Vibrio cholerae* do Manual de Diagnóstico Laboratorial para Cólera do Ministério da Saúde, (1992). Foram também realizadas as seguintes determinações: pH (pelo potenciômetro) e cloretos, segundo a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985).

3.2.5. Mecha de Moore

Mechas estéreis elaboradas a partir de tiras de mais ou menos 1 metro de gaze dobrada várias vezes, presas em uma malha e amarradas com cordão, foram colocadas nos pontos de coleta, onde permaneceram submersas durante 72 h. Após este período, retiradas e inoculadas em água peptonada alcalina(450 ml), transportadas ao laboratório em temperatura ambiente seguindo esquema de isolamento similar à água.

3.3. Identificação de *Vibrio*

Para o enquadramento na família *Vibrionaceae* das linhagens isoladas foi utilizado o teste de oxidase em disco (Cecon). Os organismos oxidase positiva foram analisadas no seu comportamento diante dos seguintes testes:

- Crescimento em tryptona both pH 7.2 com NaCl nas concentrações 0, 3, 6, 8 e 10%;

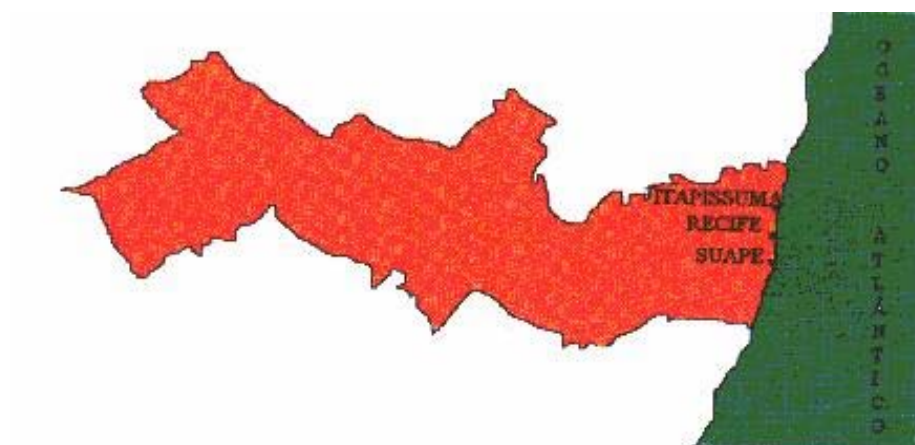
- Atividade fermentativa sobre os carboidratos: glicose, lactose, sacarose, arabinose, manose, manitol, salicina e celobiose;
- Produção de H₂S, indol, urease, redução do nitrato, VP (Voges-Proskauer), descarboxilação da lisina, ornitina e arginina dehidrolase, sensibilidade ao agente vibriostático O/129. (Hofer, 1978; Manual do Ministério da Saúde, 1991; Mac Fadin, 1980).

As culturas identificadas como **V. parahaemolyticus**, foram submetidas ao teste de Kanagawa, segundo Fishbein & Wentz, 1973. Salienta-se que os meios de cultura utilizados nos testes bioquímicos foram suplementados com 1 g% de NaCl. A leitura foi efetuada após 48 h de incubação a 37° C para a atividade fermentativa dos carboidratos e 72 a 96 h para as descarboxilases. O teste da oxidase foi avaliado imediatamente.

3.4 . Análise estatística

Na análise estatística foi utilizado o teste de igualdade das proporções, com nível de significância considerado de 5%. (Armitage, 1987).

FIGURA 1



PONTOS DE COLHEITA DOS ESPÉCIMENS

ESTADO DE PERNAMBCUO

[illegible]

espécies	Marisco n=150		ostra n=183		peixe n=48		água n=27		mecha n=9	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
V. splendidus	2	1,3	3	1,6	--	--	--	--	--	--
V. anguillarum	-	-	5	2,7	--	--	--	--	--	--
V. aestuarinus	1	0,6	1	0,5	--	--	1	3,7	2	22,2
V. tubiashi	1	0,6	2	1,0	--	--	--	--	--	--
V. sp	-	-	1	0,5	--	--	--	--	--	--
	33	22,0	50	27,3	2	4,1	8	29,6	6	66,6

n = número de análises efetuadas, considerando três análises efetuadas por amostras.

Do total de 629 isolamentos, foi possível a identificação de 451 (71,7%), culturas em seis espécies potencialmente patogênicas para o homem: **V. alginolyticus**, **V. parahaemolyticus**, **V. fluvialis**, **V. vulnificus**, **V. furnissii** e o **V. cincinnatiensis**. (Tabela 2).

Como pode-se observar na tabela 2, a distribuição das espécies não foi homogênea. O **V. alginolyticus** e o **V. parahaemolyticus** foram mais prevalentes em mariscos e ostras, e as únicas presentes em peixes. Embora a incidência de outras espécies não tenha sido elevada, com apenas um isolamento do **V. cincinnatiensis** e do **V. furnissii** em mariscos, mas ficou evidente que todos os espécimens analisados sempre apresentaram positividade para pelo menos uma espécie patogênica de **Vibrio**, o que espelha a ampla disseminação de membros da família **Vibrionaceae** naquele ambiente marinho.

TABELA 2

Distribuição numérica e percentual de espécies de Vibrio potencialmente patogênicas isoladas das diferentes fontes do ambiente marinho

espécies	marisco n=183		ostra n=185		peixe n=43		água n=25		mecha n=15	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%

espécies	marisco n=183		ostra n=185		peixe n=43		água n=25		mecha n=15	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
V. alginolyticus	80	43,7	95	51,3	25	58,1	14	56,0	6	40,0
V. parahaemolyticus	89	48,6	77	41,6	18	41,8	11	44,0	9	60,0
V. fluvialis	9	4,9	6	4,3	--	--	--	--	--	--
V. vulnificus	4	2,1	6	4,3	--	--	--	--	--	--
V. furnissii	1	0,5	--	--	--	--	--	--	--	--
V. cincinnatiensis	--	--	1	0,5	--	--	--	--	--	--

n = número de isolamentos considerando 3 análises efetuadas por amostra.

4.2. Efeito da concentração de NaCl no isolamento primário do gênero

Vibrio

- O estudo do efeito da concentração de NaCl no isolamento de espécies do gênero **Vibrio** mostrou os resultados visualizados na (Tabela 3).
- A concentração de 1% de NaCl, revelou-se mais satisfatória para a maioria das espécies isoladas ($p < 0,05$)

TABELA 3

Distribuição numérica e percentual das espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicas isoladas em relação a concentração de NaCl do meio de enriquecimento

	marisco n=50				ostra n=61				peixe n=16				água n=10	
	1%		4%		1%		4%		1%		4%		1%	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>V. alginolyticus</i>	25	50,0	29	58,0	25	40,9	36	59,6	10	66,5	7	43,7	5	55,5
<i>V. parahaemolyticus</i>	40	80,0	15	30,0	33	54,1	17	27,8	6	37,5	3	18,7	4	44,4
<i>V. fluvialis</i>	3	6,0	--	--	2	3,2	1	1,6	--	--	--	--	--	--
<i>V. vulnificus</i>	3	6,0	--	--	2	3,2	1	1,6	--	--	--	--	--	--
<i>V. furnissii</i>	1	2,0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

n = número de amostras

- No tocante a natureza do espécime em relação à concentração de NaCl no meio, os resultados foram os seguintes:
 - I. **V. alginolyticus** apresentou maior incidência na concentração de 1%, exceto no material ostra, cujo isolamento foi mais satisfatório na concentração de 4% NaCl ($p < 0,05$);
 - II. **V. parahaemolyticus** foi mais detectado a partir do crescimento em meio com 1% de NaCl ($p < 0,05$), indicando grandes diferenças na presença dessa bactéria entre os graus de concentração de NaCl utilizados, exceto nos espécimens de peixes que não revelou diferenças significativas entre ambas concentrações. ($p > 0,05$);
 - III. Quanto as espécies **V. fluvialis**, **V. vulnificus**, **V. furnissii** e **V. cincinnatiensis** analisadas conjuntamente, indicaram mais uma vez, que a concentração de 1% de NaCl foi mais eficiente no isolamento destas espécies. ($p < 0,05$).

4.3. Efeito da temperatura no isolamento de Vibrio

O estudo comparativo da presença de espécie patogênicas de **Vibrio** em relação às temperaturas de incubação aplicadas nos meios (37° e 42° C) não apresentou diferença significativa no isolamento destas bactérias. ($p > 0,05$). (Tabela 4). Logo, não é necessário a utilização das duas temperaturas no esquema de isolamento.

TABELA 4

Distribuição numérica e percentual das espécies de *Vibrio* potencialmente
isoladas em relação à temperatura de incubação do meio de enriquecimento

	marisco n=50				ostra n=61				peixe n=16				água n=10	
	37° C		42° C		37° C		42° C		37° C		42° C		37° C	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>V. alginolyticus</i>	25	50,0	26	52,0	25	40,9	34	55,7	10	62,5	8	50,0	5	55,
<i>V. parahaemolyticus</i>	40	80,0	34	68,0	33	54,1	27	44,2	6	37,5	9	56,2	4	44,
<i>V. fluvialis</i>	3	6,0	6	12,0	2	3,2	3	1,6	--	--	--	--	--	--
<i>V. vulnificus</i>	3	6,0	1	2,0	2	3,2	3	1,6	--	--	--	--	--	--
<i>V. furnissii</i>	1	2,0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>V. cincinnatiensis</i>	--	--	--	--	--	--	1	1,6	--	--	--	--	--	--

n = número de amostras

4.4. Influência do pH, salinidade e temperatura da água no isolamento de Vibrio

As determinações do pH e cloretos foram realizadas nos meses de março e agosto, cujos resultados encontram-se na tabela 5.

É interessante observar que o pH da água nos três pontos pesquisados do litoral pernambucano, situou-se na faixa da neutralidade para a alcalinidade o que favorece a manutenção de vibrios halofílicos neste ambiente. O mesmo ocorreu com a salinidade, cuja concentração situou-se em torno de 28,3 a 31,1 g/l e a temperatura em média de 26° C.

TABELA 5

Determinação de pH e salinidade em dois períodos das amostras de água recolhidas em três locais distintos do litoral

Período	Itapissuma		Pina		Suape	
	salinidade g/l	pH	salinidade g/l	pH	salinidade g/l	pH
março	31,1	7.9	33,5	7.6	34,8	7.6
agosto	28,3	7.9	33,5	7.6	26,3	7.6

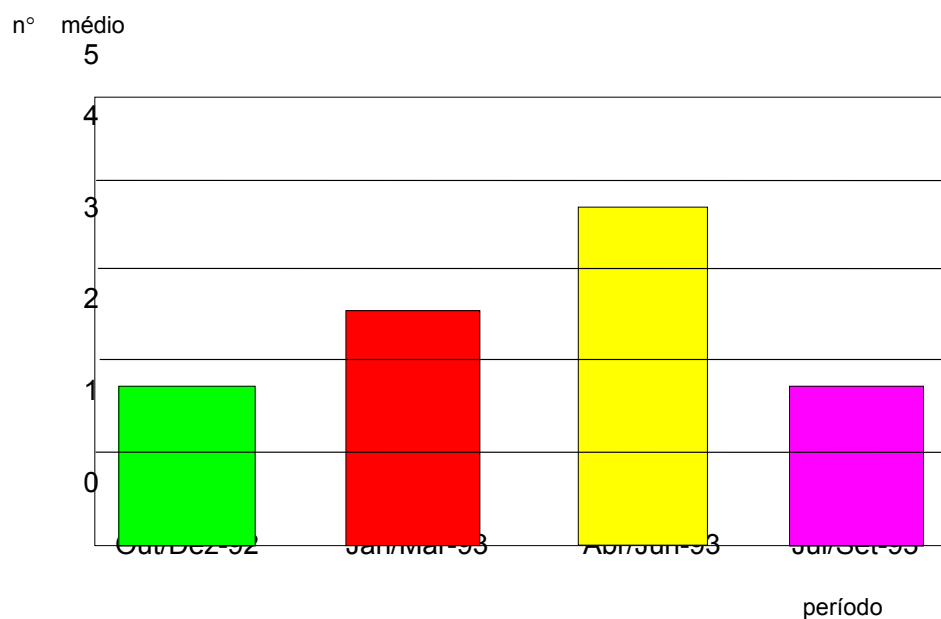
4.5. Influência da sazonalidade no isolamento de Vibrio

A variação sazonal de vibrios halofílicos, apresentada na figura 2, demonstrou uma ampla distribuição destes patógenos em todo o período (out. 92 a set. 93), com maior índice de isolamento nos meses de abril a junho; coincidentemente, a salinidade neste período apresentou-se mais

elevada, havendo uma diminuição no mês de agosto, provavelmente resultante da influência das chuvas ocorridas nesse período.

FIGURA 2

Prevalência das espécies potencialmente patogênicas do gênero *Vibrio* por período



4.6. Perfil bioquímico de vibrios patogênicos isolados

O perfil bioquímico das espécies patogênicas de ***Vibrio*** isoladas, independente da procedência, mostrou uniformidade de comportamento frente aos testes bioquímicos utilizados (Farmer, 1985). Todas as amostras do ***V. parahaemolyticus*** analisadas apresentaram teste de Kanagawa negativo conforme tabela 6.

TABELA 6

**Percentual de positividade no perfil bioquímico de espécies halofílicas
de *Vibrio* isoladas de fontes do ambiente marinho**

provas	V. alginolyticus n = 220	V. parahaemolyticus n = 204	V. fluvialis n = 15	V. vulnificus n = 10	V. furniss n = 1
Glicose ac. s/gas	100	100	100	100	100
Manitol	100	100	100	100	100
Lactose	0	0	0	0	0
Sacarose	100	0	100	100	0
Arabinoso	5	10	80	100	10
Manose	1,9	100	100	100	100
Salicina	nt	nt	nt	96	nt
Celobiose	nt	nt	nt	99	nt
Lisina desc.	100	100	0	0	100
Arginina dihidr.	0	0	93,3	100	0
Ornitina desc.	13,7	100	0	0	100
Crescimento em:					
0% NaCl	0	0	0	0	0
3% NaCl	100	100	100	100	100
6% NaCl	100	100	80	100	100
8% NaCl	100	87,7	93,3	100	0
10% NaCl	85	1	33	0	0
Indol	97,7	99	46,6	100	100
Voges- Proskauer	94	100	6,6	0	0
Nitrato-Nitrito	100	100	100	100	100
Oxidase	100	100	100	100	100
Ag. vibriostático					
O/129-10 µg (s)	nt	nt	nt	100	nt
150 µg (s)	100	100	100	100	100
Kanagawa	nt	0	nt	nt	nt

nt = não testado s = sensível

5. DISCUSSÃO

O estudo ecológico de vibrios em sistemas aquáticos, tem despertado o interesse de pesquisadores em todo o mundo. As atenções também se voltam para a esfera sanitária, tendo em vista, que microrganismos como **Vibrio**, estão presentes na fauna marinha e constituem um risco em potencial para a saúde do homem. (Gelli, 1975/76; Hofer & Silva, 1986).

Nossos resultados revelam que espécies halofílicas patogênicas para o homem como: **V. alginolyticus**, **V. parahaemolyticus**, **V. fluvialis**, **V. vulnificus**, **V. furnissii** e **V. cincinnatiensis**, estão presentes em alimentos marinhos, representados pela ostra, marisco e peixe além da água do mar e da mecha depositada no litoral pernambucano. (Tabela 1). Tais dados coincidem com aqueles apresentados por diversos autores (Rodrigues & Hofer, 1986; Chan, 1989; Wong, 1992).

Do ponto de vista ecológico, os vibrios ocorrem naturalmente em sistemas aquáticos e a distribuição das espécies são afetadas pela temperatura da água, pH, salinidade e concentração de nutrientes. (De Paola, 1983; Colwell, 1984; Venkateswaran, 1989). Sob este prisma, a costa do Nordeste brasileiro, torna-se um ambiente favorável à manutenção de vibrios, cuja temperatura situa-se em torno de 26°C com uma salinidade na faixa de 28,3 a 34,8 g/l e um pH alcalino (7.6 a 7.9).

Outro aspecto está relacionado com a associação entre os vibrios e a grande variedade do ambiente, incluindo zooplâncton, crustáceos, ostras e peixes. Deste modo, com frequência os moluscos são incriminados como agentes de toxinfecções. O que torna clara a necessidade de se efetuar estudos sobre estes agentes, uma vez que no Nordeste brasileiro é elevado

o consumo de ostras cruas e outros alimentos marinhos. Dentro desta esfera, nossos estudos revelaram que peixes, mariscos e ostras do litoral pernambucano, apresentam contaminação por vibrios. Em particular, o **V. alginolyticus** e o **V. parahaemolyticus**, apresentaram índices bastante elevados, o que reafirma a ubiquidade destes microrganismo no ambiente marinho. Os resultados da tabela 1, confirmam a ampla disseminação do **V. parahaemolyticus**, tanto em moluscos como em peixes que vem a coincidir com dados apresentados por Gelli, 1975/76; Hofer & Silva, 1986; Chan, 1989; Magalhães, 1991, mas diferindo dos relatos de Leitão, 1975, que detectou uma baixa incidência de **V. parahaemolyticus** em sardinhas no litoral do estado de São Paulo. Espécies como o **V. fluvialis**, **V. vulnificus**, **V. furnissii** e **V. cincinnatiensis** revelaram uma discreta casuística no isolamento de modo similar as descrições de West, 1982; Venkateswaran, 1989; Chan, 1989. Com relação ao **V. vulnificus** nossos dados diferem de Rodrigues & Hofer, 1986; considerando sua ausência em amostragem procedente da baía de Sepetiba - RJ. Curiosamente, os mesmos autores, nos dados publicados em 1992, assinalaram agora a ocorrência de **V. vulnificus** nesta região. Isto demonstra a dinâmica dessa população microbiana, embora autóctone do ambiente, por vezes não permite o seu reconhecimento. Outras espécies descritas como eventuais patógenos humanos provenientes do ambiente marinho não foram identificadas neste estudo, à semelhança daquilo que ocorreu com a pesquisa de Morris, 1982. É importante assinalar que na presente investigação não foram incluídos os achados sobre **V. cholerae**, tendo em vista que isto faz parte de outra linha de pesquisa. Quanto a análise das concentrações de NaCl utilizadas no

enriquecimento, o uso em paralelo de APA pH 8.5 contendo 1 e 4%, não elevou, o isolamento do **V. parahaemolyticus** em peixes, o mesmo não ocorreu com o **V. alginolyticus** em ostras, que apresentou índice de isolamento maior. No cômputo geral, analisando os resultados da tabela 3, admite-se a utilização rotineira da concentração de 1% de NaCl para o enriquecimento de vibrios halofílicos a partir de alimentos marinhos. Outrossim, destaca-se a notável carência de investigações realizadas neste campo, principalmente envolvendo muitas espécies de **Vibrio**.

Quanto a avaliação das temperaturas, 37° e 42° C, concomitantemente, não houve diferença significativa para nenhuma das espécies de vibrios isoladas, ressaltando, também, que tais aspectos não estão na literatura, excetuando-se as observações do FDA-USA em relação ao **Vibrio cholerae** O₁. (Elliot, 1991).

A distribuição das espécies foi sazonal, com elevação da incidência no período de janeiro a junho de 93, havendo um decréscimo a partir de julho até setembro do mesmo ano, talvez justificado pela ocorrência de chuvas e conseqüente diminuição da salinidade das águas marinhas. (Figura 1). Vale ressaltar que 1993 foi um ano de seca na região Nordeste, inclusive modificando o período de chuvas.

O perfil bioquímico das espécies de **Vibrio** isoladas, independente da procedência, mostrou uniformidade de comportamento frente aos testes bioquímicos utilizados com algumas variações. (Tabela 6). Todas as amostras de **V. parahaemolyticus**, foram Kanagawa negativas como era esperado em cepas isoladas do ambiente marinho. Tais observações são concordantes com dados obtidos por Gelli, 1975/76; Leitão, 1976; Hofer & Silva, 1984; Chan, 1986. Por outro lado, salienta-se

que o meio seletivo-indicador agar TCBS, empregado no isolamento, foi plenamente satisfatório para todas as espécies identificadas.

6. CONCLUSÕES

1. Espécies halofílicas do gênero **Vibrio**, estão amplamente distribuídas na biocenose do litoral pernambucano, favorecendo a sua veiculação para o homem e, por conseguinte, deve ser considerado como um problema de saúde pública.

2. Dos 139 espécimens analisados, foram isoladas 629 culturas, das quais 451 (71,7%), caracterizadas em espécies de **Vibrio** potencialmente patogênicas para o homem.
3. Os fatores abióticos representados pela salinidade, pH e temperatura da água favorecem esta disseminação de espécies de **Vibrio** no litoral.
4. Pela constância dos fatores supra mencionados, discreta foi a influência da sazonalidade sobre os víbrios.
5. O perfil bioquímico das espécies de **Vibrio** potencialmente patogênicos, praticamente foi uniforme qualquer que tenha sido a origem.
6. Água peptonada alcalina, contendo 1 e 4% de NaCl, concomitantemente, elevou o isolamento de **V. alginolyticus** em ostras.
7. O índice de isolamento de víbrios é o mesmo, utilizando-se as temperaturas de 37° e 42° C, no processo de enriquecimento.
8. O **V. alginolyticus** e o **V. parahaemolyticus**, foram as espécies mais incidentes nas fontes analisadas e que são utilizados como alimento para o homem.
9. Todas as amostras de **V. parahaemolyticus** isoladas foram negativas para o teste de Kanagawa.
10. O meio de agar TCBS mostrou-se satisfatório no isolamento de **Vibrio**.
11. A pesquisa de víbrios halofílicos potencialmente patogênicos para a espécie humana deve ser incluída na rotina laboratorial de análise dos alimentos de origem marinha.

SUMMARY

In the period from October 1992 to September 1993 samples of oysters, shellfish, fish, water and Moore's swab originating from three different places on the coast of the State of Pernambuco.

Out of 629 strains of halophilic vibrios isolated 451 (71,8%) were characterized as species of potentially pathogenic vibrios harmful to man, distributed as follows: **V. alginolyticus**, 220 (48,7%); **V. parahaemolyticus**, 204 (45,2%); **V. fluvialis**, 15 (3,3%); **V. vulnificus** 10 (2,2%), **V. furnissii**, 1 (0,2%) e **V. cincinnatiensis**, 1 (0,2%).

In the process of enrichment was used alkaline peptone water at concentrations of 1% and 4% of NaCl and incubated at temperatures of 37° and 42°. The concentration of 1% of NaCl showed greater efficiency in isolating most of the identified species. The difference of temperature did not have any influence on the results. All the samples that were analyzed showed positivity for every species of vibrio. Abiotic factors such as salinity, pH and water temperature favor its dissemination on the Northeast coast of Pernambuco State.

Halophilic vibrios are widely distributed in the biocenosis of the coast of the State of Pernambuco, promoting its transmission to man, therefore becoming a problem of Public Health demanding that its research be introduced in the laboratorial routine.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMITAGE, P. SCHUBERT, R.H.W. & BERRY, G. Statical Methods in Medical Research. 2. ed. Black Well Cientific Publications. 1987. p. 559.
- BAUMANN, P., CHUBERT, R.H.W. Schubert. Family II **Vibrionaceae**. In: Krieg, N. R., Holt, J.G., eds. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1. Baltimore: The Williams CO., 1984: 516-550.
- COLWELL, R. R.. Vibrios in the environment. New York. John Wiley & Sons, 1 - 12, 1984.
- CHUANG, YC. et al., **Vibrio vulnificus** Infection in Taiwan: Report 28 Cases and Review of Clinical Manifestations and Treatment. Clin. Infect. Dis., **15**: 271 - 6, 1992.
- CHAN, KY., Woo, M. L., LAM, L. Y. & FRENCH, G. L **Vibrio parahaemolyticus** and other halophilic vibrios associates with seafood in Hong Kong. J. Appl. Bacteriol., **66**: 57 - 64, 1989.
- De PAOLA, A. **Vibrio cholerae** in marine foods and environmental waters: A Literature Review. J. Food. Sci., **46**, 1981.
- ELLIOT, E. L.; KAYSNER, C. A. & TAMPLIN, M. L. **V. cholerae**, **V. parahaemolyticus**, **V. vulnificus** and other **Vibrio** spp. Chapter 9. 30 p. In: Document F.D.A. 8/30/91, U.S.A., 1991.
- EIROA, M. N. V. Investigação de surtos de toxinfecções bacterianas causadas por alimentos processados. Colet. ITAL, Campinas, **19**: 101-112, 1989.
- EMERY, K.O.. & STEVENSON, R.E. Estuaries and Lagoons in Hedypeth, I. W. Ed. Treat. Marine Ecology and Paleoecology N. Y. Geo. Soc. Mem. **67**: 673 - 693, 1957.
- FARMER, J. J, III, HICKMAN - BRENNER, F. W. & KELLY, M. T. **Vibrio**, p. 282 - 391. In: Lennette, E. H., Balows, A., Hausler, W. J., & Shadomy, H. J. (ed), Manual of Clinical Microbiology, 4th ed. American society for Washington, D.C., 1985.
- FEACHEM, R. G. et al. Sanitation and Disease: Health Aspects of Excreta and Wastewater Management. USA: Wiley, 1983. 501 p.
- FERNANDES, L. M. B. Biologia e Cultivo da Ostra do Nordeste Brasileiro. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco. Dep. de Pesca, 1981, 70 p.
- FISHBEIN, M and WENTZ, B. **Vibrio parahaemolyticus** methodology for isolation from seafoods and epidemic specimens. J. Milk Food Technol., **36**: 118 - 123, 1973.
- GELLI, D. S., TACHIBANA, T., & SILVA, T. M. P. Ocorrência de **Vibrio parahaemolyticus** em Ostras e outros produtos marinhos no litoral de São

- Paulo, Brasil. Revisão e considerações sobre o risco potencial para a saúde pública. Rev. Inst. Adolfo Lutz 35/36: 9 - 16, 1975/76.
- GELLI, D. S., TACHIBANA, T., & SAKUMA, H. Ocorrência de ***Vibrio parahaemolyticus***, ***Escherichia coli*** e de bactérias mesófilas em ostras. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 39: 61 - 66, 1979.
- HOFER, E. Métodos de isolamentos e identificação de ***Vibrio cholerae***. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 22 p., 1974.
- HOFER, E. Primeiro isolamento e identificação de ***Vibrio parahaemolyticus*** no Brasil de infecção gastrointestinal humana. Rev. Microbiol., São Paulo, 14: 174 - 175, 1983.
- HOFER, E. & SILVA, C. H. D. An evaluation of the efficiency of the enrichment media in the isolation process for ***Vibrio parahaemolyticus***. Zbl. Bakt. Hyg. A 256: 456 - 465, 1984.
- HOFER, E. & SILVA, C. H. D. Caracterização sorológica de amostras de ***Vibrio parahaemolyticus*** isolados de peixes capturados no litoral brasileiro. Rev. Microbiol., São Paulo, 17: 327 - 331, 1986.
- HOFER, E. ***Vibrio cholerae*** não O₁ associado à infecção entérica humana no estado da Bahia, Brasil. Rev. Microbiol., São Paulo, 18: 1 - 4, 1987.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. Vol. 1, 3 ed. São Paulo, 1985. 533 p.
- JANDA, J.M., POWER, R.C., Bryant.R.G. & ABBOTT,S.L. Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant ***Vibrio* spp.** Clin. Microbiol. Review, 1: 245 - 267. 1988.
- KELLY, M. T., HICKMAN - BRENNER, F. W. and FARMER III, J. J. ***Vibrio***, p. 384-395. In: Balows, A., Hausler, W. J., Herrmann, K. L., Isenberg, H. D. and Shadomy, H. J. (ed), Manual of Clinical Microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1991.
- LEITÃO, M. F. F., ARIMA, H. K., KAI, M. ***Vibrio parahemolyticus*** no ambiente marinho: incidência em peixes, moluscos e crustáceos. Colet. ITAL . 7 :181 - 190, 1976.
- MaC FADIN, J. F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2 ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1980.
- MAGALHÃES, V. ***Vibrio parahemolyticus***, causa insuspeita de gastroenterite do adulto, no Recife. Tese de Mestrado. Recife, 1990.
- MAGALHÃES, V., ANDRADE LIMA, R.; MAGALHÃES, E.; MAGALHÃES, M. Gastroenterite humana associada ao ***Vibrio fluvialis*** no Recife. Arg. Gastroenterol., São Paulo, 27: 141 - 143, 1990.

- MAGALHÃES, M.; MAGALHÃES, V.; ANTAS, M.G. ;TATENO, S. Caracterização bacteriológica e sorológica de linhagens de **Vibrio parahaemolyticus** isolado de humanos e de ostras no Recife, Brasil. Rev. Microbiol., São Paulo, 22: 83 - 88, 1991.
- MAGALHÃES, M.; MAGALHÃES, V.; ANTAS, M.G. ;TATENO, S. **Vibrio cholerae** non - O₁ isolated from sporadic cases of diarrhea in Recife, Brasil. Rev. Microbiol., São Paulo, 23(1): 1- 4. 1992.
- MAGALHÃES, V.; MAGALHÃES, M.; LIMA, R.A.; TATENO, S. & MAGALHÃES, E. Víbrios não coléricos na rotina enterobacteriológica. Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo, 34: 131 - 135, 1992.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sec. Nacional de Vigilância Sanitária. Comissão Nacional de controle da Cólera. Cólera. 3 ed. Brasília. 1991. 50 p.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Sec. de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: Métodos Microbiológicos. Brasília. 1981. 82 p.
- MORRIS, J. G. & BLAKE, R. E. **Cholera** and other vibrioses in the United States. New England J. Med., 312: 343 - 350. 1985.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Riscos de transmissão de cólera por alimentos. Washington, D.C. 1991.
- PACE, J., WU, C. Y., CHAI, T. Bacterial flora in pasteurized oysters after refrigerated storage. J. Food Sci., 53, 1988.
- PESSÔA, G. V. A., SILVA, E. A. M. Meios de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para identificação presuntiva de enterobactérias. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 32: 97 - 100. 1972.
- RODRIGUES, S. A. Zoologia. Vol. 3, São Paulo: Cutrix. 1975. 382 p.
- RODRIGUES, D. P.; RIBEIRO & HOFER, E. **Vibrio** species from the water - oyster ecosystem of Sepetiba Bay in Rio de Janeiro State, Brasil. Rev. Microbiol. São Paulo, 17: 322 - 338, 1986.
- RODRIGUES, D. P., RIBEIRO, R. V. & HOFER, E. Analysis of some virulence factors of **Vibrio vulnificus** isolated from Rio de Janeiro, Brasil. Epidemiol. Infect., 108: 463 - 467, 1992.
- RODRIGUES, D. P.; RIBEIRO, R.V.; ALVES, R.M. & HOFER, E. Evaluation of virulence factors in environmental isolates of **Vibrio** species. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 88: 589 - 592, 1993.
- SPELLMAN, J. R.; LEVY, C.S.; CURTIN, J.A. & ORMES, C. **Vibrio fluvialis** and gastroenteritis. Annals of Internal Medicine, 105: 294 - 295, 1986.

- TISON, D. L. & KELLY, M. T. Virulence of **Vibrio vulnificus** strains from marine environment. Appl. Environ. Microbiol., 51: 1004 - 1006, 1986.
- TAMPLIN, M. L. and FISHER, W. Occurrence and characteristics of agglutination of **Vibrio cholerae** by serum from the Eastern oyster, **Crassostrea virginica**. Appl. Environ. Microbiol., p. 2882 - 2887, 1989.
- WEST, P. A. The human pathogenic **Vibrio**. A public health update with environmental perspectives. Epidemiol. Infect., 103: 1 - 34, 1989.
- WONG, H. C., TING, S. H. and SHIEH, W. R. Incidence of toxigenic vibrios in foods available in Taiwan. J. Appl. Bacteriol., 73: 197 - 202, 1992.
- VENKATESWARAN, K. et. al. Characterization of toxigenic vibrios isolated from the fresh water environment of Hiroshima, Japan. Appl. Environ. Microbiol., 55: 2613 - 2618, 1989.
- ZEBRAL, A. A. Isolamento e caracterização de **Vibrio** lactose - positivo, de mexilhões da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro. Rev. Microbiol. São Paulo, 16: 46 - 48, 1985.