

GLAVUR ROGERIO MATTÉ

ISOLAMENTO DE VIBRIOS POTENCIALMENTE PATOGÊNICOS EM MOLUSCOS BIVALVES



Tese apresentada ao Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de "Doutor em Saúde Pública".

Orientadora: Prof. Dr. Maria Therezinha Martins

**São Paulo
1993**

À

Profa Dra MARIA THEREZINHA MARTINS

*pela maneira segura, objetiva e crítica
que nos orientou na elaboração deste trabalho*

Aos meus pais,

ATTILIO e NILA (+),

razão pela qual cheguei até aqui

À

Leninha e Elisa

razão da minha vida

AGRADECIMENTOS

Desejamos externar nossa gratidão a todos os que colaboraram possibilitando a realização deste trabalho:

- À FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA, pelo apoio prestado;

- À Dra. PETRA S. SANCHEZ, da Gerência de Análises Microbiológicas da CETESB e MARIA INÊS ZANOLI SATO, NANCY DE CASTRO STOPPE, PAULO FERNANDO RODRIGUES, do Setor de Microbiologia, pela colaboração na execução da parte técnica;

- À MARIA HELENA MATTÉ, pela colaboração na execução da parte técnica e tratamento estatístico dos dados;

- À COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB) por haverem permitido a utilização de alguns dos resultados de análises aqui citados;

- Ao INSTITUTO DE PESCA, pela coleta e fornecimento de mariscos;

- Ao Prof. JOSÉ PIANTINO FERREIRA, da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, pela orientação na execução da técnica de alça ligada em coelhos;

- À FAPESP e CNPQ, pelo apoio financeiro à pesquisa ora apresentada;

- Às BIBLIOTECÁRIAS da FSP pela colaboração na realização do levantamento e revisão bibliográfica.

Í N D I C E

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. ANÁLISE DA LITERATURA.....	5
2.1. <i>Vibrio cholerae</i> O:1.....	5
2.1.1. Características gerais.....	5
2.1.2. Aspectos ecológicos e epidemiológicos.....	6
2.2. <i>Vibrio cholerae</i> não O:1.....	9
2.2.1. Características gerais.....	9
2.2.2. Aspectos ecológicos e epidemiológicos.....	12
2.2.3. Infecções extraintestinais.....	14
2.2.4. Casos e surtos de gastroenterite.....	14
2.2.5. Aspectos relacionados à patogenicidade.....	17
2.3. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	26
2.3.1. Características gerais.....	26
2.3.2. Aspectos ecológicos e epidemiológicos.....	27
2.3.3. Aspectos relacionados à patogenicidade.....	30
2.4. <i>Vibrio mimicus</i>	32
2.4.1. Características gerais.....	32

2.4.2. Aspectos ecológicos e epidemiológicos.....	33
2.4.3. Aspectos relacionados à patogenicidade.....	34
2.5. <i>Vibrio fluvialis</i>	36
2.5.1. Características gerais.....	36
2.5.2. Aspectos ecológicos e epidemiológicos.....	37
2.5.3. Aspectos relacionados à patogenicidade.....	38
2.6. <i>Vibrio furnissii</i>	39
2.7. <i>Vibrio vulnificus</i>	40
2.7.1. Características gerais.....	40
2.7.2. Aspectos ecológicos e epidemiológicos.....	45
2.7.3. Características culturais.....	47
2.7.4. Aspectos relacionados à patogenicidade.....	48
2.8. <i>Vibrio alginolyticus</i>	50
2.8.1. Características gerais.....	50
2.8.2. Aspectos ecológicos e epidemiológicos.....	51
2.9. <i>Vibrio hollisae</i>	52
2.9.1. Características gerais.....	52
2.9.2. Aspectos relacionados à patogenicidade.....	54

2.10. <i>Vibrio damsela</i>	55
2.11. <i>Vibrio metschnikovii</i>	56
2.12. <i>Vibrio cincinnatiensis</i>	57
3. MATERIAL E MÉTODOS	58
3.1. Colheita e processamento das amostras.....	58
3.1.1. Colheita das amostras.....	58
3.1.2. Preparo das amostras.....	61
3.2. Isolamento e identificação.....	62
3.3. Pesquisa de fatores de virulência em modelo animal.....	67
3.3.1. Preparo do extrato.....	67
3.3.2. Teste de Dean.....	68
3.3.3. Teste de alça ligada em intestino de coelho....	68
3.3.4. Teste de virulência em camundongos jovens.....	70
3.4. Teste de Kanagawa.....	70
3.5. Análise estatística.....	70
4. RESULTADOS	71
4.1. Pesquisa de vibrios em ostras comercializadas....	71

4.2. Pesquisa de vibrios em mexilhões coletados no litoral de Ubatuba (SP).....	80
4.3. Ensaio de virulência em modelo animal.....	106
4.4. Teste de Kanagawa.....	107
5. DISCUSSÃO.....	111
5.1. Incidência de vibrios potencialmente patogênicos nas amostras analisadas.....	111
5.2. Aspectos específicos observados com relação às diferentes espécies de <i>Vibrio</i>	112
5.2.1. <i>Vibrio cholerae</i> O:1.....	112
5.2.2. <i>Vibrio cholerae</i> não O:1.....	114
5.2.3. <i>V. mimicus</i>	118
5.2.4. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	118
5.2.5. <i>Vibrio fluvialis</i>	121
5.2.6. <i>Vibrio alginolyticus</i>	122
5.2.7. <i>Vibrio hollisae</i>	125
5.2.8. <i>Vibrio metschnikovii</i>	125
5.3. Aspectos relativos à dificuldade de isolamento de algumas espécies de vibrios potencialmente patogênicos...	126

5.4. Aspectos relativos à virulência.....	127
5.4.1. <i>V. cholerae</i> não O:1.....	127
5.4.2. <i>V. mimicus</i>	129
5.4.3. <i>V. parahaemolyticus</i>	130
5.4.4. <i>V. fluvialis</i>	131
5.5. Relação entre parâmetros ambientais e presença de vibrios isolados.....	132
5.5.1. Temperatura.....	132
5.5.2. Salinidade.....	133
5.5.3. Colimetria.....	134
5.6. Desempenho dos meios de enriquecimento empregados	134
5.7. Aspectos relativos à legislação.....	136
5.8. Aspectos de importância em saúde pública.....	139
6. CONCLUSÕES.....	143
7. RECOMENDAÇÕES.....	145
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	148
RESUMO.....	189
ABSTRACT.....	191

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Vibrio* pertence a família *Vibrionaceae*, a qual inclui também os gêneros *Aeromonas*, *Plesiomonas* e *Photobacterium*. Segundo o "BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY" (1984), a família *Vibrionaceae* é composta por bacilos Gram negativos, retos ou curvos, móveis por meio de flagelo polar. Sob certas condições de cultivo (ex. meio sólido) flagelos adicionais podem ser produzidos, cujo comprimento difere do flagelo polar e o número pode variar de poucos a mais que 100 flagelos/célula. Os vibrios não formam esporos ou microcistos. São quimiorganotróficos e possuem metabolismo oxidativo e fermentativo. A maioria produz oxidase. A maior parte das espécies requer de 2-3% de cloreto de sódio mar para crescimento ótimo. São principalmente habitantes do ambiente aquático, sendo encontrados em água do mar ou água doce e em associação com animais aquáticos. Várias espécies são patogênicas para o homem, peixes, enguias, rãs, bem como outros vertebrados e invertebrados. Todas as espécies do gênero *Vibrio* crescem a 20°C e, muitos, a 30°C.

Membros do gênero *Vibrio* estão distribuídos em muitos ambientes naturais aquáticos, freqüentemente formando o maior componente das populações microbianas associadas com reciclagem de compostos orgânicos tais como quitina (BAUMANN & SCHUBERT, 1984).

A família *Vibrionaceae* distingue-se de *Pseudomonadaceae* por utilizar fermentativamente a glicose, e de *Enterobacteriaceae* por produzir citocromo oxidase (TISON & KELLY, 1984). No gênero *Vibrio* além do agente causador da cólera, o *Vibrio cholerae* sorogrupo O:1, estão incluídos outros agentes que já foram relacionados com infecções em humanos. Entre eles encontram-se *V. cholerae* sorogrupo não O:1, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, *V. hollisae*, *V. furnissii*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. metshnikovii* e *V. cincinnatiensis* (BLAKE e col, 1980; WEST, 1989).

Nos últimos 30 anos uma série de estudos epidemiológicos e ecológicos tem demonstrado que muitas espécies do gênero *Vibrio*, isoladas do ambiente, são agentes etiológicos de doenças que incluem desde gastroenterites autolimitadas até septicemia letal em pacientes debilitados (MORRIS JR. & BLACK, 1985; WEST, 1989).

Os vibrios são habitantes naturais do ambiente aquático (autóctones), principalmente o marinho, e se transmitem, predominantemente, através da ingestão de pescado crú ou mal cozido ou pelo contato com o ambiente aquático. Os moluscos bivalves, particularmente as ostras que são habitualmente ingeridas cruas, desempenham importante papel na transmissão desses agentes pelo fato de serem concentradores biológicos (BLAKE e col., 1980; MORRIS JR. & BLACK, 1985; WEST, 1989).

Considerando-se a necessidade de se conhecer melhor, em nosso meio, a distribuição dos vibrios, principalmente em alimentos que tenham um maior potencial para transmissão desses agentes, realizou-se o presente estudo com os seguintes objetivos:

- Pesquisar a distribuição de vibrios potencialmente patogênicos, principalmente os causadores de gastroenterites, em amostras de ostras (*Crassostrea gigas*) comercializadas na cidade de São Paulo e em alguns pontos do litoral do Estado de São Paulo.

- Pesquisar a ocorrência de vibrios potencialmente patogênicos, principalmente os causadores de gastroenterites, em amostras de mariscos (*Perna perna*) colhidas no litoral de Ubatuba - SP.

- Verificar através dos testes de Dean (STa) e de alça ligada de intestino de coelho (LT), possíveis fatores de virulência por cepas de vibrios potencialmente patogênicas isoladas de moluscos bivalves, e também teste de Kanagawa para as cepas de *V. parahaemolyticus* e de letalidade para *V. vulnificus*.

- Discutir os aspectos ambientais e sanitários relativos a frequência destes patógenos, bem como os padrões sanitários vigentes.

2. ANÁLISE DA LITERATURA

2.1. *Vibrio cholerae* O:1

2.1.1. Características gerais

Esta bactéria é a responsável pela cólera. Os casos típicos são caracterizados por diarreia intensa com perda de grandes quantidades de fezes líquidas semelhantes à "água de arroz". A sintomatologia da cólera apresenta um amplo espectro, e casos assintomáticos são frequentes. *V. cholerae* produz vários fatores de virulência, principalmente toxinas. A mais importante é a toxina colérica (CT), entretanto uma segunda enterotoxina, diferente da CT, já foi demonstrada (WEST, 1989).

Entre as doenças causadas por espécies de *Vibrio*, a cólera é a que mais tem canalizado a atenção das autoridades de Saúde Pública. A ocorrência de cólera na América do Sul em 1991, após praticamente um século de ausência, iniciando-se com um surto explosivo no Peru (MORBIDITY MORTALITY WEEKLY REPORT, CDC, 1991), torna-se um fato extremamente preocupante, pois atinge um grupo de países com estrutura epidemiológica favorável à disseminação da doença, devido às precárias condições de saneamento básico.

Um dos aspectos que tem atraído a atenção de pesquisadores (BRAYTON e col., 1987; LOWRY e col., 1989) é a sobrevivência do *V. cholerae* O:1, durante a forma endêmica da doença, ou mesmo nos períodos interepidêmicos, em que a presença de portadores crônicos ou assintomáticos, nem sempre justifica sua viabilidade por períodos mais prolongados.

2.1.2. Aspectos ecológicos e epidemiológicos

Alguns estudos, realizados em microcosmos, tem revelado fatores que exercem efeito protetor sobre a sobrevivência de *V. cholerae* O:1 no ambiente aquático. Foi observado que quitina exerce efeito protetor sobre *V. cholerae* O:1 em baixas temperaturas (AMAKO e col., 1987).

A interação de *V. cholerae* O:1 com outros organismos, tais como cianobactérias (*Anabena variabilis*)(ISLAM e col., 1990), e amebas (*Acanthamoeba polyphaga* e *Naegleria gruberi*)(THOM e col., 1992), ou mesmo a capacidade de aderir a diversas espécies de fitoplâncton e zooplâncton(TAMPLIN e col., 1990) também parece favorecer a sobrevivência da bactéria.

A utilização de *E. coli* como indicador da presença de *V. cholerae* O:1 tem sido desaconselhada (HOOD & NESS,

1982; PÉREZ-ROSAS & HAZEN, 1988 e 1989) pois sua sobrevivência, nestes estudos, foi inferior à do patógeno.

A ausência de correlação entre *V. cholerae* 0:1 e *E. coli* no ambiente aquático (HOOD & NESS, 1982; PERÉS-ROSAS & HAZEN, 1988 e 1989), sua capacidade de aderir a diversas espécies de fitoplâncton e zooplâncton (TAMPLIN e col., 1990), e a ocorrência de células viáveis mas não cultiváveis (XU e col., 1982 e 1984), evidenciam que *V. cholerae* 0:1 é uma bactéria autóctone em ambientes aquáticos.

LOWRY e col. (1989), na Louisiana, EUA, relataram que *V. cholerae* 0:1 toxigênico tem persistido ao longo da Costa do Golfo, por pelo menos 13 anos, podendo potencialmente contaminar caranguejos, camarões e ostras.

COLWELL (1986), observou que a ocorrência de águas estagnadas ou com fluxo lento, situadas em planícies que são freqüentemente inundadas, em regiões de estuários e também com águas alcalinas são alguns dos aspectos encontrados em áreas endêmicas, que apresentam clara correlação com a manutenção da endemicidade da cólera. Citou como exemplo o maior grau de alcalinidade no solo e água na Região do Ganges, e a alcalinização de tanques de suprimento de água devido à proliferação de algas em Bangladesh.

O emprego de técnicas que demonstram a presença de células viáveis, a partir de amostras em que o *V. cholerae*

O:1 não era evidenciável pelos métodos convencionais de cultura (XU e col., 1982 e 1984; ISLAM e col., 1990; MARTINS e col., 1993), indicam que este microrganismo pode entrar em um estado de "dormência", o que provavelmente deve contribuir para sua sobrevivência, quando as condições ambientais são adversas. Entretanto, até o presente momento não existem estudos que expliquem os mecanismos pelos quais esse fenômeno ocorre.

BRAYTON e col. (1987), utilizando técnica de imunofluorescência com anticorpo monoclonal, demonstraram que *V. cholerae* O:1 persiste em ambiente aquático de áreas endêmicas entre períodos epidêmicos.

O impacto desses estudos sobre a ecologia de *V. cholerae* O:1 e sobre a epidemiologia da cólera, está gradualmente emergindo (WEST, 1989).

2.2. *Vibrio cholerae* não-O1

2.2.1. Características gerais

V. cholerae não O:1, nos últimos anos, vem sendo associado a um número crescente de casos esporádicos (MCEWAN & LEONG, 1980) e surtos de gastroenterite (McINTYRE & FEELEY, 1965; McINTYRE e col., 1965; DAKIN e col., 1974; WILSON e col., 1981; HADDOCK & NOCON, 1985; ECHEVERRIA e col., 1985; FINCH e col., 1987), além de um certo número de infecções extraintestinais (Tabela 1).

Até recentemente, as amostras do sorogrupo não O:1 não eram classificadas em espécies de *V. cholerae*, mas eram referidas como vibrios não aglutináveis (NAGs) ou vibrios não cólera. Atualmente elas são classificadas como *V. cholerae* não O:1. O procedimento laboratorial para *V.*

cholerae O:1 também se aplica ao sorogrupo não O:1. A diferença essencial é que amostras de *V. cholerae* não O:1 não aglutinam com o soro anti-*V. cholerae* O:1 (BLAKE e col., 1980).

V. cholerae não O:1 revela-se com um maior espectro de manifestações clínicas (Tabela 1) que o *V. cholerae* O:1 pois tem sido isolado com maior frequência de sangue, ouvido, pele, trato respiratório e urina (GOEI & KARTHIGASU, 1978; GUARD e col., 1980; DePAOLA, 1981; THIBAUT e col., 1986).

Em um estudo retrospectivo, realizado nos Estados Unidos, de casos de infecção devidos a *V. cholerae* não O:1, os sintomas associados com gastroenterite foram diarreia (100% dos casos), dores abdominais (93%), febre (71%), náusea e vômitos (21%), sendo que sangue nas fezes esteve presente em mais de 25% dos pacientes (MORRIS JR & BLACK, 1985). A diarreia causada por esse vibrio pode variar de branda até, em alguns casos, semelhante a da cólera (McINTIRE e col. 1965; BLAKE e col., 1980).

TABELA 1. Relação de casos de infecção extraintestinal ocasionados por *Vibrio cholerae* não O:1.

ANO	AUTOR	LOCAL	CASO	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	IDADE anos	SEXO	FATORES PREDISPOANTES	DESFECHO
1978	GOEI & KARTHIGASU	Austrália		Septicemia	37	M	Cirrose alcoólica	nc
1980	GUARD e col.	Austrália		Septicemia	64	F	Doença hepática	Morte
1985	MORGAN e col.	Texas		Septicemia, Meningite	6 sem	M	Gestação e parto difíceis	Recuperação
1986	MANNION & MELLOR	Brighton		Bacteremia	74	F	nc	Recuperação
1986	THIBAUT e col.	Belgica	1	Otite	20	F	Otite anterior	Recuperação
			2	Otite	15	M	Transplante de tímpano	Recuperação
1986	WINSTROM	Suécia		Bacteremia	61	M	Colecistite	Recuperação
1989	PITRAK & GINDORF	Chicago		Celulite, Bacteremia	34	F	Hepatite B, Uso de drogas	Recuperação
1989	MOINARD e col.	Nantes		Septicemia	43	F	Cirrose alcoólica	Morte
1989	MULDER e col.	Colorado		Infecção de pele	63	M	Trombose venosa	Recuperação
1989	BURNS e col.	Ottawa		Septicemia	58	M	Diabetes mellitus	Morte
1989	DUMLER e col.	Maryland		Cistite	21	F	nc	Recuperação
1989	DHAR e col.	Kuwait	1	Bacteremia	50	F	Úlcera duodenal, Diabete	Morte
			2	Bacteremia	31	M	Cirrose	nc
1991	JESUDASON e col.	Índia	1	Septicemia	nc	nc	Doença hepática	nc
			2	Septicemia	nc	nc	Doença hepática	nc
			3	Septicemia	nc	nc	Doença hepática	nc

nc - Não consta

2.2.2. Aspectos ecológicos e epidemiológicos

V. cholerae não O:1 está amplamente distribuído no ambiente aquático, sendo isolado da água, alimentos marinhos e sedimentos de diversos estuários (TISON e col., 1986; KAYSNER e col., 1987a).

Vários estudos indicam que *V. cholerae* não O:1 pode ocorrer naturalmente em águas de estuários e sua presença não tem sido associada a esgotos domésticos (BLAKE e col., 1980; TISON e col., 1986; MARTINS, 1988).

KHAN e col. (1984) em Bangladesh, encontraram *V. cholerae* não O:1 em 1216 (30,3%) de 4.016 amostras de águas superficiais pesquisadas, e não observaram correlação sazonal acentuada.

TISON e col. (1986) no Oregon, EUA, estudando amostras de água, sedimento e moluscos em 3 estuários, isolaram *V. cholerae* não O:1 de água e sedimento, mas não de moluscos bivalves. As águas de onde foram isolados esses microrganismos apresentavam temperaturas variando de 11 a 19°C e salinidades de 2,3 a 26‰. Observaram que estas bactérias estavam distribuídas em uma grande área geográfica

e ocorriam de forma autóctone nas comunidades microbianas desses estuários.

RHODES e col. (1986) estudando *V. cholerae* não O:1 em rios do Colorado, EUA, durante o verão, isolaram o microrganismo em 21 (88%) de 24 pontos de amostragem. Os isolamentos foram obtidos de águas com salinidade variando entre 2,3 a 16,9 mmol de Na⁺ por litro. Foram identificadas 16 sorovariedades de *V. cholerae* não O:1.

KAYSNER e col. (1987a) pesquisando *V. cholerae* em amostras de água, sedimento e moluscos bivalves da Califórnia, Oregon e Washington, EUA, durante o verão de 1984, encontraram *V. cholerae* não O:1 em 23 dos 24 estuários analisados, e em 44,6% de 529 amostras examinadas.

VENKATESWARAN e col. (1989a) estudaram a ecologia de *V. cholerae* não O:1 e o papel do zooplâncton na sua distribuição sazonal. As amostras estudadas eram procedentes de 5 pontos, sendo 2 de água doce (rios) e 3 de água de mar da região costeira de Fukuyama, Japão. Obtiveram isolamento deste microrganismo em ambientes com uma grande variação de salinidade (0,4 a 32,5‰). Verificaram que a temperatura foi o fator mais importante na sua distribuição. *V. cholerae* não O:1 não foi detectado nos meses de inverno, quando a temperatura da água caiu abaixo de 11°C, no ambiente marinho e abaixo de 7°C, em água doce.

No Brasil, ZEBRAL (1987) examinado uma amostra de esgoto, colhida no centro da cidade de Niterói, RJ, obteve 7 cepas de *V. cholerae* não O:1.

2.2.3. Infecções extraintestinais

Analisando os casos de infecções extraintestinais, devidos a *V. cholerae* não O:1, relacionados na Tabela 1, observa-se que aqueles mais graves, com presença de bacteremia ou septicemia, foram associados à existência prévia de alterações hepáticas devidas ao consumo de álcool ou hepatite, seguidos de outros fatores, tais como, diabetes, trauma, úlcera duodenal, colecistite ou consumo de drogas. Os casos de otite foram relacionados com exposição ao ambiente aquático ou história de intervenção cirúrgica anterior. Um caso de infecção de pele foi associado a trombose venosa. Verifica-se que os casos letais foram associados principalmente a doença hepática. A idade variou de 6 meses a 74 anos, não parecendo ser o principal fator predisponente. A via provável de transmissão nesses casos foi principalmente o contato recente com o ambiente aquático e ingestão de pescado.

2.2.4. Casos e surtos de gastroenterite

Diversos casos de gastroenterite devidos a *V. cholerae* não O:1 tem sido relatados (DeGEROME & SMITH, 1974;

NACESCU e col., 1974; McEWAN & LEONG, 1980; WILSON e col., 1981; KAY e col., 1984; HADDOCK & NOCON, 1985), sendo em sua maioria, associados principalmente a ingestão de ostras cruas e secundariamente a outros alimentos marinhos mal cozidos.

McINTYRE e col. (1965), estudando casos de diarréia em hospitais do Paquistão, relataram o isolamento de *V. cholerae* não O:1 de 19 pacientes. Os organismos foram isolados em abundância dos casos de diarréia, e nenhum outro organismo patogênico foi observado.

ZAFARI e col. (1973), no Irã, examinaram 21.970 amostras de fezes de peregrinos Iranianos que foram para Arábia Saudita. Observaram 160 amostras que continham *V. cholerae* não O:1, sendo que destas, 96 eram provenientes de indivíduos com diarréia moderada a severa e 64 sem nenhum sintoma aparente. Entre os 96 indivíduos nos quais *V. cholerae* não O:1 era o agente causal de diarréia, 32 apresentavam fezes aquosas similares às da cólera e 64, somente diarréia moderada.

DAKIN e col. (1974) relataram a ocorrência de um surto de gastroenterite aguda devido a *V. cholerae* não O:1 envolvendo 64 passageiros de um vôo internacional, no qual ovos mexidos e aspargos foram os alimentos envolvidos na transmissão. Este surto demonstrou a facilidade de

multiplicação desses microrganismos em alimentos e também o risco de contaminação cruzada em cozinhas industriais.

KAY e col. (1984), em Lima, Peru, relataram um surto devido a *V. cholerae* não O:1, sendo o microrganismo isolado de 5 pessoas.

PIERGENTILI e col. (1984), na Itália, relataram um surto de gastroenterite devida a *V. cholerae* não O:1 que acometeu 22 clientes de um restaurante em Veneza. O estudo epidemiológico revelou forte associação com o consumo de ostras cruas.

MOYENUDDIN e col. (1987) estudando a causa de doenças diarréicas em crianças, em Bangladesh, encontraram *V. cholerae* não O:1 em 8,7% dos casos e em nenhum dos controles. Observaram que sua ocorrência esteve entre os 4 agentes mais prevalentes de diarréia.

FINCH e col. (1987) relataram um surto de gastroenterite associado a *V. cholerae* não O:1 ocorrido em Cancun, México, envolvendo 134 pessoas. *V. cholerae* não O:1 foi isolado em 16% dos pacientes com diarréia, 92% de 63 amostras de esgoto, 86% de 14 amostras de água de abastecimento e em 21% de 24 amostras de alimentos marinhos analisados. O estudo de caso-controle revelou maior

associação dos casos com o consumo de alimentos a base de água (gelatina, leite em pó) e alimentos marinhos.

CASALINO e col. (1988), na Somália, pesquisando a causa de doenças diarréicas em crianças atendidas em hospital, durante um período de 2 anos, encontraram *V. cholerae* não O:1 em 6% dos casos de diarréia.

JESUDASON e col. (1991), na Índia, relataram a ocorrência endêmica de *V. cholerae* não O:1, no período pesquisado de 1977 a 1987.

No Brasil, HOFER (1987), relatou um surto, ocorrido em 1974, na localidade de Teixeira de Freitas, Bahia, em que *V. cholerae* não O:1 foi isolado de 6 pacientes com diarréia.

MAGALHÃES e col. (1992), no Recife, isolaram *V. cholerae* não O:1 em 4 (0,7%) entre 572 crianças com diarréia, com menos de 2 anos de idade, e de um paciente com 54 anos, que desenvolveu diarréia 24 horas após ter consumido peixe frito.

2.2.5. Aspectos relacionados à patogenicidade

Esses vibrios apresentam uma variedade de fatores de virulência maior que *V. cholerae* O:1. Estas bactérias podem

elaborar uma série de toxinas extracelulares biologicamente ativas incluindo a CT e outras enterotoxinas, citolisinas e hemolisinas (SPIRA & FEDORKA-CRAY, 1983; DATTA-ROY e col., 1986). Encontra-se um padrão heterogêneo de mecanismos de virulência, semelhante ao apresentado por *E. coli* patogênica (MORRIS JR, 1990).

Uma pequena proporção de sorovariedades de *V. cholerae* não O:1 possui os genes que codificam a toxina CT e são responsáveis por diarreia típica de cólera (FRANCA e col., 1980).

Algumas amostras também apresentam uma hemolisina relacionada à hemolisina termo-estável direta de *V. parahaemolyticus* (YOH e col., 1986a). A produção de uma toxina similar a toxina de Shiga (Verotoxina) produzida por *Shigella dysenteriae*, foi verificada para algumas cepas de *V. cholerae* não-O1, o que poderia explicar os casos de diarreia com sangue (WEST, 1989).

GUPTA e col. (1956) foram os que primeiro demonstraram a enterotoxigenicidade de *V. cholerae* não O:1, a partir de amostras isoladas de pacientes, que causavam acúmulo de fluido em alça ligada de coelho adulto.

McINTYRE e col. (1965), observaram que pequeno número de *V. cholerae* não O:1 (300 a 480 UFC) foi capaz de produzir diarreia em coelhos jovens, em 3 amostras testadas.

OHASHI e col. (1972), estudaram a produção de enterotoxina por *V. cholerae* não O:1 isolados de 41 casos de diarreia ocorridos na Índia, Filipinas e Sudão. Verificaram a presença de fator de permeabilidade vascular em 8(19,5%) amostras, resposta hemorrágica em teste de pele em cobaia em 9 (21,9%), e ambos os fatores em 5 (12,2%). Realizaram teste de alça ligada em coelho com uma das amostras, obtendo resultado positivo, porém com menor acúmulo de fluido quando comparado ao *V. cholerae* O:1 (569B).

KAROLCEK e col. (1974), investigaram as propriedades tóxicas de 23 filtrados de cultura de *V. cholerae* não O:1 isolados de fezes de pessoas com diarreia e de ambiente. Verificaram que 1/3 das amostras de pacientes e 1/5 das amostras ambientais tiveram efeito letal para camundongos brancos. Observaram sobre a mucosa da parede intestinal dos animais mortos um acentuado efeito hemorrágico. Os animais que sobreviveram à infecção apresentavam sintomas patológicos, e também, um efeito necrótico semelhante aos que não sobreviveram.

SINGH & SANYAL (1978), pesquisaram a enterotoxigenidade de 75 amostras de *V. cholerae* não O:1,

provenientes de diversas fontes, sendo 28 de humanos sadios, 36 de animais domésticos (vaca, búfalo, cabra e galinha) e 11 de água e esgoto. Verificaram que 21 (75%) das amostras de humanos sadios, 16 (45%) de animais domésticos, e 7 (64%) de água e esgoto apresentaram teste de alça ligada positivos, com culturas vivas. As amostras que deram reação negativa tornaram-se positivas após uma ou 2 passagens em alça ligada e causaram acúmulo de fluido comparável ao produzido por *V. cholerae* 569B.

YAMAMOTO e col. (1984). purificaram e caracterizaram parcialmente uma hemolisina de *V. cholerae* não O:1 que era imunologicamente relacionada à hemolisina de *V. cholerae* O:1 El Tor. Observaram que a hemolisina, na forma purificada, causou aumento da permeabilidade vascular em pele de coelho, morte rápida em camundongos por injeção intravenosa e lisou eritrócitos de vários animais.

HONDA e col. (1985) verificaram que 55% das amostras de *V. cholerae* não O:1 por eles estudadas, produziam uma enterotoxina similar mas não idêntica à ST de *E. coli* (NAG-ST). Constataram também que 10% das amostras produziam uma hemolisina imunologicamente relacionada à toxina termoestável direta de *V. parahaemolyticus*(Vp-TDH).

MCCARDEL & MADDEN (1985) isolaram e caracterizaram uma citolisina produzida por *V. cholerae* não O:1.

Verificaram que esta toxina era termolábil, apresentava citotoxicidade para células Y-1 de adrenal de camundongo e células de ovário de hamster chinês (CHO), lisava eritrócitos de coelho e produzia uma zona hemorrágica em pele de coelho. Foi rapidamente letal quando injetada intravenosamente em camundongos adultos, e causou acúmulo de fluido em alça ligada de coelho tanto em 5 como 18 horas.

HONDA e col. (1986) isolaram 2 amostras de *V. cholerae* não O:1 que produziam uma hemolisina muito semelhante a Vp-TDH de *V. parahaemolyticus*, a qual foi denominada NAG-r-TDH.

DATTA-ROY e col. (1986) estudaram comparativamente a expressão de hemaglutininas, hemolisinas e enterotoxinas entre amostras clínicas e ambientais de *V. cholerae* não O:1, e sua relação com enteropatogenicidade. Não detectaram diferença significativa em relação à atividade de hemaglutinação entre as amostras clínicas e ambientais. Entretanto, os sobrenadantes de cultura de 61,5% dos isolados clínicos mostraram atividade hemolítica, contra somente 33,3% dos ambientais. Detectaram acúmulo de fluido em alça ligada de coelho em 45,8% dos isolados clínicos e em 20% dos ambientais. Verificaram que a maioria das reações de amostras clínicas foram mediadas por toxinas semelhantes à toxina da cólera, enquanto as amostras ambientais, apresentavam enterotoxinas diferentes da toxina da cólera.

SHEHABI e col. (1986), estudaram o mecanismo de virulência de 21 amostras de *V. cholerae* não O:1 isoladas de pacientes com diarreia. Noventa por cento das amostras apresentaram hemaglutinação na presença de eritrócitos humanos (grupo O), de galinha, carneiro e coelho. Setenta e seis por cento das amostras apresentaram aderência às células intestinais. A presença de plasmídeos não foi correlacionada com a presença de hemolisina, hemaglutinina, adesão ou resistência a antibióticos.

YAMAMOTO e col. (1986), compararam a hemolisina produzida por *V. cholerae* não O:1 e *V. cholerae* O:1 biotipo El Tor. Concluíram que a hemolisina de *V. cholerae* não O:1 é idêntica do ponto de vista biológico, físico químico e imunológico à hemolisina de *V. cholerae* O:1 El Tor.

YOH e col. (1986a), purificaram e caracterizaram uma hemolisina a partir de *V. cholerae* não O:1 que apresentava reação cruzada com a Vp-TDH de *V. parahaemolyticus*. Concluíram que a hemolisina era similar porém não idêntica a Vp-TDH.

ARITA e col. (1986) purificaram e caracterizaram uma enterotoxina termoestável de *V. cholerae* não O:1. Constataram que a mesma causava acúmulo de fluido em alça ligada de coelho e em camundongos lactentes e que se tratava de uma nova enterotoxina termoestável.

ICHINOSE e col. (1987) investigaram a enterotoxigenicidade de uma hemolisina produzida por *V. cholerae* não O:1 que era semelhante a de *V. cholerae* O:1 El Tor. Verificaram que a hemolisina purificada induzia acúmulo de fluido quando injetada em alça ligada de coelho, quando administrada por via intrainestinal em coelhos jovens, e inoculada por via oral em camundongos lactentes. Observaram também que o fluido acumulado era mucoso e sanguinolento e que os animais apresentavam alterações histológicas na mucosa intestinal. Sugeriram que a hemolisina era um fator enterotóxico que poderia ser responsável por gastroenterite.

GYOBU e col. (1988), purificaram parcialmente de *V. cholerae* não O:1, um fator que causava acúmulo de fluido em alça ligada de coelho. Obtiveram uma preparação que apresentava atividade colagenolítica, citolítica, necrótica e hemorrágica, induzia a descamação de células epiteliais, formação de edema inflamatório e hemorragia em intestino de coelho, mas não era letal para camundongos.

HONDA e col. (1988), observaram a presença de fimbrias em 3 amostras de *V. cholerae* não O:1. Sugeriram, em analogia a *E. coli*, que fimbria de *V. cholerae* não O:1 pode desempenhar um papel importante na sua colonização.

NAIR e col. (1988), estudaram a produção de toxinas em cepas ambientais de *V. cholerae* não O:1. Encontraram 2

(0,5%) cepas positivas para CT entre 371 isoladas, nenhuma produtora de toxina semelhante à de Shiga em 364 pesquisadas, nenhuma produtora de enterotoxina termoestável em 194 pesquisadas, e nenhuma positiva para Vp-TDH em 360 pesquisadas. Verificaram também que 174 (89,7%) cepas entre 194 pesquisadas, eram produtoras de hemolisina e que 70(36,1%) entre as produtoras de hemolisina, causaram acúmulo de fluido em alça ligada de coelho.

YAMAMOTO & YOKOTA (1988), estudaram a produção de hemaglutininas e a aderência ao epitélio intestinal de humanos e coelhos, por cepas de *V. cholerae* não O:1. Observaram que esse microrganismo aderiu melhor à camada mucosa do que à superfície epitelial, e também que aderiu à superfície das vilosidades do jejuno de coelho da mesma forma que à superfície das vilosidades do íleo ou jejuno humanos. Concluíram que esta hemaglutinina devia desempenhar um papel, pelo menos parcial na aderência, e que a camada mucosa era o sítio primário de aderência em infecções humanas.

OGG e col. (1989), estudando diversas sorovariedades de *V. cholerae* não O:1, isoladas de pássaros aquáticos, observaram que todas as amostras eram citotóxicas para células Y1.

BARJA e col. (1990), estudaram plasmídeos e fatores associados à virulência em 51 cepas ambientais de *V. cholerae* não O:1 isoladas em Bangladesh. Verificaram que em 11 (21,5%) cepas havia pelo menos um plasmídeo de 1.7-115 megadaltons. Observaram, entre 13 amostras testadas, que 6 (46,1%) apresentavam resposta enterotóxica e citotóxica, e 2 (15,4%) apenas enterotóxica, e também que 3 (50%) das 6 cepas que eram citotóxicas e enterotóxicas, aglutinavam eritrócitos humanos, indicando que a produção de toxina não estava relacionada à atividade hemaglutinante. Constataram também que não havia associação entre a presença de plasmídeos e atividade citotóxica, enterotóxica ou hemaglutinante.

IWANAGA & ICHINOSE (1991) purificaram e caracterizaram uma hemolisina atípica produzida por uma cepa de *V. cholerae* não O:1 (NO37-hly).

OO e col. (1991), em Yagon, Mynmar, Bangladesh, estudando a presença de patógenos entéricos em água e alimentos utilizados para alimentar crianças, encontraram 9 (27,3%) amostras de *V. cholerae* não O:1 produtoras de toxina semelhante a toxina da cólera.

JESUDASON e col. (1991), na Índia, estudando amostras de *V. cholerae* não O:1, encontraram entre 8

amostras examinadas, 5 positivas para o teste de alça ligada em coelhos.

2.3. *Vibrio parahaemolyticus*

2.3.1. Características gerais

V. parahaemolyticus é conhecido como causa de gastroenterite desde 1950. Clinicamente a doença se manifesta com náuseas, vômitos, dor abdominal, febre baixa e calafrios. A diarréia é geralmente aquosa, mas algumas vezes apresenta-se sanguinolenta. A doença é geralmente branda e autolimitada, mas pode ser fatal em uma pequena porcentagem dos casos (BLAKE e col., 1980; MORRIS Jr & BLACK, 1985) .

Gastroenterite devido a *V. parahaemolyticus* é quase que exclusivamente associada ao consumo de alimentos de origem marinha crus ou mal cozidos (WEST, 1989).

Existe uma pronunciada incidência sazonal de gastroenterite, com surtos ocorrendo principalmente nos meses quentes, quando *V. parahaemolyticus* é mais prevalente no ambiente aquático do qual alimentos marinhos são capturados (KELLY & STROH, 1988)

Infecções extraintestinais devidas a *V. parahaemolyticus* são pouco frequentes, e sempre que ocorrem estão associadas à exposição ao ambiente natural aquático salino ou manipulação de alimentos marinhos contaminados. Entre essas infecções, as mais frequentes são infecções de pele (BLAKE e col., 1980; SAUTTER e col., 1988; AHSAN e col., 1988).

2.3.2. Aspectos ecológicos e epidemiológicos

V. parahaemolyticus é ubiqüitário em peixes e moluscos bivalves capturados em estuários e águas costeiras (CHAN e col., 1989)

KANEKO & COLWELL (1973) estudaram a ecologia de *V. parahaemolyticus* na baía de Chesapeake, observando as interações ecológicas ocorridas entre o sedimento, coluna d'água e plâncton. Não detectaram esse microrganismo na coluna d'água, nos meses de inverno, embora estivesse presente no sedimento. Constataram que esses organismos eram liberados na coluna d'água durante o processo de morte e mineralização do plâncton. Verificaram que 10°C é uma temperatura mínima para crescimento de *V. parahaemolyticus* no ambiente natural, entretanto seu crescimento é visivelmente reduzido em temperaturas iguais ou inferiores a 15°C. Constataram também sua capacidade de digerir quitina e sua relação com a dinâmica da população de zooplâncton.

KARUNASAGAR e col. (1986) estudando o papel da quitina, em experimentos de laboratório, verificaram que a adição da mesma a salina tamponada favorecia a sobrevivência e multiplicação de *V. parahaemolyticus*, particularmente a 10°C.

KELLY & STROH (1988) no Canadá, estudaram a relação temporal entre *V. parahaemolyticus* em pacientes e em ambiente do noroeste do Pacífico. Isolaram este microrganismo em 11 a 33% das amostras ambientais. Os isolamentos do ambiente ocorreram durante os meses de verão, quando a temperatura da água era superior a 17°C e a salinidade igual ou menor que 13‰. Detectaram infecções localmente adquiridas somente quando o organismo estava presente em grandes números no ambiente.

Estudos realizados no Canadá (KELLY & STROH, 1989), EUA e México (ABBOTT e col., 1989) sugerem a existência de um novo biotipo (Urease positiva e Kanagawa negativo) como associado a patogenia de *V. parahaemolyticus*.

CHAN e col. (1989) estudaram a prevalência de *V. parahaemolyticus* e outros vibrios halofílicos em 295 amostras de alimentos marinhos coletados em mercados de Hong Kong, China. Verificaram que *V. alginolyticus* foi a espécie mais freqüentemente isolada, seguido por *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus*,

V. pelagius, *V. campbellii*, *V. splendidus* e *V. marinus*. Alertaram para o fato de que a ubiqüidade e as concentrações relativamente altas de *V. parahaemolyticus* constituem-se em um fator de risco para saúde pública.

MONSREAL & ABUXAPQUI (1989), estudaram a prevalência de *V. parahaemolyticus* em alimentos marinhos (crustáceos, moluscos e peixes) coletados em restaurantes da cidade de Mérida, Yucatan, México. Encontraram uma positividade de 11,5% em alimentos marinhos crus, ausente nos insuficientemente cozidos e de 4,5% nos parcialmente cozidos. Concluíram que o cozimento parcial, como era usualmente realizado nos restaurantes locais (5 minutos de submersão em água recém fervida, porém com o fogo apagado), não era suficiente para eliminar *V. parahaemolyticus* desses alimentos, nem para reduzir de forma significativa seu número em relação aos alimentos crus.

No Brasil, FRANCA e col. (1980) estudando mariscos e peixes obtidos em peixarias de Salvador-BA, encontraram *V. parahaemolyticus* em 5% das amostras de peixes e em 19% das amostras de mariscos.

BARROS & VIANNI (1980) estudando amostras de águas de diversos pontos da Baía de Guanabara-RJ, encontraram *V. parahaemolyticus* em 61,6% das amostras pesquisadas.

HOFER & SILVA (1986), estudando 82 cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas de peixes colhidos na faixa de litoral entre Bahia e Rio Grande do Sul, identificaram 13 sorotipos em 33,7% das amostras, e em 66,1% só foi tipável o antígeno O.

2.3.3. Aspectos relacionados à patogenicidade

A virulência de *V. parahaemolyticus* vem sendo relacionada principalmente à produção de uma hemolisina termoestável direta (Vp-TDH) que está associada ao fenômeno de Kanagawa, ou seja à habilidade de produzir Beta-hemólise em meio de ágar Wagatsuma (NISHIBUCHI & KAPER, 1985; TODA e col., 1991; HONDA e col., 1989). Entretanto, duas novas hemolisinas relacionadas à Vp-TDH foram isoladas e caracterizadas a partir de amostras de *V. parahaemolyticus* Kanagawa negativas (SARKAR e col., 1987a; SARKAR e col., 1987b; HONDA e col., 1989a; HONDA e col., 1991).

Das amostras ambientais observa-se que 1% ou menos, apresentam o fenômeno de Kanagawa (BLAKE e col., 1980; MORRIS Jr & BLACK, 1985).

Também foram observados a participação de fimbrias na colonização de intestino de coelho (NAKASONE & IWANAGA,

1992) e sítios de aderência em mucosa de intestino humano fixado com formalina (YAMAMOTO & YOKOTA, 1989).

SARKAR e col. (1987a) isolaram uma proteína de 65 kilodáltons (kda) de 3 amostras de *V. parahaemolyticus* Kanagawa positivo, que diferiu da Vp-TDH que tem PM de 21 kda. Verificaram que estas amostras apresentavam elevado grau de virulência, levando à morte 100% dos camundongos dentro de 2 a 6 horas. Sugeriram que esta proteína deva desempenhar um papel na patogênese da doença causada por este microrganismo.

SARKAR e col. (1987b) induziram a produção de uma hemolisina diferente da Vp-TDH, através de repetidos subcultivos de amostras Kanagawa negativas sobre ágar Wagatsuma. Observaram que a hemolisina bruta, injetada por via intraperitoneal, apresentava toxicidade letal para 30 a 40% dos camundongos.

HONDA e col. (1989a), purificaram uma hemolisina produzida por uma amostra clínica de *V. parahaemolyticus*(HN33) O6:K46, com fenômeno de Kanagawa negativo, a qual era relacionada à Vp-TDH (Vp-TRH). Observaram que a hemolisina purificada era idêntica a Vp-TDH nos aspectos físico-químicos e imunológicos. Verificaram que além dessa amostra, outras 3 (O4:K11, O6:K18 e O3:K6), também isoladas na Estação de Quarentena do Aeroporto

Internacional de Osaka, Japão, produziam esta hemolisina. Concluíram que a amostra produzia um novo tipo de hemolisina, a qual era imunologicamente relacionada, mas não idêntica a Vp-TDH.

HONDA e col. (1991), caracterizaram um terceiro tipo de hemolisina (Vp-TDH/I) produzida por uma amostra clínica (TH012) de *V. parahaemolyticus* Kanagawa negativo, que era diferente da Vp-TRH. Verificaram através de análises físico química, biológica e imunológica, que esta hemolisina era similar, mas não idêntica a Vp-TDH e Vp-TRH. Confirmaram que a seqüência de aminoácidos era diferente das outras duas toxinas previamente identificadas. Observaram que tanto a toxina purificada, como as células vivas produtoras de Vp-TDH/I, induziam acúmulo de fluido em alça ligada de coelho.

2.4. *Vibrio mimicus*

2.4.1. Características gerais

V. mimicus foi considerado uma nova espécie em 1981, por DAVIS e col.(1981), quando estudavam amostras atípicas de *V. cholerae* sacarose negativas.

Este vibrio foi isolado de casos clínicos, a maioria deles gastroenterite, atribuídos ao consumo de ostras cruas, e tem sido isolado em muitos países (Canadá, México,

Filipinas, Bangladesh). O isolamento de *V. mimicus* de água, ostras e camarões, e sua distribuição mundial em áreas costeiras indica que sua ecologia pode ser similar a de *V. cholerae* não O:1 (MORRIS Jr & BLACK, 1985).

V. mimicus foi inicialmente relatado como *V. cholerae* com reações bioquímicas atípicas. Estudos posteriores por hibridização do ADN revelaram que o grupo de amostras sacarose-negativa apresentava baixa relação com *V. cholerae*. Baseado nesta baixa relação e em diferenças fenotípicas, foi proposta a criação de uma nova espécie, *V. mimicus*. O nome da espécie "*mimicus*" refere-se ao fato desta espécie mimetizar *V. cholerae* (MORRIS Jr & BLACK, 1985).

SHANDERA e col. (1983), revisando as características clínicas e epidemiológicas de infecções associadas a *V. mimicus*, observaram que a maioria dos isolamentos foram de amostras de fezes, e associadas com gastroenterite após o consumo de ostras cruas, e algumas poucas infecções de ouvido, ocorridas após exposição à água do mar.

2.4.2. Aspectos ecológicos e epidemiológicos

KAYSNER e col. (1987a), pesquisando a ocorrência de *V. cholerae* em amostras de água, sedimento e moluscos bivalves em estuários na Califórnia, Oregon e Washington,

durante o verão de 1984, encontraram *V. mimicus* em 2,3% de 529 amostras analisadas.

CHOWDHURY e col. (1989) pesquisaram a incidência de *V. mimicus* em amostras de água e plâncton de Dhaka, Bangladesh, e de Okayama, Japão. Isolaram o organismo da coluna d'água ao longo do ano em Bangladesh, sem clara relação sazonal, entretanto não isolaram em Okayama quando a temperatura da água era inferior a 10°C. Observaram que não havia relação sazonal do microrganismo com as amostras de plâncton. Verificaram que este microrganismo não era encontrado em nenhum ambiente com salinidade igual ou superior a 10‰. Observaram também, que ambiente salobro, com salinidade média de 4‰, era o que apresentava melhores condições para o patógeno. Obtiveram, em Bangladesh, nas águas do rio Buriganga, contagens que variaram de 10 a $9,0 \times 10^2$ UFC (Unidades Formadoras de Colônia)/100 ml, e no lago Dhanmondi, contagens que variaram de 0 a 125 UFC/100 ml. Isolaram este microrganismo, em Okayama, em 4 dos 5 pontos amostrados, com contagens relativamente maiores nas amostras de rio. As maiores contagens foram de $6,0 \times 10^4$ UFC/100 g de plâncton e $1,5 \times 10^4$ /100 ml de água.

2.4.3. Aspectos relacionados à patogenicidade

Foram demonstrados em *V. mimicus* diversos fatores que podem estar relacionados à patogenicidade, tais como,

atividade semelhante à da enterotoxina termoestável (STa) em camundongos lactentes (CHOWDHURY e col., 1987), algumas amostras produtoras de uma enterotoxina semelhante à toxina da cólera (SPIRA & FEDORKA-CRAY, 1983; CHOWDHURY e col., 1987), uma enterotoxina idêntica à ST de *V. cholerae* não O:1, além de proteases (CHOWDHURY e col., 1990 e 1991; ARITA e col., 1991a).

CHOWDHURY e col. (1987), em Bangladesh, pesquisaram a enteropatogenicidade de *V. mimicus* em 125 amostras isoladas do ambiente, 19 de humanos e 8 de lagostim. Observaram que 31 (24,8%) dos isolados ambientais, 14 (73,7%) dos isolados clínicos e 6 (75%) dos isolados de lagostim produziam acúmulo de fluido em alça ligada de coelho, inoculado com cultura de células totais. Observaram que todas as amostras clínicas e 77,4% das ambientais mostraram atividade no teste de permeabilidade em pele de cobaio, sendo que destas, 50% das amostras ambientais e 31,6% das isoladas de humanos apresentaram lesões hemorrágicas no animal em teste. Detectaram em uma amostra ambiental, uma enterotoxina semelhante à ST pelo teste em camundongos lactentes. Observaram também uma toxina semelhante à toxina da cólera em 1(0,8%) de 125 amostras ambientais, e 2 (10,5%) de 19 amostras clínicas, pesquisadas pela técnica de ELISA.

CHOWDHURY e col. (1990 e 1991) purificaram uma protease de *V. mimicus* que apresentava estreita correlação com a de *V. cholerae*. Sugeriram que sua participação na enterotoxigenicidade poderia ocorrer de forma semelhante ao que acontece com a protease daquele microrganismo, que atua favorecendo a colonização na parede intestinal, devido à erosão provocada na camada mucosa.

ARITA e col. (1991b) purificaram uma enterotoxina termo-estável (ST) a partir do sobrenadante de cultura de *V. mimicus* AQ-0915, isolado de um caso clínico de diarreia. Observaram que a atividade da toxina era neutralizada por soro anti-ST de *V. hollisae*, e que a composição de aminoácidos da toxina purificada apresentava seqüência idêntica a de ST de *V. cholerae* não O:1.

2.5. *Vibrio fluvialis*

2.5.1. Características gerais

Este vibrio foi relatado como patógeno potencial em 1977. *V. fluvialis* era anteriormente conhecido como "vibrio do grupo F" e como "grupo EF6". Foram inicialmente definidos dois biogrupos, *V. fluvialis* biogrupo I, que não produzia gás durante a fermentação da glicose (anaerogênico), e *V. fluvialis* biogrupo II, que produzia gás durante a fermentação (aerogênico) (LEE e col., 1981). Mais tarde foi

demonstrado que amostras de *V. fluvialis* biogrupo II eram distantemente relacionadas a *V. fluvialis* biogrupo I e propuseram que essas amostras fossem classificadas em uma nova espécie, que foi chamada de *V. furnissii* (BLAKE e col., 1980; FARMER III e col., 1985; MORRIS Jr & BLACK, 1985).

HAISHIMA e col. (1989), verificaram que lipopolissacárides de *V. fluvialis* 181-86 Kobe possuíam um fator antigênico em comum com *V. cholerae* O:1.

2.5.2. Aspectos epidemiológicos

HUQ e col.(1980), em Bangladesh, descreveram um surto com 518 casos de diarreia, onde a maioria dos pacientes tinha menos que 10 anos de idade. Os principais sintomas foram desidratação, vômitos e alguns casos com febre e dor abdominal.

KHAN & SHAHIDULLAH (1982) em Dacca, Bangladesh, realizaram um extenso estudo epidemiológico do comportamento de diarreia causada por *V. fluvialis*. Observaram que a água foi o veículo mais associado.

YOSHII e col. (1987), relataram um caso de colangite supurativa aguda por *V. fluvialis*. O paciente era um pescador de 65 anos de idade, que tinha como hábito ingerir

peixes e moluscos bivalves crus, além de consumir bebidas alcoólicas. Isolaram também, do mesmo material, *Enterobacter aerogenes*.

THEKDI e col. (1990), na Índia, relataram a ocorrência, em 1981, de um surto de gastroenterite por *V. fluvialis*. Verificaram que entre os 34 participantes que almoçaram durante uma cerimônia religiosa, 14 adoeceram 4 a 6 horas após a refeição, com manifestações clínicas de intoxicação alimentar. Isolaram o microrganismo de 9 das 14 amostras de fezes analisadas (uma de cada paciente), sendo que nenhum outro enteropatógeno foi observado. Observaram que todas as amostras isoladas apresentavam atividade hemolítica.

MAGALHÃES e col. (1990), durante uma investigação da etiologia de diarreia infantil no Recife isolaram 5 amostras de *V. fluvialis* de fezes de crianças menores de 1 ano de idade. Em um caso, *V. fluvialis* foi o único enteropatógeno identificado, enquanto os demais pacientes apresentavam infecção mista com *Campylobacter jejuni*, *Shigella flexnerii*, *E. coli* 055:H e *E. coli* 086:H34.

2.5.3. Aspectos relacionados à patogenicidade

O mecanismo de gastroenterite devido a *V. fluvialis* não está completamente estabelecido. Toxinas que causam

acúmulo de fluido em alça ileal ligada de coelho e em camundongos lactentes foram detectadas, bem como toxinas com possível papel na patogenicidade (WEST, 1989).

LOCKWOOD e col. (1982) observaram que extratos livres de células de *V. fluvialis*, causavam alongamento em células CHO, similar ao provocado por enterotoxina de *V. cholerae* e por enterotoxina termo-lábil de *E. coli*, e também produziam citolisinas ativas contra eritrócitos de coelho, fator(s) não hemolíticos e letais contra células CHO, e protease(s) ativa contra azocaseína.

MYATT & DAVIS (1989), estudando fatores extracelulares e de parede, e atividades biológicas de *V. fluvialis* e *V. furnissii*, além de aspectos relacionados à capacidade de patogenia para o homem, verificaram que as amostras testadas sintetizavam hemolisinas, proteases e sideróforos, entretanto não concluíram se estes fatores estavam ou não relacionados à virulência em humanos.

2.6. *Vibrio furnissii*

V. furnissii anteriormente classificado como "*V. fluvialis* biotipo II" ou "*V. fluvialis* aerogênico", tem sido isolado esporadicamente do ambiente aquático. Sua epidemiologia ainda não foi bem definida, embora tenha sido

relacionado a gastroenterites devidas à ingestão de alimentos marinhos (FARMER III e col., 1985; MORRIS Jr & BLACK, 1985).

BASSLER e col. (1991a e 1991b) e YU e col. (1991), demonstraram a capacidade deste vibrio em utilizar quitina para sua sobrevivência, bem como contribuir na biodegradação dessa importante fonte de carbono e nitrogênio.

MAGALHÃES e col. (1990) no Recife, estudando a origem de diarréia infantil, isolaram *V. furnissii* de fezes de 3 crianças menores de 1 ano, sendo que em uma delas este vibrio era a única bactéria patogênica presente, e das outras 2 crianças foram isolados, simultaneamente, *Campylobacter jejuni* e *Shigella dysenteriae*.

2.7. *Vibrio vulnificus*

2.7.1. Características gerais

V. vulnificus foi identificado inicialmente como "vibrio halofílico marinho lactose positiva". O primeiro caso relatado ocorreu em 1970, em um indivíduo sadio, o qual adquiriu uma infecção na perna após coletar marisco na água do mar (WEST, 1989).

A 1^a edição do "MANUAL BERGEY OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY" (1984), relata que amostras selvagens de *V. vulnificus* são incapazes de utilizar lactose, mas que muitas delas adquirem rapidamente esta capacidade por mutação, devendo portanto ser tratada com considerável cuidado quando aplicada no diagnóstico desta espécie.

OLIVER e col. (1986), observaram que a produção de ácido a partir da lactose nas amostras VVL1 e C7184 de *V. vulnificus* se dava tardiamente.

KLONTZ e col. (1988) revisaram aspectos epidemiológicos e clínicos de 62 casos de infecção por *V. vulnificus* ocorridos na Flórida no período de 1981 a 1987. Observaram 3 síndromes clínicas: septicemia primária (38 pacientes), infecções de pele (17 pacientes) e doença gastrintestinal, sem septicemia ou infecção de pele (7 pacientes). Verificaram que a letalidade proporcional era maior nos pacientes com septicemia primária (55%), intermediária nas infecções de pele (24%) e ausente nos casos de gastroenterite.

WEST (1989) revisando aspectos clínicos em infecções por *V. vulnificus*, agrupou os mesmos em três síndromes: i) infecção repentina e progressiva, com poucos sintomas diarréicos, e um rápido estabelecimento (menos que 24 horas) de septicemia fulminante, seguido do aparecimento de

pequenas lesões cutâneas, apresentando letalidade de 50%, sendo associada à ingestão de bivalves crus; ii) infecções de pele em indivíduos debilitados levando a uma celulite progressiva, com edema, eritema e necrose, com possível evolução para septicemia, podendo também ser fatal dentro de 24 horas após o início dos sintomas; iii) a menos comum, é a diarreia aguda após a ingestão de ostras cruas, que é auto-limitada e não acompanhada por septicemia.

Considerando-se os relatos de casos resumidos na Tabela 2, observa-se que nos últimos 5 anos o número de casos tem aumentado. Quanto ao sexo, verifica-se maior prevalência em homens (87%) que em mulheres (13%), o que deve ocorrer, possivelmente, em função de ocupação. A letalidade foi de 40%, e o período de incubação variou de 1 a 7 dias. Os fatores predisponentes mais observados foram as disfunções hepáticas, seguido da presença isolada e/ou concomitante de diabetes, câncer de cólon, leucemia, imunodepressão e talassemia. Quanto à fonte de contaminação, constata-se que alimento marinho ingerido cru (principalmente ostras) foi o mais prevalente seguido de ferimentos com ostras, mariscos, peixes ou contato com ambiente aquático marinho. A idade pareceu ser também um fator importante, uma vez que 61% dos casos ocorreram em pessoas com 50 ou mais anos.

TABELA 2 . Relação de casos de infecção causados por *Vibrio vulnificus*.

ANO	AUTOR	LOCAL	CASO	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	FONTE PROVÁVEL DE CONTAMINAÇÃO	IDADE anos	SEXO	FATORES PREDISPOANTES	DESFECHO
1984	FONDÉ e col.	Hong Kong		Fascite necrozante	Ferimento ao abrir ostras	73	M	Diabete	Morte
1985	WONGPAITON e col.	Bangkok	1	Peritonite, septicemia	Ingestão de ostras cruas	40	M	Cirroze hepática, hipertensão portal	Morte
			2	Peritonite, septicemia	Idem	30	M	Cirrôse alcoólica, drogas	Morte
1986	JENKINS e col.	Utah		Fascite necrozante	Idem	78	M	Úlcera alcoólica	Morte
1986	JOHNSTON e col.	New Orleans	1	Gastrenterite	Idem	28	M	Antiácidos	Recuperação
			2	Gastrenterite	Idem	69	M	Câncer de colon	Recuperação
			3	Gastrenterite	Idem	53	M	Úlcera péptica	Recuperação
1986	WOO e col.	Hong Kong		Fascite necrotizante	Idem	8	M	nc	Recuperação
1987	TRUWIT e col.	Tenessii		Bacteremia	Idem	36	M	Alcoolismo	Morte
1987	CHIN e col.	Califórnia		Septicemia	Idem	45	M	Hepatite, cirrose	Morte
1988	SIMON e col.	Hong Kong		Crise hepática	Ferimento na perna	55	M	nc	Morte
1988	CHAGLA e col.	Arábia	1	Septicemia	nc	47	F	Hepatite B	Recuperação
			2	Septicemia	nc	30	M	Hepatite crônica	Recuperação
1988	LIMPERT & PEACOCK	Carolina do Norte		Celulite	Contato de ferimento com ambiente aquático	23	F	nc	Recuperação
1988	HOFFMAN e col.	Houston		Septicemia	Ferimento na mão	51	M	Cirroze hepática	Recuperação
1988	SABAPATHI	Baltmor		Infecção pulmonar	Imersão em água do mar	60	M	Alcoolismo	Recuperação
1988	LAM e col.	Singapura	1	Septicemia	Lesão de pele	58	M	Cirroze	Morte
			2	Septicemia	Lesão de pele	66	M	Diabetes mellitus	Morte

nc - Não consta

CONTINUA

TABELA 2. Relação de casos de infecção causada por *Vibrio vulnificus*. (continuação)

ANO	AUTOR	LOCAL	CASO	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	FONTE PROVÁVEL DE CONTAMINAÇÃO	IDADE anos	SEXO	FATORES PREDISPOANTES	DESFECHO
1988	HUNG e col.	Hong Kong		Fascite necrozante	nc	52	M	Imunodeprimido	Recuperação, amputação
1988	KATZ	New Haven		Meningite	Ingestão de ostras cruas	11	M	Beta talassemia	Recuperação
1988	ENG e col.	New Jersey	1	Septicemia	Ingestão de ostras cruas	55	M	Cirrose alcoólica	Morte
			2	Septicemia	Ferimento com espinho de peixe	70	M	Tromboflebite	Morte
1988	MEHTAR e col.	Londres		Epiglotite	Contato com peixe de aquário	22	M	Beta talassemia	Recuperação
1988	SARASWATHI e col.	Índia		Septicemia	Contato com água do mar	6	M	Desnutrição	Recuperação
1989	CHUANG e col.	China	1	Necrose	nc	35	F	Cirrose hepática	Morte
			2	Celulite	Lesão na perna	75	M	Úlcera péptica	Recuperação
			3	Celulite	Ferimento no dedo com camarão	65	M	nc	Morte
1989	ARNOLD e col.	Hong Kong		Septicemia, Celulite	Ingestão de marisco cru	50	F	Cirrose hepática	Morte
1989	STAHR e col.	Kentucky	1	Septicemia	Ingestão de ostras cruas	63	M	Hepatite alcoólica	Recuperação
			2	Septicemia	Ingestão de ostras cruas	61	M	Doença hepática	Morte
1989	SAKAMOTO & PIEN	Hawaii		Gastrenterite, celulite	Ingestão de carangueijo cru	52	F	Hepatite, cirrose	Recuperação
1989	DIGAETANO e col.	New Orleans	1	Úlcera corneana	Ferimento com ostra no olho	21	M	Hepatite A e B	Recuperação
			2	Úlcera corneana	Ferimento com marisco no olho	31	M	nc	Recuperação
1989	JORDAN & FLYNN	Flórida		Septicemia	Contato com água do mar	63	M	Cirrose	Recuperação, amputação
1990	KAYE	Louisiana	1	Infecção de pele	Ferimento com concha	68	M	Hepatite crônica	Recuperação
			2	Infecção de pele	Lesão na mão	55	M	Diabetes mellitus	Recuperação, amputação
			3	Infecção de pele	Lesão na mão	50	M	Leucemia	Recuperação
1992	VEENSTRA e col.	Amsterdan		Septicemia	Laceração na mão	63	M	Alcoolismo	Recuperação

nc - Não consta

2.7.2. Aspectos ecológicos e epidemiológicos

KAYSNER e col. (1989) estudaram a sobrevivência de *V. vulnificus* em ostras (*Crassostrea gigas* e *Crassostrea virginica*). Verificaram que esse microrganismo, quando injetado em ostras mantidas a 4°C, sobrevivia por pelo menos 6 dias, enquanto que ostras naturalmente contaminadas mantiveram a bactéria por 14 dias a 2°C. Observaram também que a presença deste microrganismo no exsudato das ostras, demonstrou a possibilidade de contaminação de outras ostras estocadas. Concluíram que o número de *V. vulnificus* não deve aumentar em ostras mantidas a 10°C ou menos, e que o fato desses microrganismos sobreviverem mesmo sob refrigeração, indica um elevado potencial para causar doença.

OLIVER e col. (1991) estudaram em laboratório a formação de células viáveis mas não cultiváveis de *V. vulnificus* em microcosmo de água do mar artificial. Verificaram que o microcosmo mantido a 5°C teve o número desses microrganismos reduzido de 10^6 UFC/ml a menos de 10^{-1} UFC/ml em menos de 3 dias pela técnica de contagem em placa, enquanto que pelas técnicas para detecção de células viáveis (método de redução do INT (cloreto de 2-4-iodofenil,3-4-nitrofenil-5-feniltetrazolium) e método de laranja de acridina) a contagem declinou a somente 10^5 células em um período superior a 30 dias. Observaram também que as células

incubadas em baixas temperaturas exibiam mudança morfológica de bacilos para cocos.

Prosseguindo o estudo realizado por OLIVER e col. (1991), NILSSON e col. (1991), estudaram a recuperação de *V. vulnificus* a partir do estado viável porém não cultivável. O microcosmo mantido a 5°C, onde existiam células viáveis porém não cultiváveis, foi deixado à temperatura ambiente, sem adição de nutriente, o que resultou na recuperação por técnica de contagem em placas, de número equivalente de células ao demonstrado pelas técnicas para detecção de células viáveis. Sugeriram que a temperatura deva ser um fator determinante na sobrevivência ou adaptação de certas espécies em ambiente estuarino.

O'NEILL e col. (1990) estudaram a incidência de *V. vulnificus* em amostras de águas e moluscos bivalves do norte da Inglaterra. Encontraram 15(19,2%) amostras positivas em 78 analisadas (água e moluscos bivalves), e verificaram que o maior número de amostras positivas e as contagens mais elevadas ocorreram no verão, apresentando decréscimo nítido já no início do outono.

TAMPLIN & CAPERS (1992) estudaram em sistema experimental de depuração em água do mar, a persistência de *V. vulnificus* em tecidos de ostras (*Crassostrea virginica*) da Costa do Golfo. Verificaram que este sistema de

depuração, conduzido em temperaturas superiores a 23°C, causava aumento do número desse microrganismo nas ostras, especialmente na hemolinfa, músculo adutor e manto, e que aproximadamente 10^5 a 10^6 microrganismos eram liberadas de cada ostra por hora, sendo que 0,05 a 35% provinham da superfície das valvas, as quais continham mais que 10^3 organismos/cm². Em contraste, quando a depuração era mantida a 15°C, esse microrganismo não era detectado na água do mar e a multiplicação nos tecidos das ostras era inibida.

2.7.3. Características culturais

BRYANT e col. (1987) propuseram a utilização do meio ágar dodecil sulfato de sódio-polimixinaB-sacarose (SPS), como seletivo e diferencial, para isolamento e contagem direta de *V. vulnificus*, entretanto este meio não possibilitou a diferenciação desta espécie entre os demais vibrios testados.

MASSAD & OLIVER (1987) propuseram o meio de ágar celobiose-polimixinaB-colistina, como seletivo e diferencial para *V. vulnificus* e *V. cholerae*, o qual apresentou alta seletividade para estas duas espécies.

OLIVER e col. (1992) estudaram comparativamente o uso do meio de ágar celobiose-polimixinaB-colistina, meio de ágar dodecil sulfato de sódio-polimixinaB-sacarose e ágar

tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose (TCBS), para isolamento de *V. vulnificus* de amostras de moluscos bivalves. Concluíram que o meio de ágar celobiose-polimixina B-colistina apresentou maior capacidade seletiva e diferencial.

2.7.4. Aspectos relacionados à patogenicidade

Esta espécie produz várias toxinas que podem atuar como fatores de virulência. *V. vulnificus* mostra uma proporção notável de virulência em modelos animais; as amostras clínicas são letais para camundongos jovens por inoculação intragástrica e também quando injetados em camundongos adultos por via intraperitoneal ou subcutânea. Quando microrganismos vivos são inoculados em alça ileal ligada de ratos ou coelhos, a produção de bacteremia e morte poderá ocorrer. Estes microrganismos também produzem uma toxina extracelular a qual é hemolítica, letal para camundongos e tóxica para culturas celulares (BLAKE e col., 1980; MORRIS Jr & BLACK, 1985; MALATHI e col. 1989).

Diversos produtos tem sido isolados e caracterizados a partir de *V. vulnificus*. Entre esses produtos encontram-se a fosfolipase A2 e lisofosfolipase (TESTA e col., 1984), proteases (KOTHARY & KREGER, 1985b e 1987; DANIEL, 1989), citolisinas e hemolisinas (GRAY & KREGER, 1985; OKADA & col., 1987; YAMANAKA e col., 1990). Esses estudos procuram

estabelecer a relação desses produtos com a patogenicidade desse agente avaliando, por exemplo, a permeabilidade vascular, capacidade dermonecrotica e atividade sobre células.

SIMPSON e col. (1987), estudaram a correlação entre virulência e morfologia colonial em 38 isolamentos de *V. vulnificus* provenientes de amostras clínicas e ambientais. Observaram que todas as 26 amostras que apresentavam colônia opaca tinham correlação com virulência, ou seja, eram letais para camundongos adultos quando era utilizado um inóculo de 10^9 células, e também com 10^3 células quando simultaneamente injetado com 534ug de citrato férrico amoniacal. Entre as 12 amostras translúcidas, somente 2 (biotipo 2) eram virulentas.

KAYSNER e col. (1987b), estudando a virulência de *V. vulnificus*, verificaram que em quatro amostras ambientais a DL50, em camundongos tratados com ferro, variou de 7,6 a 360 unidades formadoras de colônia (UFC), enquanto que em uma amostra clínica, que causou morte em um paciente septicêmico, a DL50 era de 4,9 UFC.

BRENNT e col. (1991), testaram *V. vulnificus* (cepa MO6/0) no soro retirado de 12 pacientes alcoólicos, com afecção hepática, adicionando diversas quantidades de ferro. Sugeriram que, uma vez que este microrganismo entre na

corrente circulatória a proliferação poderá ocorrer mais rapidamente se a transferrina estiver completamente saturada com ferro.

RODRIGUES e col. (1992), no Rio de Janeiro, analisaram alguns fatores de virulência em 20 amostras ambientais de *V. vulnificus*. Todas as 20 amostras produziram DNase, quitinase, amilase, lecitinase e gelatinase, e apresentaram resultados variáveis para elastase, collagenase e condroitinase, mas não apresentaram atividade hemolítica em eritrócitos de carneiro. Os ensaios em animais mostraram que 70% das amostras eram letais para camundongos adultos, enquanto 45% causaram acúmulo de fluido em camundongos lactentes. Observaram em ágar nutriente e ágar BHI a presença tanto de colônias opacas, como mistura de colônias opacas com colônias translúcidas.

2.8. Vibrio alginolyticus

2.8.1. Características gerais

V. alginolyticus foi inicialmente reconhecido como sendo patógeno para humanos em 1973. Esta bactéria tem sido relacionada com infecções de pele, ouvido e em bacteremias em pacientes imunocomprometidos e/ou que sofreram lesões expostas. Ocorre freqüentemente em infecções bacterianas mistas, sendo em sua maioria autolimitadas, e, parece ter

predileção para hospedeiros com problemas de ouvido (MORRIS JR & BLACK e col., 1985; DALTON e col., 1986; OPAL & SAXON, 1986; PATTERSON e col., 1988; PUY e col., 1989).

As infecções são invariavelmente associadas com exposição recente ao ambiente marinho (DALTON e col., 1986; OPAL & SAXON, 1986; PATTERSON e col., 1988; PUY e col., 1989).

Verifica-se a produção de proteases e collagenases por este microrganismo, embora o papel dessas enzimas na patogênese não esteja bem definido (BLAKE e col., 1980; MORRIS Jr & BLACK, 1985).

2.8.2. Aspectos ecológicos e epidemiológicos

Isola-se freqüentemente *V. alginolyticus* em altos números do ambiente marinho e alimentos de origem marinha (MOLITORIS e col., 1985). Como a maioria das espécies de *Vibrio* patogênicos, este organismo ocorre em altos números em águas quentes (CHAN e col., 1986).

As contagens são freqüentemente relatadas como uma observação relacionada em estudos ecológicos primariamente associados a *V. parahaemolyticus* (BINTA e col., 1982; SCHANDEVYL e col., 1984; MOLITORIS e col., 1985; WILLIAMS & LA ROCK, 1985; CHAN e col., 1989)

MOLITORIS e col. (1985) estudaram a distribuição de *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus* em amostras de água de mar e alimentos marinhos, coletados na Baía de Jakarta na Indonésia. Isolaram *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus*, em aproximadamente 68% e 72% respectivamente, das amostras de alimentos marinhos analisadas.

2.9. *Vibrio hollisae*

2.9.1. Características gerais

V. hollisae é uma espécie halofílica recentemente descrita a qual está associada com diarreia. *V. hollisae* foi considerado uma nova espécie em 1982 (MORRIS Jr & BLACK, 1985; FARMER III e col., 1985).

Amostras de laboratório de *V. hollisae* não crescem em ágar TCBS (2 dias a 36°C) ou ágar MacConkey. Visto que estes dois meios são habitualmente utilizados para isolamento de espécies de *Vibrio* e da família *Enterobacteriaceae* de fezes, é possível que *V. hollisae* seja freqüentemente perdido, mesmo que seja o microrganismo predominante. *V. hollisae* cresce bem em ágar sangue de carneiro (36°C) e pode ser detectado pela oxidase (MORRIS Jr & BLACK, 1985; FARMER III, e col., 1985).

Existem poucos estudos sobre a ecologia de *V. hollisae*. NISHIBUCHI e col. (1988), isolaram *V. hollisae* de peixes sadios de áreas costeiras. Existe uma forte associação entre infecções por este vibrio e o consumo de alimentos de origem marinha crus (RANK e col., 1988; MCGIBBON, 1989).

A associação de infecção com consumo de peixe salgado ingerido cru (RANK e col., 1988) alerta para a possibilidade de um potencial de resistência à salga.

RANK e col. (1988) em Connecticut, EUA, relataram um caso de bacteremia por *V. hollisae*, em que o microrganismo foi isolado na cultura aeróbia do sangue do paciente. Observaram que a única ligação com alimento marinho, foi o consumo de peixe salgado ingerido cru. Constataram que o paciente havia tomado altas dosagens de sulfato ferroso por apresentar anemia severa, o que talvez tenha permitido o crescimento desta bactéria no sangue, de forma análoga ao que ocorre com *V. vulnificus*.

MCGIBBON (1989), relatou um caso de severa diarreia causada por *V. hollisae* em um paciente Coreano, com 26 anos de idade. Isolou o microrganismo das fezes na ausência de outros patógenos entéricos comuns. Não obteve informações sobre ingestão de pescado cru ou mal cozido, entretanto

especulou tal possibilidade, uma vez que Coreanos tem o hábito de comer, eventualmente, carne de caranguejo crua.

2.9.2. Aspectos relacionados à patogenicidade

A virulência de *V. hollisae* parece estar associada à produção de enterotoxina (KOTHARY & RICHARDSON, 1987) e hemolisina (YOH e col., 1986a, 1988 e 1989; NISHIBUCHI e col., 1988).

YOH e col. (1986b) relataram a purificação e parcial caracterização de uma hemolisina de *V. hollisae* que era relacionada à Vp-TDH (Vh-rTDH). Achado semelhante foi feito por NISHIBUCHI e col., 1988.

KOTHARY & RICHARDSON (1987) caracterizaram e purificaram parcialmente uma enterotoxina produzida por *V. hollisae*. Verificaram que a administração intragástrica de 2×10^7 UFC por camundongo induzia acúmulo de fluido em aproximadamente 6 horas.

YOH e col. (1988) compararam a Vp-TDH com as hemolisinas de *V. cholerae* não O:1 e *V. hollisae* (Vh-rTDH). Concluíram que as três hemolisinas eram imunologicamente relacionadas, porém não idênticas.

YOH e col. (1989), estudaram a homogeneidade da hemolisina Vh-rTDH produzida por sete amostras de *V. hollisae*, sendo seis de origem clínica e uma ambiental. Observaram que em todas as sete amostras a atividade hemolítica era neutralizada com antisoro anti-Vp-TDH, sugerindo que todas hemolisinas eram relacionadas a Vp-TDH, e que nenhuma outra hemolisina estava presente.

2.10. *Vibrio damsela*

Este microrganismo é uma bactéria marinha recentemente descrita, associada a infecções traumáticas de pele, adquiridas em áreas tropicais e semitropicais. A infecção acontece tipicamente quando ocorre injúria seguida de exposição ao ambiente marinho, o que se observa freqüentemente durante pesca ou natação (COFFEY e col., 1986).

Microrganismos vivos, quando injetados em camundongos podem causar morte. Não existem dados disponíveis sobre sua ecologia ou epidemiologia (WEST, 1989).

KOTHARY & KREGER (1985a), purificaram e caracterizaram uma citolisina extracelular produzida por *V.*

damself. A citolisina era ativa contra eritrócitos de quatro entre 18 espécies de animais testados, bem como contra células CHO, sendo também letal para camundongos (DL50 de aproximadamente 1 ug/kg por via intraperitoneal).

2.11. *Vibrio metschnikovii*

A primeira evidência de infecção humana atribuída a esta espécie foi relatada por JEAN-JAQUES e col.(1981) que isolaram este vibrio do sangue e vesícula biliar de uma mulher idosa.

MIYAKE e col. (1988) purificaram e caracterizaram uma citolisina produzida por *V. metschnikovii*, a partir de uma amostra de fezes de um paciente com diarreia. Não apresentou reatividade cruzada com hemolisinas de outras espécies de *Vibrio* (*V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. mimicus*, *V. cholerae* O:1 e *V. cholerae* não O:1), indicando ser uma nova citolisina. Lisou eritrócitos de várias espécies animais (vitelo, coelho, cobaio, camundongo, humano, carneiro, galinha e cavalo) e linhagens celulares (Vero e CHO), causou acúmulo de fluido em intestino de camundongos lactentes e aumentou a permeabilidade vascular em pele de coelho.

2.12. *Vibrio cincinnatiensis*

Esta espécie foi recentemente descrita por BRAYTON e col. em 1986. Um caso de septicemia e meningite em uma paciente idosa com deficiência imune foi relatado. Não existem dados sobre sua virulência e ecologia.

BODE e col. (1986) relataram um caso de septicemia e meningite em um paciente de 70 anos de idade admitido no hospital da Universidade de Cincinnati, ocasionado por uma nova espécie de *Vibrio*. O paciente não apresentava história de ingestão de alimentos marinhos ou exposição à água do mar. O vibrio isolado fermentava a glicose, sacarose e manitol mas não a lactose. Era positivo para oxidase e lisina descarboxilase, mas não produzia indol, ornitina descarboxilase e arginina dehidrolase. Análise da composição do DNA e seqüência de RNA confirmaram a identificação de uma nova espécie, que foi denominada *V. cincinnatiensis* (ATCC 35912).

O reservatório deste novo vibrio patógeno deverá emergir quando mais casos sejam relatados (WEST, 1989).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados ensaios para isolamento, identificação e verificação de possíveis fatores de virulência, em vibrios potencialmente patogênicos isolados em amostras de ostras disponíveis para comercialização e mexilhões coletados em 3 pontos do litoral de Ubatuba-SP, Brasil.

3.1. Colheita e processamento das amostras

3.1.1. Colheita das amostras

Amostras de moluscos bivalves foram obtidas da seguinte forma:

Ostras

a) Vinte e seis amostras de ostras foram procedentes de restaurantes, peixarias, bancas e feiras livres, na cidade de São Paulo e em alguns dos principais pontos consumidores do litoral do Estado de São Paulo.

No momento da colheita foi verificada a procedência das ostras, e simultaneamente observou-se as condições de armazenamento das mesmas.

As amostras eram acondicionadas em isopor com gelo e imediatamente transportadas ao laboratório para processamento.

Mexilhões

b) Foram colhidas mensalmente, por técnicos do Instituto de Pesca e durante um período de 12 meses (fevereiro/89 - janeiro/90), amostras de mexilhões (*Perna perna*) e água, em três pontos do litoral de Ubatuba-SP (Figura 1):

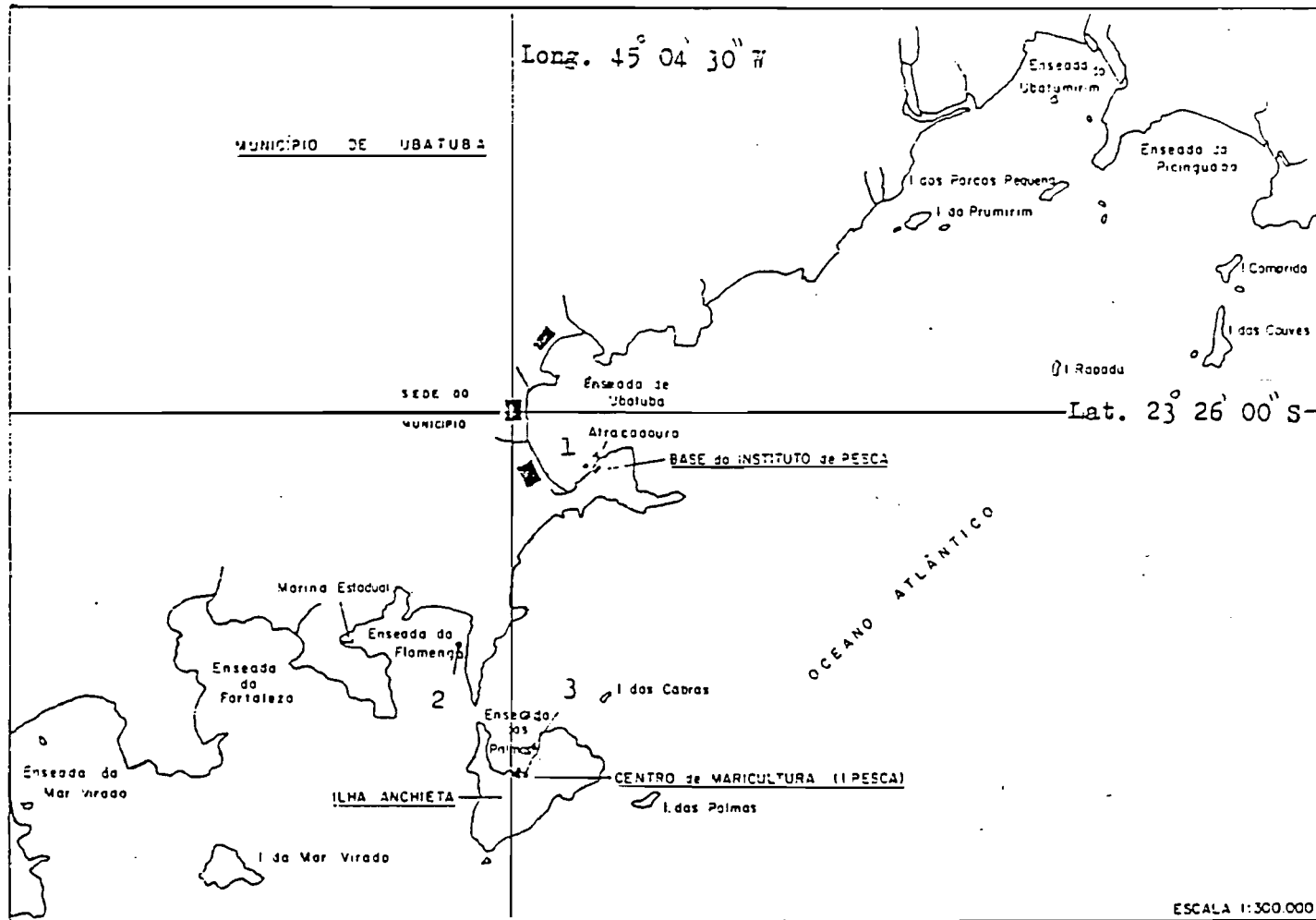
- I - Enseada de Ubatuba - Praia de Itaguá
- II - Enseada do Flamengo - Praia do Dino
- III- Enseada das Palmas - Ilha Anchieta

Esses pontos são áreas onde são desenvolvidos projetos de maricultura pelo Instituto de Pesca.

No momento da colheita das amostras foram determinadas a temperatura e salinidade da água, por técnicos do Instituto de Pesca, com o emprego de um termosalinômetro.

As amostras eram também acondicionadas em isopor com gelo e transportadas para o laboratório dentro de aproximadamente 3 horas.

FIGURA 1 - Pontos de amostragem do município de Ubatuba.



FONTE: Carta Náutica No 1613.

- 1- Enseada de Ubatuba, Itaguá.
- 2- Enseada do Flamengo, Dino.
- 3- Enseada das Palmas, Ilha Anchieta.

3.1.2. Preparo das amostras

As amostras colhidas foram submetidas, antes da inoculação em meio de enriquecimento, ao seguinte processamento:

- Seleção de um número adequado de moluscos a serem analisados visando obter uma amostra de pelo menos 100 g de carne.

- O preparo da amostra foi feito considerando-se as técnicas de assepsia e todos os instrumentos e demais materiais utilizados foram previamente esterilizados.

- Lavagem das mãos com água e sabão e desinfecção com álcool etílico a 70^oGL.

- Remoção de todo material aderido às conchas, esfregando-as com escova sob água tratada corrente, particularmente nas reentrâncias das junções. Enxague com água destilada.

- Após lavagem as conchas foram dispostas sobre uma toalha de papel de filtro estéril, dobrando-a sobre as mesmas para uma secagem rápida.

- Nova lavagem das mãos com água e sabão e desinfecção com álcool etílico a 70^oGL.

- Abertura das conchas com uma espátula previamente esterilizada, coletando-se em um béquer estéril todo conteúdo dos moluscos.

- Transferência do material para uma jarra previamente esterilizada de um homogeneizador. Homogeneização por 60 a 90 segundos.

3.2. Isolamento e identificação

Alíquotas do material homogeneizado foram distribuídas, conforme esquema constante da Fig. 2, nos seguintes meios de enriquecimento: Água Peptonada Alcalina contendo 1% de cloreto de sódio e GSTB (Caldo glicosado com sais e Teepol)(MORRIS e col., 1976), segundo a técnica dos tubos múltiplos. Um subcultivo foi realizado em Água

Peptonada Alcalina sem cloreto de sódio a partir das culturas em Água Peptonada Alcalina contendo 1% de cloreto de sódio.

Os meios de enriquecimento eram incubados por 24 horas a 35°C, com exceção da Água Peptonada Alcalina sem cloreto de sódio, que era incubada por 8 horas a 35°C.

O isolamento foi realizado em ágar TCBS (Difco) a partir de cada tubo semeado, de todos os meios de enriquecimento empregados, incubando-se por 24 horas a 35°C.

Colônias sacarose positivas (amarelas) e negativas (verdes), sugestivas de espécies de *Vibrio* foram identificadas presuntivamente em meio de ágar ferro de Kligler (Difco).

As colônias que apresentaram características presuntivas de *Vibrio* sp. no meio de ágar ferro de Kligler, foram submetidas à confirmação através de provas bioquímicas complementares, conforme descrito na **Figura 2**. (WEST & COLWELL, 1983; BAUMANN & SCHUBERT, 1984; FARMER III e col., 1985; BRAYTON e col., 1986).

Esquema detalhado do enriquecimento, isolamento e identificação, é apresentado na **Figura 2**.

As reações esperadas para as provas bioquímicas realizadas, para identificação das espécies de vibrios, estão apresentadas na Tabela 3.

As amostras de mexilhões e água dos pontos I, II e III também foram submetidas a pesquisa de coliformes totais e fecais, no laboratório de análises microbiológicas da CETESB, pela técnica dos tubos múltiplos (MORRIS e col., 1976).

O cálculo da porcentagem de isolamento das espécies de vibrios presentes foi realizado considerando-se a ocorrência de determinada espécie em pelo menos um dos três meios de enriquecimento empregados.

O cálculo das variáveis estatísticas (mediana, média, máximo, mínimo e análise de correlação) das espécies de vibrios isoladas, foi realizado considerando-se sempre a maior estimativa do NMP/100g da amostra, obtida entre os três meios de enriquecimento empregados.

TABELA 3. Reações bioquímicas esperadas para espécies de vibrios potencialmente patogênicos*.

	<i>V. cholerae</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. cincinnatiensis</i>
Bacilo gram negativo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidade	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Crescimento em ágar TCBS	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Arginina desidrolase	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-
Lisina descarboxilase	+	+	-	+	-	-	+	+	V	V	+
Ornitina descarboxilase	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
Crescimento em NaCl:											
0%	+	-	V	+	-	V	-	-	-	V	-
3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6%	V	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+
8%	-	+	V	-	-	V	-	+	-	V	-
10%	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Indol	+	+	V	+	+	V	+	+	-	V	-
Gás da glicose	-	-	-	-	-	+	-	-	V	-	-
Voges Proskauer	+	-	V	-	-	V	-	+	+	+	+
Vermelho de Metila	+	+	+	+	-	+	+	V	+	+	+
Produção de gelatinase	+	+	+	+	-	V	+	+	-	+	-
Hidrólise da Esculina	-	-	V	-	-	-	-	-	-	V	nc
Crescimento a 42oC	+	+	-	+	nc	-	+	+	nc	V	-
Acido de:											
Lactose	-	-	-	-	-	-	V	-	-	V	nc
Sacarose	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	nc
Arabinose	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	nc
Manose	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nc
Manitol	+	+	+	+	-	+	V	+	-	+	nc
Salicina	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	nc
Utilização de:											
Etanol	-	+	+	nc	nc	+	-	V	nc	-	-
Putrescina	-	+	V	nc	nc	+	-	V	nc	-	-

* WEST & COLWELL, 1983 ; BAUMANN & SCHUBERT, 1984; FARMER III e col., 1985; BRAYTON e col., 1986. / nc - não consta.

3.3. Pesquisa de fatores de virulência em modelo animal.

Foram pesquisadas através de ensaio biológico em dois modelos animais, teste de Dean (DEAN e col., 1972) e Teste de alça ligada de íleo de coelhos (DE & CHATTERJEE, 1953), 218 amostras de espécies do gênero *Vibrio*, potencialmente patogênicas, isoladas a partir de ostras e mexilhões, conforme relação a seguir:

	Ostras	Mexilhões
<i>V. parahaemolyticus</i>	16	75
<i>V. fluvialis</i>	12	67
<i>V. cholerae</i> não O:1.....	10	14
<i>V. mimicus</i>	6	5
<i>V. furnissii</i>	4	-
<i>V. vulnificus</i> (com identificação presuntiva).....	6	3
Total.....	54	164

3.3.1. Preparo do extrato

Para preparação do extrato foi utilizado o meio de CRAIG (casaminoácido, 30g; extrato de levedura, 4g; fosfato dibásico de potássio 0,5g; água destilada, 1000ml; após autoclavação eram adicionados 10ml glicose 20%). Este meio de cultura foi semeado com uma alçada obtida da cultura em meio de conservação (peptona, 10g; extrato de levedura, 5g; NaCl, 10g; ágar, 15g; água destilada 1000ml) recentemente repicado (24 hs), sendo a seguir incubado por 18 horas a 35°C, sob agitação (180 RPM).

O material assim processado era centrifugado em centrífuga refrigerada (10.000g/15 minutos), filtrado em filtro Millipore (0,45 um), e estocado em freezer -20°C até o momento do uso.

3.3.2. Teste de Dean

Para o teste foram utilizados camundongos (suiço branco) lactentes com idade variando entre 3 e 5 dias.

A inoculação foi realizada por via intragástrica, utilizando-se seringas tipo insulina (1 ml), injetando-se 0,1 ml do extrato das culturas em teste adicionado de Azul de Evans (1 gota/ml), para cada camundongo.

O número de camundongos inoculados variou de no mínimo 3 e no máximo 5 camundongos para cada teste realizado. O fator foi calculado obtendo-se a relação entre peso dos intestinos e peso das carcaças.

Foram considerados positivos os testes que apresentaram fator igual ou superior a 0,083.

3.3.3. Teste de alça ligada em intestino de coelho

Foram utilizados coelhos brancos da raça Nova Zelândia, com peso variando entre 1500 a 2000 g.

Antes do teste os coelhos foram mantidos em jejum, porém recebendo água, por 24 a 36 horas.

Para anestesia foram utilizados o INOVAL (Janssen), como pré-anestésico, por via intramuscular, na dose de 0,2 ml/kg. Após decorridos 10 minutos da aplicação do pré-anestésico foi aplicado o anestésico ZOLETIL 50 (Virbac), também por via intramuscular, na dose de 0,2 ml/kg. A dose de manutenção, quando necessária, era de 1/3 da dose inicial.

Entre cada alça era feita uma interalça para evitar-se extravasamento de líquido de uma alça para outra. Cada alça era inoculada com 1 ml do extrato de cultura.

Como controle positivo do teste foi utilizado uma cepa de *E. coli* produtora de ST e LT, fornecida pelo Instituto Adolfo Lutz (H 10.407) e, como controle negativo, o próprio meio de cultura sem inóculo.

Após a cirurgia o coelho era colocado em decúbito lateral, e sacrificado após um período de 18 horas. As alças eram então retiradas, e tinham seu volume e comprimento aferidos (ml de líquido/centímetro de alça).

3.3.4. Teste de virulência em camundongos jovens

Este teste só foi realizado nas cepas presuntivamente identificadas como *V. vulnificus*.

Camundongos adultos (5/cepa) pesando aproximadamente 20 gramas cada, foram inoculados intraperitonealmente com 0,1 ml de uma solução salina, contendo cerca de 10^8 bactérias/ml, ajustada através da escala de MacFarland. A letalidade foi observada até 18 horas após a inoculação (RODRIGUES e col., 1992).

3.4. Teste de Kanagawa

As amostras de *V. parahaemolyticus* isoladas foram submetidas ao teste de "Kanagawa" em ágar Wagatsuma contendo 5% de sangue humano, para detecção de beta-hemólise (WAGATSUMA, 1968).

3.5. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa "SPSS-PC", e foram obtidos máximo, mínimo, média e mediana de cada parâmetro e matrizes de correlação. Foram consideradas como significantes as correlações com nível de significância $p < 0,01$.

4. RESULTADOS

No total foram examinadas 26 amostras de ostras (*Crassostrea gigas*) procedentes de pontos de comercialização da cidade de São Paulo e litoral do Estado de São Paulo e 36 amostras de mexilhões (*Perna perna*) colhidos na região costeira de Ubatuba, no litoral do Estado de São Paulo. Dessas amostras foram obtidos 469 isolamentos de bactérias oxidase positivas a partir das amostras de ostras e 2.122 a partir das amostras de mexilhões, totalizando 2.591 isolamentos que foram submetidos aos testes bioquímicos.

4.1. Pesquisa de vibrios em ostras comercializadas

A relação das amostras de ostras colhidas, segundo o tipo de estabelecimento, procedência e condições de armazenamento está apresentada na **Tabela 4**.

Quanto ao local da colheita, tivemos 42% das amostras obtidas em estabelecimentos comerciais da cidade de

São Paulo(SP) e 58% em estabelecimentos do litoral do Estado de São Paulo, que atendem principalmente uma população flutuante, que afluí para esses locais com finalidade de lazer (Figura 3.1).

Segundo as informações obtidas pelas respostas dos vendedores, verificou-se que as ostras eram procedentes, em sua maioria, de Cananéia (73%), seguindo-se por Bertiooga (11%), São Vicente (8%), Peruíbe (4%) e Boracéia (4%) (Figura 3.2).

As amostras foram obtidas em restaurantes (58%), peixarias (23%) e bancas/feiras livres (19%) (Figura 4).

Quanto à forma de armazenamento, observada no momento da aquisição, verificou-se que a maioria dos estabelecimentos (65%) mantinha as ostras expostas à temperatura ambiente. Em relação aos demais estabelecimentos 12% das amostras estavam congeladas, 4% dentro da água do mar e, de 19% não foi possível obter a informação (Figura 5).

O número estimado (NMP/100g) de vibrios potencialmente patogênicos isolados das amostras de ostras está relacionado na Tabela 5, e os resultados de estatística básica (média, mediana, máximo e mínimo) estão relacionados na Tabela 6.

Os percentuais de isolamento segundo as espécies de vibrios potencialmente patogênicos, são apresentados na **Figura 6**.

As espécies que apresentaram maior frequência nas amostras analisadas foram *V. alginolyticus* (81%) e *V. parahaemolyticus* (77%), seguido do *V. cholerae* não O:1 (31%), *V. fluvialis* (27%), *V. furnissii* (19%) e em menor percentual, *V. mimicus* (12%), e *V. vulnificus* (com identificação presuntiva) (12%).

Considerando-se a incidência de espécies de vibrios potencialmente patogênicos isolados em cada amostra de ostra pesquisada, foram obtidos os percentuais que estão apresentados na **Figura 7**. Observou-se que na maioria das amostras, ocorreu positividade para 2, 3 ou 4 espécies de vibrios.

TABELA 4. Amostras de ostras (*Crassostrea gigas*) segundo o tipo de estabelecimento, procedência e condições de armazenamento.

AMOSTRA	DATA	TIPO DE ESTABELECIMENTO	CIDADE	PROCEDÊNCIA	CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO
1	26.06.89	Peixaria	São Paulo	Cananéia	Expostas *
2	26.06.89	Restaurante	São Paulo	Cananéia	Cozinha **
3	30.06.89	Peixaria	São Paulo	Cananéia	Expostas
4	30.06.89	Peixaria	São Paulo	Cananéia	Expostas
5	30.06.89	Peixaria	São Paulo	Cananéia	Expostas
6	11.07.89	Restaurante	São Paulo	Cananéia	Cozinha
7	11.07.89	Restaurante	São Paulo	Cananéia	Cozinha
8	13.08.89	Restaurante	São Paulo	Cananéia	Cozinha
9	13.08.89	Restaurante	São Paulo	Cananéia	Cozinha
10	20.08.89	Restaurante	Santos	Cananéia	Congelada
11	20.08.89	Restaurante	São Vicente	São Vicente	Expostas
12	20.08.89	Restaurante	Praia Grande	Cananéia	Expostas
13	20.08.89	Restaurante	Praia Grande	Cananéia	Expostas
14	20.08.89	Feira	São Vicente	São Vicente	Expostas
15	20.08.89	Restaurante	Santos	Peruíbe	Expostas
16	22.08.89	Restaurante	São Paulo	Cananéia	Congelada
17	22.08.89	Restaurante	São Paulo	Cananéia	Expostas
18	03.09.89	Peixaria	Santos	Cananéia	Expostas
19	03.09.89	Peixaria	Santos	Cananéia	Congelada
20	03.09.89	Banca	Santos	Bertioga	Exposta
21	03.09.89	Restaurante	Santos	Bertioga	Exposta
22	03.09.89	Restaurante	Santos	Bertioga	Exposta
23	03.09.89	Restaurante	Santos	Boracéia	Exposta
24	11.09.89	Banca	Cananéia	Cananéia	Exposta
25	11.09.89	Banca	Cananéia	Cananéia	Submersa
26	11.09.89	Banca	Cananéia	Cananéia	Exposta

* Expostas à temperatura ambiente.

** Sem informação sobre as condições de armazenamento

TABELA 5. Vibrios potencialmente patogênicos isolados de amostras de ostras (*Crassostrea gigas*), em NMP/ 100g, obtidas de pontos de comércio da cidade de São Paulo e litoral do Estado.

Amostra	<i>V. cholerae</i>			<i>V. parahaemolyticus</i>			<i>V. alginolyticus</i>			<i>V. fluvialis</i>			<i>V. furnissii</i>			<i>V. mimicus</i>			<i>V. vulnificus</i>		
	APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB
1	20	0	0	0	4	40	7	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	40	0	3	40	0	15	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	9	0	0	75	110	0	3	110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	150	110	0	4	930	0	0	40	4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	30	0	150	70	0	11	750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30
6	0	3	0	11	150	200	0	0	110	0	0	30	0	0	30	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	14	200	0	14	70	3	0	30	0	0	40	11	0	40	0	7	30
8	0	0	0	0	7	0	0	0	70	7	3	0	0	0	40	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	7	40	0	11	1500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	7	0	0	4	200	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
11	0	0	0	0	7	0	0	3	0	0	0	70	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	3	30	0	3	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	11	200	0	0	200	0	0	30	0	0	0	0	0	0	0	3	30
14	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	40	0	4	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
17	0	3	30	0	0	90	0	0	70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	3	0	0	7	30	0	0	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	110	0	0	110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	15	210	110	4	4	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	4	11	70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	9	0	30	28	11	1200	4	11	110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

NMP/ 100 g - Número Mais Provável de organismos/ 100 gramas de amostra

APA 0% - Água Peptonada Alcalina sem Cloreto de Sódio

APA 1% - Água Peptonada Alcalina com 1% de Cloreto de Sódio.

TABELA 6. Variáveis estatísticas das espécies de vibrios isolados de ostras (*Crassostrea gigas*), em NMP/100g, obtidas em pontos de comércio da cidade de São Paulo e litoral do Estado.

VARIÁVEL	MEDIANA	MÉDIA	MÁXIMO	MÍNIMO
<i>V. cholerae</i>	0	6	40	0
<i>V. parahaemolyticus</i>	35	110	1200	0
<i>V. alginolyticus</i>	70	180	1500	0
<i>V. fluvialis</i>	0	14	150	0
<i>V. furnissii</i>	0	5	40	0
<i>V. mimicus</i>	0	2	40	0
<i>V. vulnificus</i>	0	5	30	0

NMP- Número mais provável de organismos

Figura 3.1. Distribuição percentual de amostras de ostras (*Crassostrea gigas*) obtidas no comércio, segundo o local da colheita.

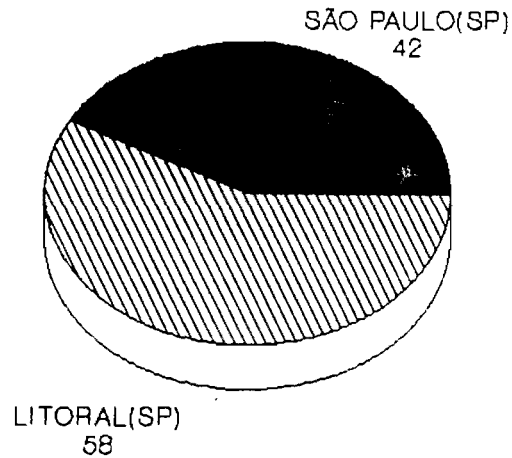


Figura 3.2. Distribuição percentual de amostras de ostras (*Crassostrea gigas*) obtidas no comércio, segundo o local de origem.

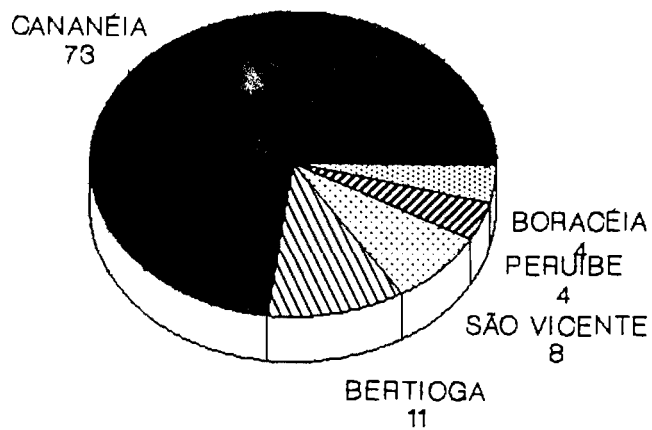


Figura 4. Distribuição percentual de amostras de ostras (*Crassostrea gigas*) obtidas no comércio, segundo o tipo de estabelecimento.

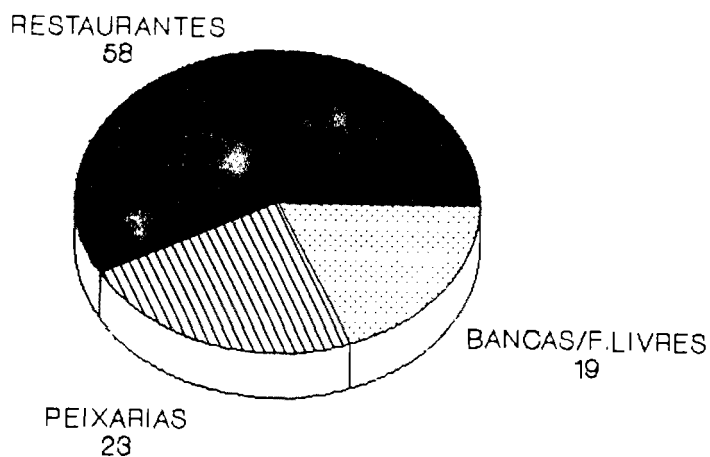


Figura 5. Distribuição de amostras de ostras (*Crassostrea gigas*) obtidas em pontos de comércio, segundo à forma de armazenagem.

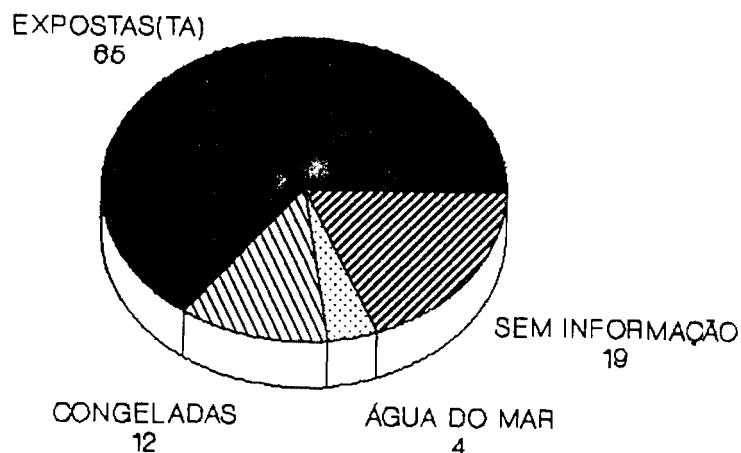


Figura 6. Porcentagem de amostras de ostras (*Crassostrea gigas*) positivas para diversas espécies de vibrios potencialmente patogênicos.

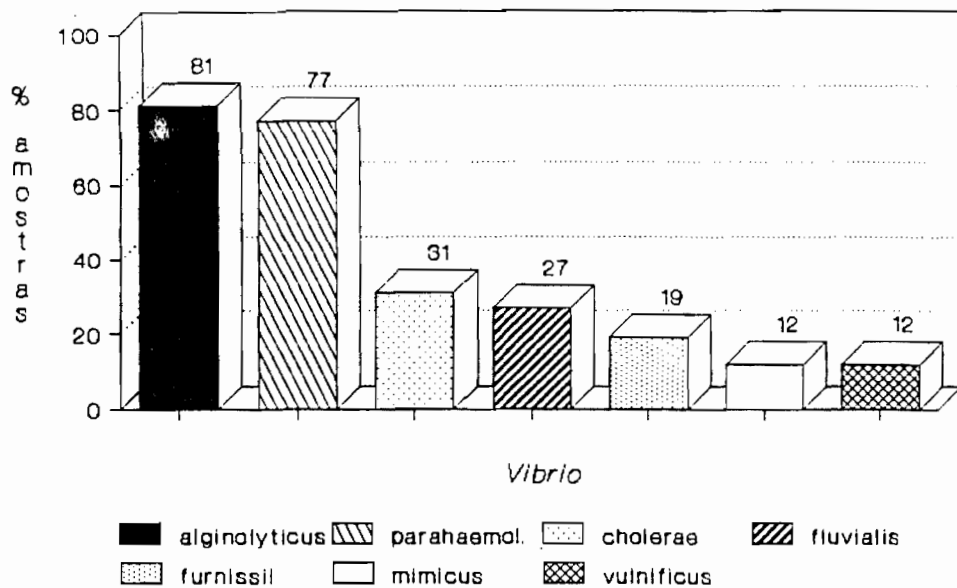
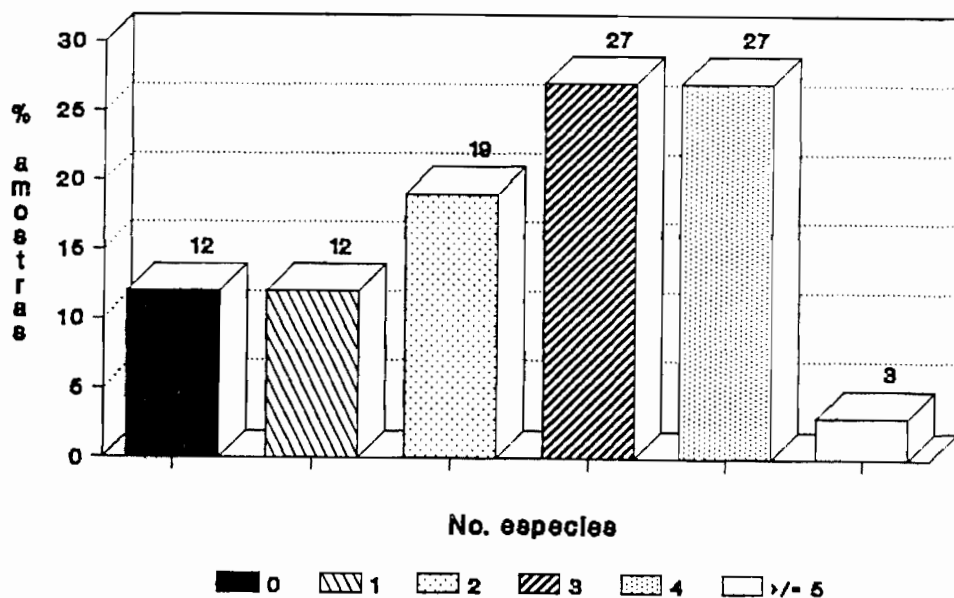


Figura 7. Número de espécies de vibrios isolados por amostra de ostra (*Crassostrea gigas*) disponível no mercado.



4.2. Pesquisa de vibrios em mexilhões coletados no litoral de Ubatuba (SP)

As tabelas 7a, 7b, 8a, 8b, 9a e 9b relacionam os dados de temperatura, salinidade, coliformes totais e fecais da água (NMP/100ml), coliformes totais e fecais dos mexilhões (NMP/100g), e espécies de vibrios potencialmente patogênicos (NMP/100g de mexilhões), isolados na Enseada de Ubatuba-Itaguá, Enseada do Flamengo-Dino e Enseada das Palmas - Ilha Anchieta, Ubatuba-SP.

Os percentuais de isolamento por amostra segundo as espécies de vibrios potencialmente patogênicos, na Enseada de Ubatuba - Itaguá (Ponto-I); Enseada do Flamengo - Dino (Ponto-II); Enseada das Palmas - Ilha Anchieta (Ponto-III) e análise acumulada desses pontos, são apresentados nas Figuras 8, 9, 10 e 11.

As espécies que, constantemente, apresentaram maior incidência, nos três pontos pesquisados, foram *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *V. fluvialis*, e com percentuais menores, *V. vulnificus* (com identificação presuntiva), *V. cholerae* não O:1, *V. furnissii* e *V. mimicus*. Não foram isolados *V. cholerae* O:1, *V. hollisae*, *V. damsela*, *V. metschnikovii* e *V. cincinnatiensis*.

Considerando-se as espécies de vibrios potencialmente patogênicos isoladas em cada amostra pesquisada nos três pontos, e análise acumulada desses pontos, obtiveram-se os percentuais que estão apresentados nas Figuras 12, 13, 14 e 15. Observou-se que a maioria das amostras analisadas apresentaram 2, 3 ou mais espécies em uma mesma amostra.

O número estimado de microrganismos (NMP/100g), para cada espécie de vibrio potencialmente patogênico isolado, é apresentada nas Figuras 16, 17 e 18.

Observou-se de forma geral que as maiores contagens foram apresentadas por *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus*, seguidos pelas demais espécies.

Os valores mínimo, máximo, médio e mediana dos parâmetros determinados, e a análise de correlação entre esses parâmetros, provenientes da Enseada de Ubatuba, Enseada do Flamengo e Enseada das Palmas, estão apresentados nas Tabelas 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17.

A salinidade média anual, considerando-se os três pontos estudados foi de 32‰, oscilando entre a mínima de 22‰ e a máxima de 36‰ (Tabela 13). Verificou-se que não houve correlação deste parâmetro com as diferentes espécies de *Vibrio* isoladas na Enseada de Ubatuba e Enseada do

Flamengo; no entanto, houve uma correlação negativa com a presença de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* ($p < 0,001$) na Enseada das Palmas, o que não ocorreu com as demais espécies.

As Figuras 19 e 20 apresentam paralelamente os dados de temperatura e salinidade com o número mais provável (NMP) de *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus*, respectivamente.

A média anual da temperatura da água, considerando-se os três pontos estudados, foi de 23°C , a temperatura mínima foi de 19°C e a máxima de 28°C (Tabela 13), sendo que a marca de 19°C só foi verificada em 2 ocasiões. Este parâmetro só apresentou correlação com a presença de *V. fluvialis* ($p < 0,01$) na Enseada de Ubatuba (Figura 21).

As Figuras 22 e 23 apresentam o percentual de amostras que atendem aos padrões Brasileiros para coliformes fecais (Portaria n^o 001 de 28/01/87 da DINAL e Resolução n^o 20 de 18/06/86 do CONAMA) para mexilhões e água, segundo o local de coleta e o tipo de amostra, respectivamente.

A Figuras 24 e 25 comparam o NMP/100ml de coliformes totais e fecais na água e o NMP/100g nos mexilhões, nos três pontos estudados.

TABELA 7a. Dados de qualidade da água do mar e número estimado (NMP/100ml ou 100g) de coliformes totais e fecais de água e mexilhões (*Perna perna*), obtidos na Enseada de Ubatuba, Itaguá, Ubatuba, S.P.

Nº da Colheita	Data	ÁGUA				MEXILHÕES	
		Temperatura °C	Salinidade ‰	Coliformes Totais	Coliformes Fecais	Coliformes Totais	Coliformes Fecais
1	15.02.89	26,5	31,5	1,3X10 ²	8,0x10 ¹	1,3x10 ⁴	2,2x10 ³
2	28.03.89	25	22,9	3,0X10 ⁴	8,0x10 ³	1,3x10 ⁵	3,0x10 ⁴
3	25.04.89	25	33,8	2,8X10 ³	1,7x10 ³	3,0x10 ⁵	8,0x10 ³
4	30.05.89	22,5	34,9	1,3x10 ⁴	5,0x10 ³	3,0x10 ⁴	3,0x10 ⁴
5	20.06.89	21	33,5	2,3x10 ²	5,0x10 ¹	3,0x10 ³	1,3x10 ³
6	18.07.89	20	34,4	5,0x10 ²	3,3x10 ¹	3,0x10 ³	5,0x10 ²
7	15.08.89	20,5	35,5	1,3x10 ³	8,0x10 ¹	4,0x10 ³	8,0x10 ²
8	26.09.89	21	35,4	5,0x10 ³	8,0x10 ²	5,0x10 ⁴	1,1x10 ⁴
9	24.10.89	21	34	1,7x10 ³	5,0x10 ²	1,3x10 ⁵	5,0x10 ⁴
10	28.11.89	22,5	35,5	2,7x10 ¹	1,1x10 ¹	1,1x10 ³	5,0x10 ¹
11	12.12.89	22	34,9	8,0x10 ¹	3,0x10 ¹	2,3x10 ³	3,0x10 ²
12	16.01.90	27	34,4	2,4x10 ⁴	2,4x10 ⁴	8,0x10 ⁵	2,4x10 ⁴

TABELA 7b. Vibrios potencialmente patogênicos, em NMP/ 100g, isolados de mexilhões (*Perna perna*), mediante diferentes meios de cultivo, obtidos na Enseada de Ubatuba, Itaguá, Ubatuba, S.P.

Nº	Data	<i>V. alginolyticus</i>			<i>V. parahaemolyticus</i>			<i>V. cholerae</i> não O:1			<i>V. fluvialis</i>			<i>V. furnissii</i>			<i>V. mimicus</i>			<i>V. vulnificus</i>		
		APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB
1	15.02.89	0	21	2400	0	3	70	0	0	0	0	3	30	0	0	0	0	9	9	0	0	0
2	28.03.89	43	1100	930	3	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	25.04.89	210	24000	24000	0	3	0	0	0	0	0	0	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	30.05.89	9	4	40	3	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	20.06.89	0	1100	0	0	210	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
6	18.07.89	21	240	230	1100	24000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	15.08.89	460	4	2400	7	24000	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	26.09.89	23	120	2400	9	210	230	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	24.10.89	75	93	24000	11	210	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
10	28.11.89	9	23	24000	0	24000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	12.12.89	4	9	9	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	16.01.90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

NMP/100g - Numero mais provável de organismos por 100 g de amostra

APA 0% - Água Peptonada Alcalina sem Cloreto de Sódio

APA 1% - Água Peptonada Alcalina com 1% de Cloreto de Sódio

0 = < 3

TABELA 8a . Dados da qualidade da água do mar e número estimado (NMP/100 ml ou 100g) de coliformes totais e fecais de água e de mexilhões (*Perna perna*), obtidos na Enseada do Flamengo, Dino, Ubatuba, S.P.

Nº da Colheita	Data	ÁGUA				MEXILHÕES	
		Temperatura °C	Salinidade ‰	Coliformes Totais	Coliformes Fecais	Coliformes Totais	Coliformes Fecais
1	15.02.89	28	30	2	2	$3,0 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$
2	28.03.89	26	29	$8,0 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$
3	25.04.89	25	31	2	2	$5,0 \times 10^2$	$1,1 \times 10^1$
4	30.05.89	22,5	30	$1,3 \times 10^1$	4	$2,3 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$
5	20.06.89	22	31	$1,7 \times 10^1$	2	$3,0 \times 10^2$	$7,0 \times 10^1$
6	18.07.89	21	32	$2,3 \times 10^1$	8	$5,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^2$
7	15.08.89	21	-	$1,1 \times 10^1$	4	$8,0 \times 10^1$	$1,7 \times 10^1$
8	26.09.89	19	32	$5,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^1$	$9,0 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$
9	24.10.89	21,1	32	4	2	$1,3 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2$
10	28.11.89	24	34	2	2	$1,7 \times 10^2$	$4,0 \times 10^1$
11	12.12.89	24	32	$8,0 \times 10^1$	$5,0 \times 10^1$	$5,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$
12	16.01.90	28	36	$1,7 \times 10^1$	4	$1,7 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$

TABELA 8b. Vibrios potencialmente patogênicos, em NMP/ 100g, isolados de mexilhões (*Perna perna*), mediante diferentes meios de cultura, obtidos da Enseada do Flamengo, Dino, Ubatuba, S.P.

Nº	Data	<i>V. alginolyticus</i>			<i>V. parahaemolyticus</i>			<i>V. cholerae</i> não O:1			<i>V. fluvialis</i>			<i>V. furnissii</i>			<i>V. mimicus</i>			<i>V. vulnificus</i>			
		APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB	
1	15.02.89	0	210	930	0	0	0	23	3	0	0	0	70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	28.03.89	7	210	110	0	14	30	0	0	0	0	23	0	0	0	30	0	0	0	0	3	0	0
3	25.04.89	210	1100	210	3	0	0	0	0	0	0	0	40	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	30.05.89	15	7	0	0	0	0	0	0	0	23	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	20.06.89	3	24000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	18.07.89	24000	24000	30	43	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	15.08.89	1100	24000	430	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	26.09.89	7	120	4600	3	0	70	0	0	0	3	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	24.10.89	24000	1100	4600	20	210	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	28.11.89	21	24000	24000	3	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	12.12.89	9	1100	0	0	14	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	16.01.90	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

NMP/100g - Número mais provável de organismos por 100g de amostra

APA 0% - Água Peptonada Alcalina sem Cloreto de Sódio

APA 1% - Água Peptonada Alcalina com 1% de Cloreto de Sódio

0 = < 3

TABELA 9a Dados de qualidade da água do mar e número estimado (NMP/100ml ou 100g) de coliformes totais e fecais de água e de mexilhões (*Perna perna*), obtidos na Enseada das Palmas, Ilha Anchieta, Ubatuba, S.P.

Nº da Colheita	Data	ÁGUA			MEXILHÕES		
		Temperatura °C	Salinidade ‰	Coliformes Totais	Coliformes Fecais	Coliformes Totais	Coliformes Fecais
1	15.02.89	27	32	1,3x10 ¹	2	8,0x10 ²	3,0x10 ²
2	28.03.89	27	30	5,0x10 ³	1,3x10 ²	2,3x10 ⁴	8,0x10 ³
3	25.04.89	28	32	1,3x10 ¹	1,3x10 ¹	5,0x10 ²	5,0x10 ²
4	30.05.89	22	33	1,7x10 ¹	2	1,7x10 ²	2,0x10 ¹
5	20.06.89	23,5	33	3,0x10 ¹	2	2,3x10 ²	2,3x10 ²
6	18.07.89	21	33	2,3x10 ¹	2	2,3x10 ²	4,0x10 ¹
7	15.08.89	20,5	-	4	2	1,3x10 ²	7
8	26.09.89	19	22	2,3x10 ¹	4	3,0x10 ⁴	3,0x10 ²
9	24.10.89	21,6	32	8,0x10 ¹	4	1,3x10 ³	8,0x10 ²
10	28.11.89	25	34	1,3x10 ¹	2	2,4x10 ³	2,4x10 ³
11	12.12.89	22	33	2	2	1,3x10 ³	2,3x10 ²
12	16.01.90	26	36	3,0x10 ³	5,0x10 ¹	3,0x10 ²	4,0x10 ¹

TABELA 9b. Vibrios potencialmente patogênicos, em NMP/ 100g, isolados de mexilhões (*Perna perna*), mediante diferentes meios de cultivo, obtidos na Enseada das Palmas, Ilha Anchieta, Ubatuba, S.P.

Nº	Data	<i>V. alginolyticus</i>			<i>V. parahaemolyticus</i>			<i>V. cholerae</i> não O:1			<i>V. fluvialis</i>			<i>V. furnissii</i>			<i>V. mimicus</i>			<i>V. vulnificus</i>		
		APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB	APA 0%	APA 1%	GSTB
1	15.02.89	0	150	4600	0	7	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	28.03.89	3	1100	230	7	28	0	3	0	0	7	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	25.04.89	150	150	4600	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	30.05.89	21	93	200	0	0	0	0	0	0	23	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	20.06.89	9	460	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	18.07.89	24000	24000	230	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	15.08.89	1100	1100	210	14	64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	26.09.89	150	1100	4600	0	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
9	24.10.89	15	21	24000	0	0	0	0	0	0	7	1100	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	28.11.89	150	240	1100	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	12.12.89	0	210	40	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	16.01.90	0	1100	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

NMP/100g - Número mais provável de organismos por 100g de amostra

APA 0% - Água Peptonada Alcalina sem Cloreto de Sódio

APA 1% - Água Peptonada Alcalina com 1% de Cloreto de Sódio

0 = < 3

TABELA 10. Variáveis estatísticas dos parâmetros analisados de amostras de água e de mexilhões (*Perna perna*) obtidas na Enseada de Ubatuba, Itaguá, Ubatuba, S.P.

VARIÁVEL	UNIDADE	MEDIANA	MÉDIA	MÁXIMO	MÍNIMO
Temperatura (água)	°C	21.5	23	27	20
Salinidade (água)	‰	34.4	33	35.5	22.9
Colif. Total Água	NMP/100mL	1500	6700	30000	27
Colif. Fecal Água	"	290	3300	24000	11
Colif. Total Molusco	NMP/100g	21500	120000	800000	1100
Colif. Fecal Molusco	NMP/100g	6600	42000	300000	50
<i>V. alginolyticus</i>	"	1100	6800	24000	0
<i>V. parahaemolyticus</i>	"	140	6100	24000	0
<i>V. cholerae</i>	"	0	0	0	0
<i>V. fluvialis</i>	"	0	6	30	0
<i>V. furnissii</i>	"	0	0	0	0
<i>V. mimicus</i>	"	0	1	9	0
<i>V. vulnificus</i>	"	0	0,25	3	0

NMP - Número mais provável de organismos.

TABELA 11. Variáveis estatísticas dos parâmetros analisados de amostras de água e de mexilhões (*Perna perna*) obtidas na Enseada do Flamengo, Dino, Ubatuba, S.P.

VARIÁVEL	UNIDADE	MEDIANA	MÉDIA	MÁXIMO	MÍNIMO
Temperatura (água)	°C	23.2	23	28	19
Salinidade (água)	‰	32	32	36	29
Colif. Total Água	NMP/100mL	15	722	8000	2
Colif. Fecal Água	"	3	120	1300	2
Colif. Total Molusco	NMP/100g	650	89000	500000	80
Colif. Fecal Molusco	"	300	44000	300000	11
<i>V. alginolyticus</i>	"	2850	11000	24000	14
<i>V. parahaemolyticus</i>	"	10.5	31	210	0
<i>V. cholerae</i>	"	5	2	23	0
<i>V. fluvialis</i>	"	0	16	70	0
<i>V. furnissii</i>	"	0	3	30	0
<i>V. mimicus</i>	"	0	0	0	0
<i>V. vulnificus</i>	"	0	0,25	3	0

NMP - Número mais provável de organismos.

TABELA 12. Variáveis estatísticas dos parâmetros analisados de amostras de água e de mexilhões (*Perna perna*) obtidos na Enseada das Palmas, Ilha Anchieta, Ubatuba, S.P.

VARIÁVEL	UNIDADE	MEDIANA	MÉDIA	MÁXIMO	MÍNIMO
Temperatura (água)	°C	23.5	23	28	19
Salinidade (água)	‰	33	32	36	22
Colif. Total Água	NMP/100mL	17	680	5000	2
Colif. Fecal Água	"	2	18	130	2
Colif. Total Molusco	NMP/100g	500	5000	30000	130
Colif. Fecal Molusco	"	230	1100	8000	7
<i>V. alginolyticus</i>	"	1100	5200	24000	4
<i>V. parahaemolyticus</i>	"	4	24	150	0
<i>V. cholerae</i>	"	0	0.83	7	0
<i>V. fluvialis</i>	"	0	94	1100	0
<i>V. furnissii</i>	"	0	0	0	0
<i>V. mimicus</i>	"	0	0	0	0
<i>V. vulnificus</i>	"	0	0.25	3	0

NMP- Número mais provável de organismos.

TABELA 13. Variáveis estatísticas dos parâmetros analisados de amostras de água e de mexilhões (*Perna perna*), obtidas na Enseada de Ubatuba, Itaguá; Enseada do Flamengo, Dino e Enseada das Palmas, Ilha Anchieta, Ubatuba, S.P..

VARIÁVEL	UNIDADE	MEDIANA	MÉDIA	MÁXIMO	MÍNIMO
Temperatura (Água)	°C	22.5	23	28	19
Salinidade (Água)	‰	32.5	32	36	22
Colif. Total (Água)	NMP/100ml	25	2655	30000	2
Colif. Fecal (Água)	"	11	1198	24000	2
Colif. Total (Molusco)	NMP/100g	2350	71994	800000	4
Colif. Fecal (Molusco)	"	500	49245	800000	11
<i>V. alginolyticus</i>	"	1100	6961	24000	0
<i>V. parahaemolyticus</i>	"	9	2705	24000	0
<i>V. cholerae</i>	"	0	1	23	0
<i>V. fluvialis</i>	"	0	39	1100	0
<i>V. furnissii</i>	"	0	.097	30	0
<i>V. mimicus</i>	"	0	0.33	9	0
<i>V. vulnificus</i>	"	0	0.25	3	0

NMP - Número Mais Provável de organismos

TABELA 14. Coeficiente de correlação de Pearson entre os diversos parâmetros obtidos na Enseada de Ubatuba, Itaguá, Ubatuba, S.P. n = 12

VARIÁVEIS	Temp	Sal	CFA	CTA	CFM	CTM	Va	Vp	Vc	Vf	Vfi	Vm	Vv
Temperatura da água (Temp)	-												
Salinidade da água (Sal)	-.5296	-											
Colif. Fecal Água (CFA)	.3621	-.8041*	-										
Colif. Total Água (CTA)	.4109	-.7332*	.9763**	-									
Colif. Fecal Molusco (CFM)	.4342	-.3221	.2691	.3354	-								
Colif. Total Molusco (CTM)	.3486	-.2363	.2612	.3686	.9503**	-							
<i>V. alginolyticus</i> (Va)	.1287	.1132	-.2550	-.2018	.5726	.5887	-						
<i>V. parahaemolyticus</i> (Vp)	-.4412	.3525	-.3103	-.3564	-.4003	-.4468	.0882	-					
<i>V. cholerae</i> (Vc)	-				
<i>V. fluvialis</i> (Vf)	.7107*	.0069	-.1707	-.1031	.4968	.4085	.2104	-.3626	.	-			
<i>V. furnissii</i> (Vfi)	-		
<i>V. mimicus</i> (Vm)	.5404	-.1761	-.2111	-.2139	-.0850	-.0753	.0151	-.2522	.	.5703	.	-	
<i>V. vulnificus</i> (Vv)	-.2256	.0356	-.1725	-.1810	-.2047	-.2192	-.1964	-.1902	.	-.1864	.	-.1305	-

* p < 0,01 ** p < 0,001 "." Coeficiente não computado

TABELA 15. Coeficiente de correlação de Pearson entre os diversos parâmetros obtidos na Enseada do Flamengo, Dino, Ubatuba, S.P. n = 12

VARIÁVEIS	Temp	Sal	CFA	CTA	CFM	CTM	Va	Vp	Vc	Vf	Vfi	Vm	Vv
Temperatura da água (Temp)	-												
Salinidade da água (Sal)	.0892	-											
Colif. Fecal Água (CFA)	.2312	-.4616	-										
Colif. Total Água (CTA)	.2457	-.4618	.9992**	-									
Colif. Fecal Molusco (CFM)	.1977	-.3097	.6695	.6924*	-								
Colif. Total Molusco (CTM)	.1974	-.2558	.5572	.5825	.9869**	-							
<i>V. alginolyticus</i> (Va)	-.5192	.2152	-.2758	-.2790	-.3510	-.3696	-						
<i>V. parahaemolyticus</i> (Vp)	-.4988	.0120	-.0104	-.0180	-.0886	-.1001	.4077	-					
<i>V. cholerae</i> (Vc)	.4913	-.2932	-.1087	-.1089	-.1559	-.1480	-.2436	-.1794	-				
<i>V. fluvialis</i> (Vf)	.5988	-.4109	.0760	.0710	-.1287	-.1389	-.5995	-.3495	.8101*	-			
<i>V. furnissii</i> (Vfi)	.2796	-.4776	.9922**	.9929**	.6563	.5443	-.2875	-.0372	.1106	.1168	-		
<i>V. mimicus</i> (Vm)	-	
<i>V. vulnificus</i> (Vv)	.2633	-.4629	.9981**	.9988**	.6690	.5564	-.2642	-.0207	.1000	.0817	.9950**	.	-

* p < 0,01 ** p < 0,001 "." coeficiente não computado

TABELA 16 .Coeficiente de correlação de Pearson entre os diversos parâmetros obtidos na Enseada das Palmas, Ilha Anchieta, Ubatuba, S.P. n = 12

VARIÁVEIS	Temp	Sal	CFA	CTA	CFM	CTM	Va	Vp	Vc	Vf	Vfi	Vm	Vv
Temperatura da água(Temp)	-												
Salinidade da água (Sal)	.4388	-											
Colif. Fecal Água (CFA)	.4495	.0564	-										
Colif. Total Água (CTA)	.4679	.0350	.9763**	-									
Colif. Fecal Molusco (CFM)	-.2259	-.8693**	.4082	-.4776	-								
Colif. Total Molusco (CTM)	.3943	-.1324	.7761*	.8705**	.5230	-							
<i>V. alginolyticus</i> (Va)	-.4503	-.0169	-.2225	-.2237	-.1324	-.1700	-						
<i>V. parahaemolyticus</i> (Vp)	-.4672	-.9185**	.0176	-.0341	.8507**	-.0183	-.0875	-					
<i>V. cholerae</i> (Vc)	.2723	.1243	.2065	-.2416	.1333	.5567	-.2189	-.1189	-				
<i>V. fluvialis</i> (Vf)	-.2542	.0184	-.1309	-.1273	-.1322	-.0495	.6567	-.1539	-.1379	-			
<i>V. furnissii</i> (Vfi)	-		
<i>V. mimicus</i> (Vm)	-	
<i>V. vulnificus</i> (Vv)	-.5438	-.9115**	-.1438	-.1294	.7722**	-.1219	-.0351	.9771**	-.1363	-.1033	.	.	-

* p< 0,01 ** p< 0,001 "." coeficiente não computado

TABELA 17. Coeficiente de correlação de Pearson entre os diversos parâmetros obtidos na Enseada de Ubatuba, Itaguá; Enseada do Flamengo, Dino e Enseada das Palmas, Ilha Anchieta, Ubatuba, S.P. n = 36

VARIÁVEIS	Temp	Sal	CFA	CTA	CFM	CTM	Va	Vp	Vc	Vf	Vfi	Vm	Vv
Temperatura da água (temp)	-												
Salinidade da água (sal)	.0180	-											
Colif. Fecal Água (CFA)	.2420	-.2869	-										
Colif. Total Água (CTA)	.2490	-.0231	.8106**	-									
Colif. Fecal Molusco (CFM)	.2756	-.0546	.5382**	.7173**	-								
Colif. Total Molusco (CTM)	.2163	.0518	.2262	.3228	.6774**	-							
<i>V. alginolyticus</i> (Va)	-.2957	.0579	-.2357	-.1665	-.1041	.1513	-						
<i>V. parahaemolyticus</i> (Vp)	-.2880	.2865	-.1038	-.0883	-.1296	-.1072	.0490	-					
<i>V. cholerae</i> (Vc)	.3453	-.1129	-.0847	-.0687	-.0967	-.0802	-.1514	-.0762	-				
<i>V. fluvialis</i> (Vf)	-.0875	-.0265	-.0805	-.0543	-.0687	-.0418	.2716	-.0710	.0104	-			
<i>V. furnissii</i> (Vfi)	.1772	-.1942	.1279	-.0023	.4069*	.1974	-.1335	-.0599	-.0459	-.0175	-		
<i>V. mimicus</i> (Vm)	.1408	-.0479	-.0762	-.0546	-.0425	-.0556	.0102	-.0671	-.0534	-.0228	-.0425	-	
<i>V. vulnificus</i> (Vv)	-.1668	-	-.0028	-.0570	.1776	.0513	-.1655	-.0928	-.0747	-.0568	.5531**	-.0691	-
		.4196*											

* p < 0,01

** p < 0,001

." coeficiente não computado

Figura 8. Porcentagem de amostras positivas para vibrios potencialmente patogênicos obtidos de mexilhões (*Perna perna*) colhidos na Enseada de Ubatuba, Itaguá, Ubatuba-SP.

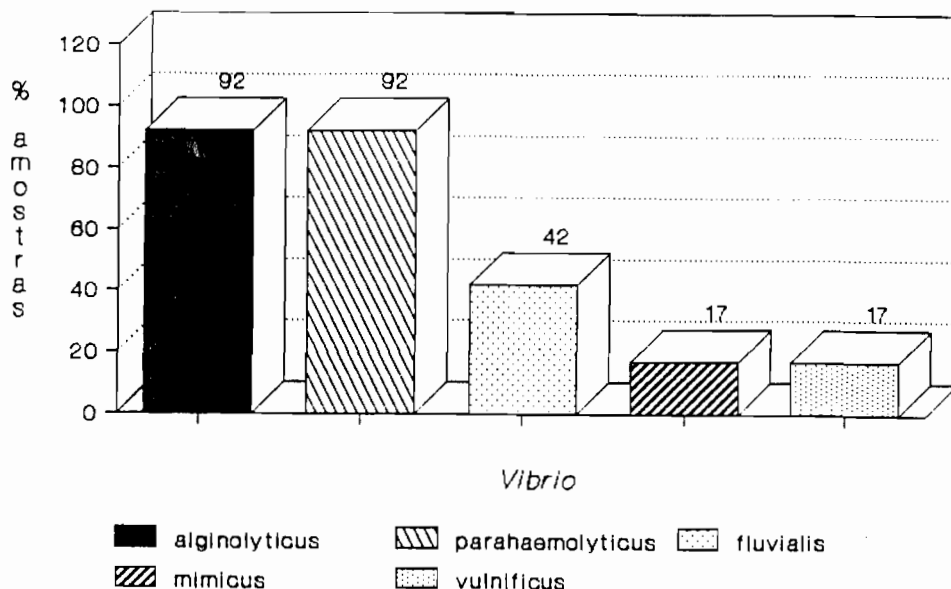


Figura 9. Porcentagem de amostras positivas para vibrios potencialmente patogênicos obtidos de mexilhões (*Perna perna*) colhidos na Enseada do Flamengo, Dino, Ubatuba-SP.

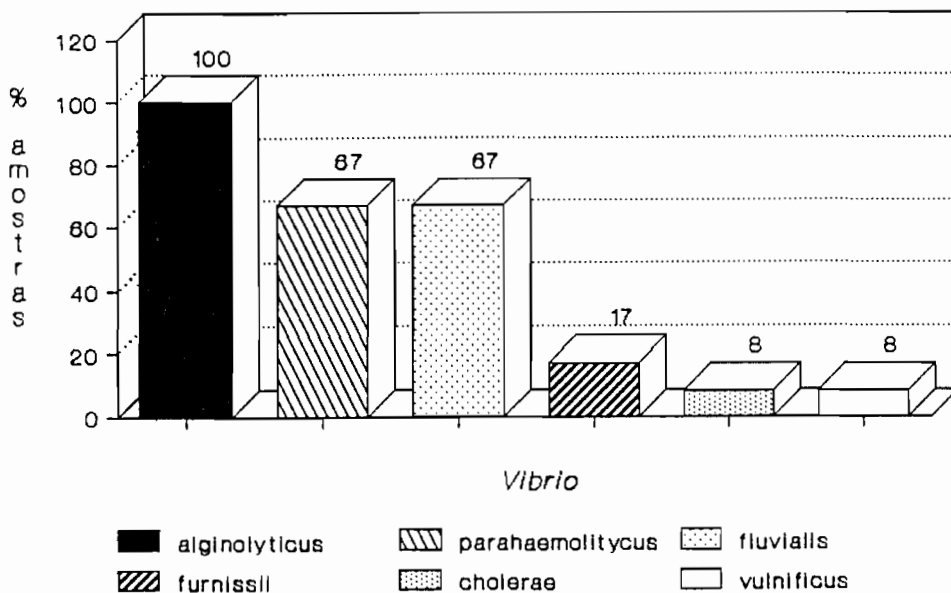


Figura 10. Porcentagem de amostras positivas para vibrios potencialmente patogênicos obtidos de amostras de mexilhões (*Perna perna*) colhidos na Enseada das Palmas, Ilha Anchieta, Ubatuba-SP.

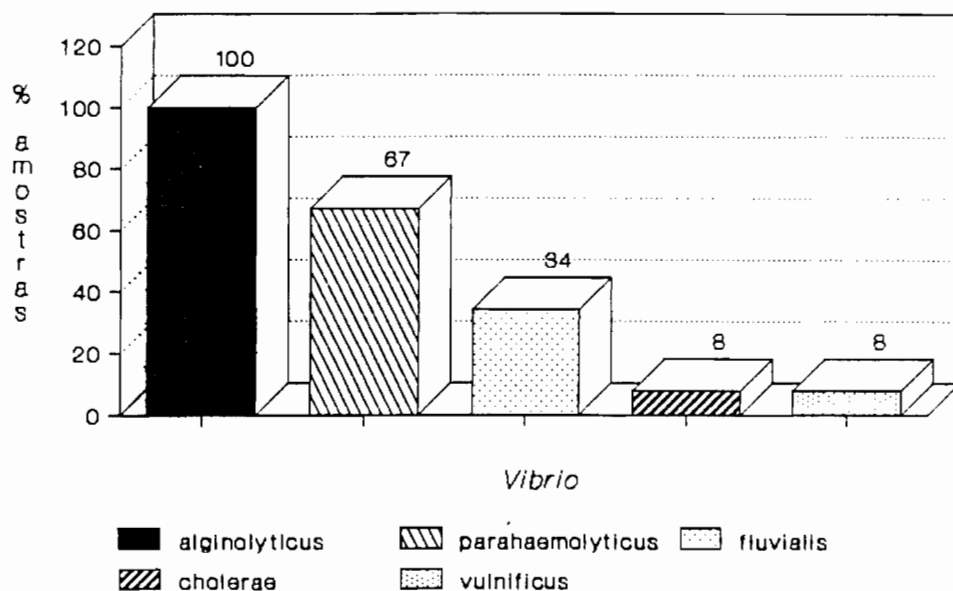


Figura 11. Total de amostras de mexilhões (*Perna perna*) positivas para vibrios potencialmente patogênicos colhidas no litoral de Ubatuba-SP.

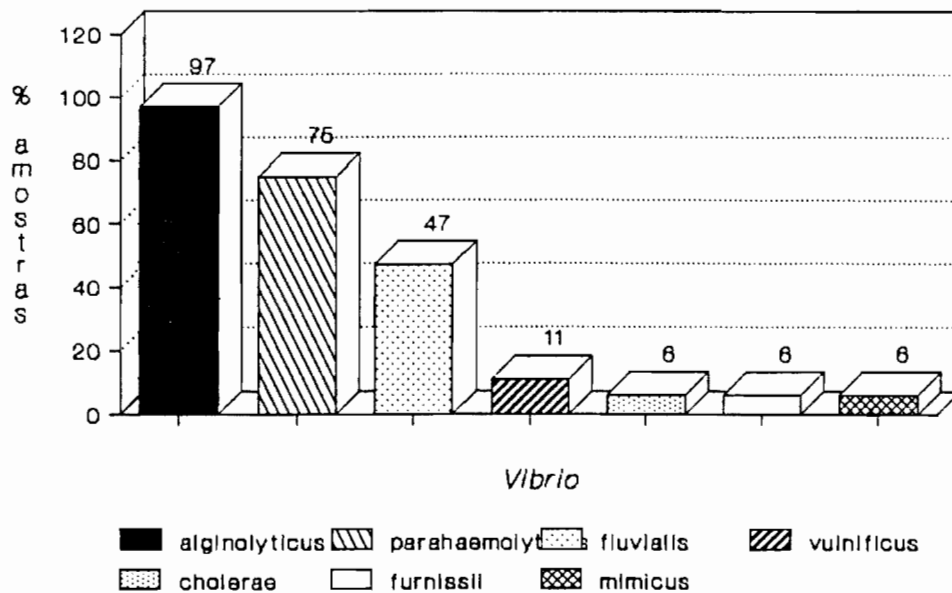


Figura 12. Número de espécies de vibrios potencialmente patogênicos isolados por amostra de mexilhões (*Perna perna*) colhidos na Enseada de Ubatuba, Itaguá, Ubatuba - SP.

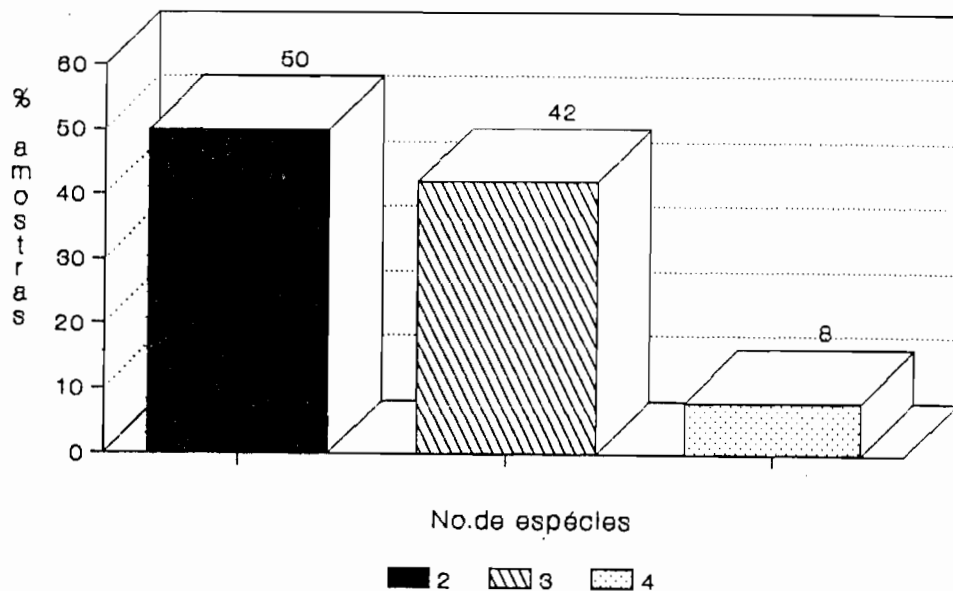


Figura 13. Número de espécies de vibrios potencialmente patogênicos isolados por amostra de mexilhões (*Perna perna*) colhidos na Enseada do Flamengo, Dino, Ubatuba-SP.

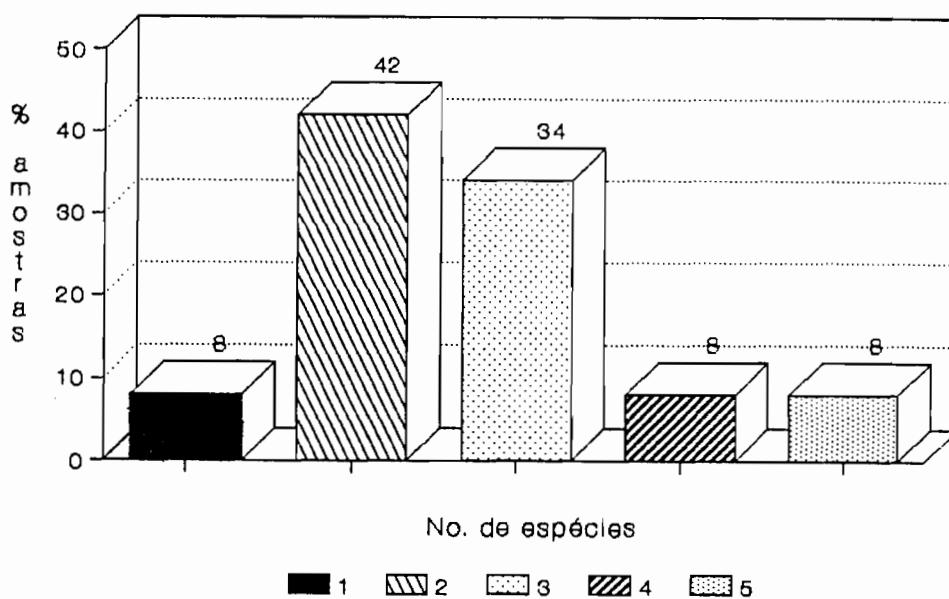


Figura 14. Número de espécies de vibrios potencialmente patogênicos isolados por amostra de mexilhões (*Perna perna*) colhidos na Enseada das Palmas, Ilha Anchieta, Ubatuba-SP.

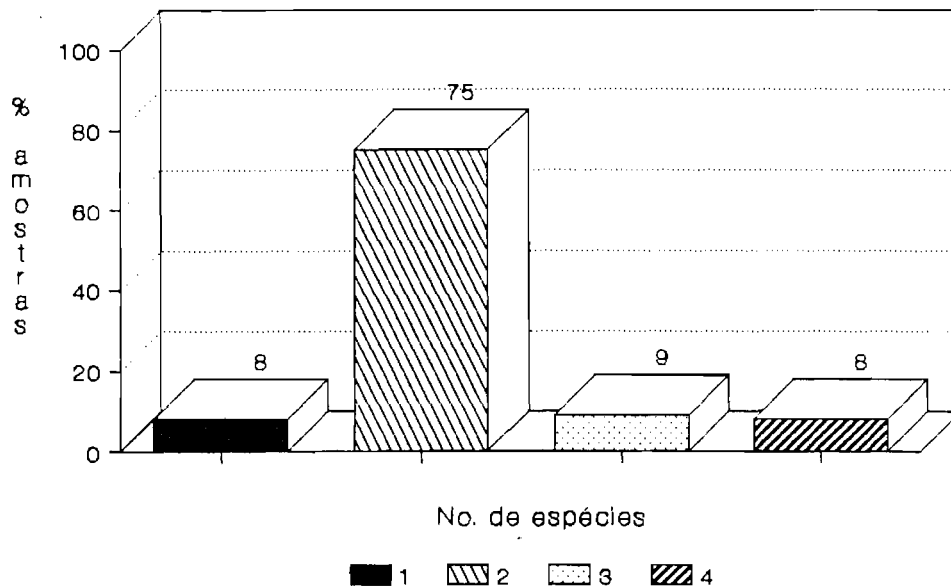


Figura 15. Número de espécies de vibrios potencialmente patogênicos isolados por amostra de mexilhões (*Perna perna*) colhidos no litoral de Ubatuba-SP.

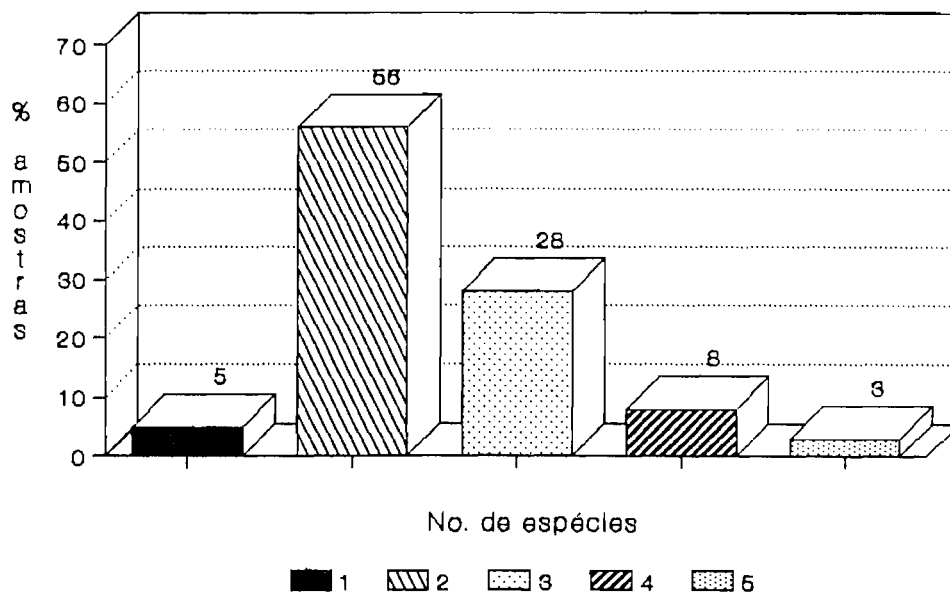


Figura 16. Distribuição do NMP/100g de vibrios potencialmente patogênicos em mexilhões (*Perna perna*), durante o período de Fevereiro/89 a Janeiro/90. Enseada de Ubatuba, Itaguá, Ubatuba-SP.

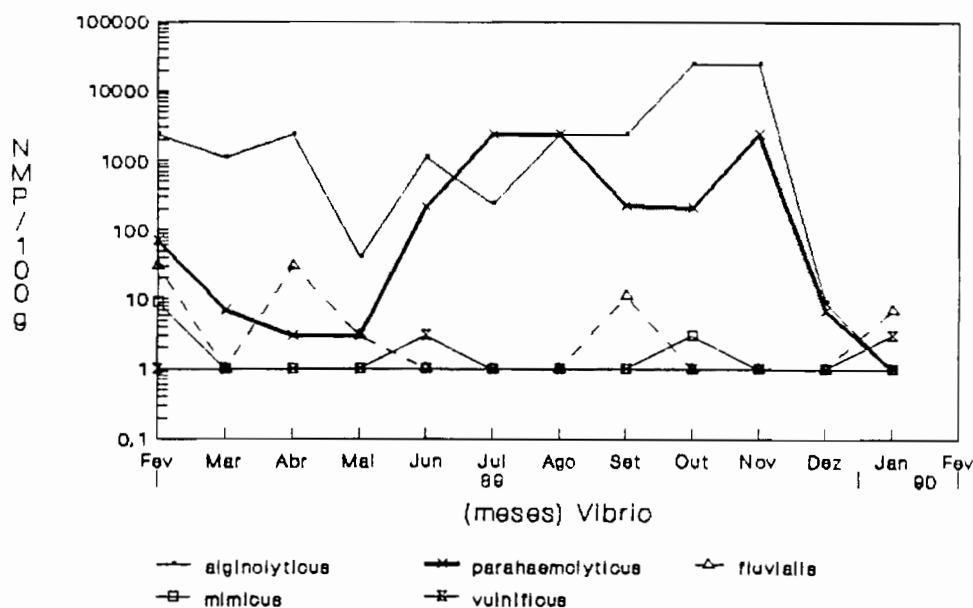


Figura 17. Distribuição do NMP/100g de vibrios potencialmente patogênicos em mexilhões (*Perna perna*), durante o período de Fevereiro/89 a Janeiro/90. Enseada do Flamengo, Dino, Ubatuba-SP.

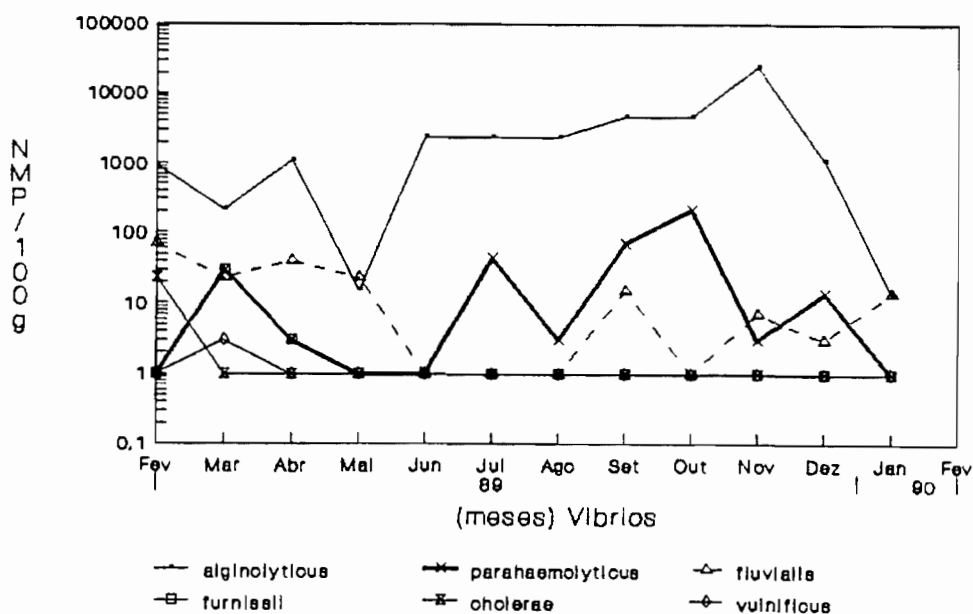


Figura 18. Distribuição do NMP/100g de vibrios potencialmente patogênicos em mexilhões (*Perna perna*), durante o período de Fevereiro/89 a Janeiro/90. Enseada das Palmas, Ilha Anchieta, Ubatuba-SP.

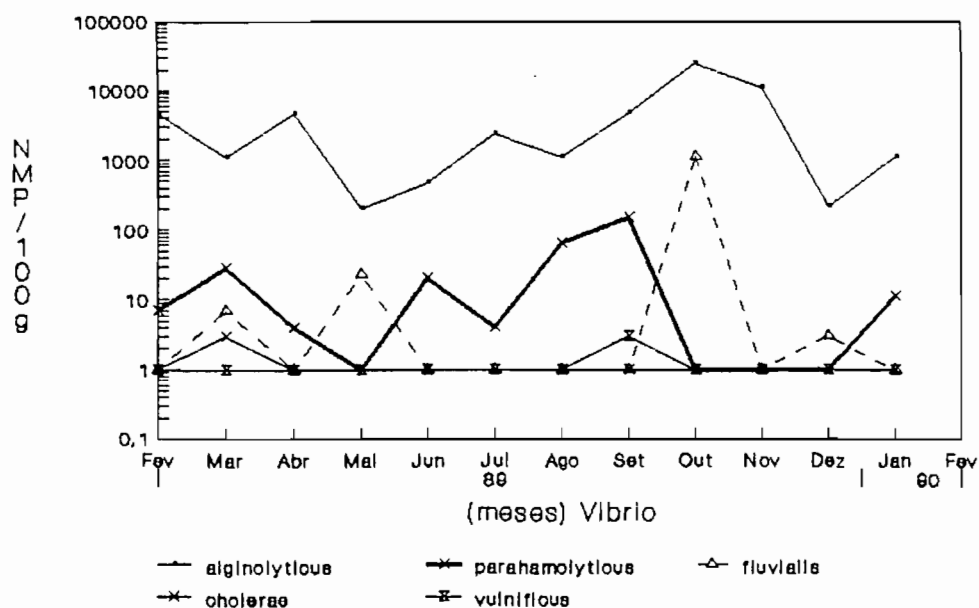
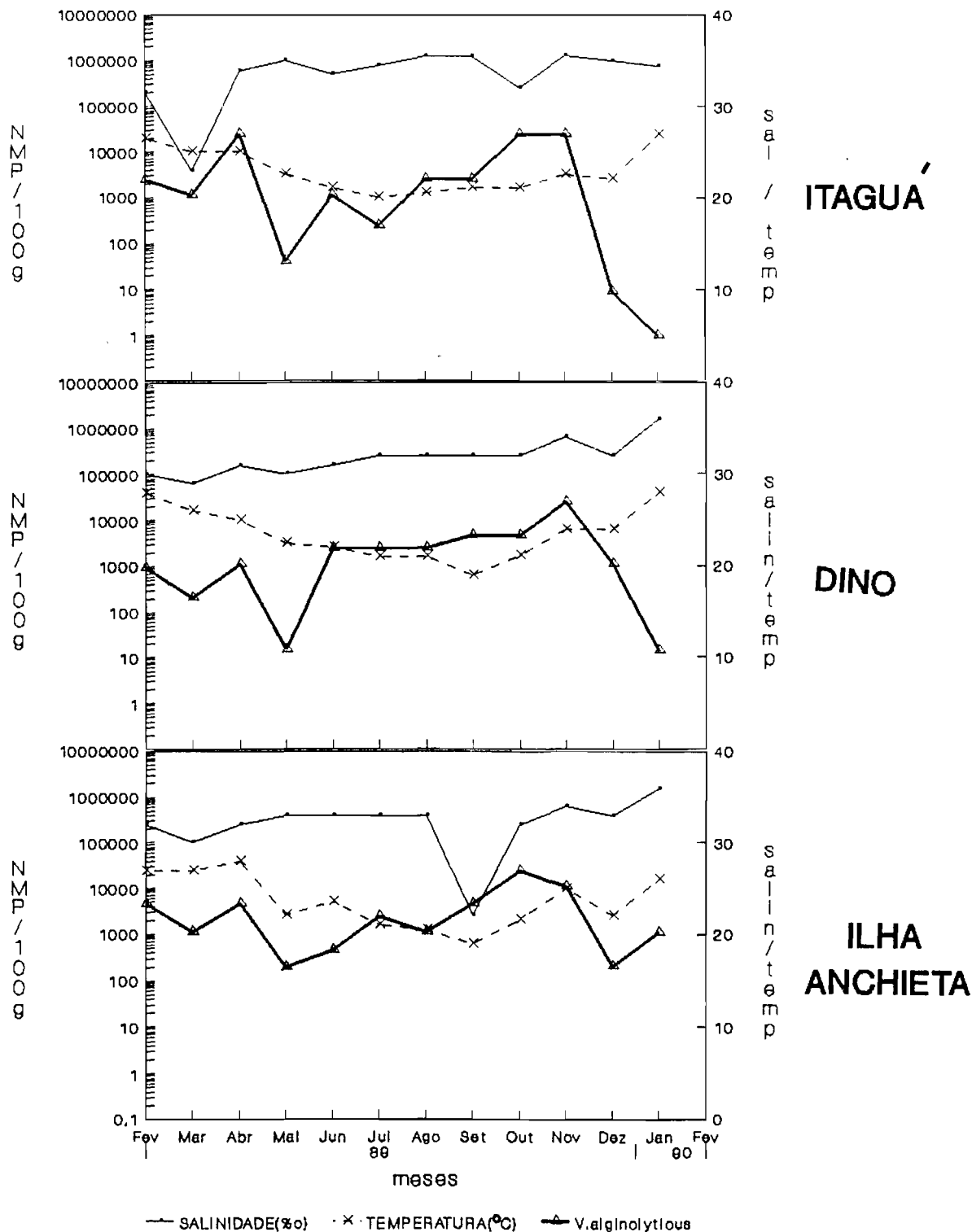


Figura 19. Comparação entre salinidade, temperatura e presença de *Vibrio alginolyticus* em amostras de mexilhões (*Perna perna*), colhidos durante o período de Fevereiro/89 a Janeiro/90. Enseada de Ubatuba, Itaguá; Enseada do Flamengo, Dino; e Enseada das Palmas, Ilha Anchieta, Ubatuba-SP.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Figura 20. Comparação entre salinidade, temperatura e presença de *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de mexilhões (*Perna perna*), colhidos durante o período de Fevereiro/89 a Janeiro/90. Enseada de Ubatuba, Itaguá; Enseada do Flamengo, Dino; e Enseada das Palmas, Ilha Anchieta, Ubatuba-SP.

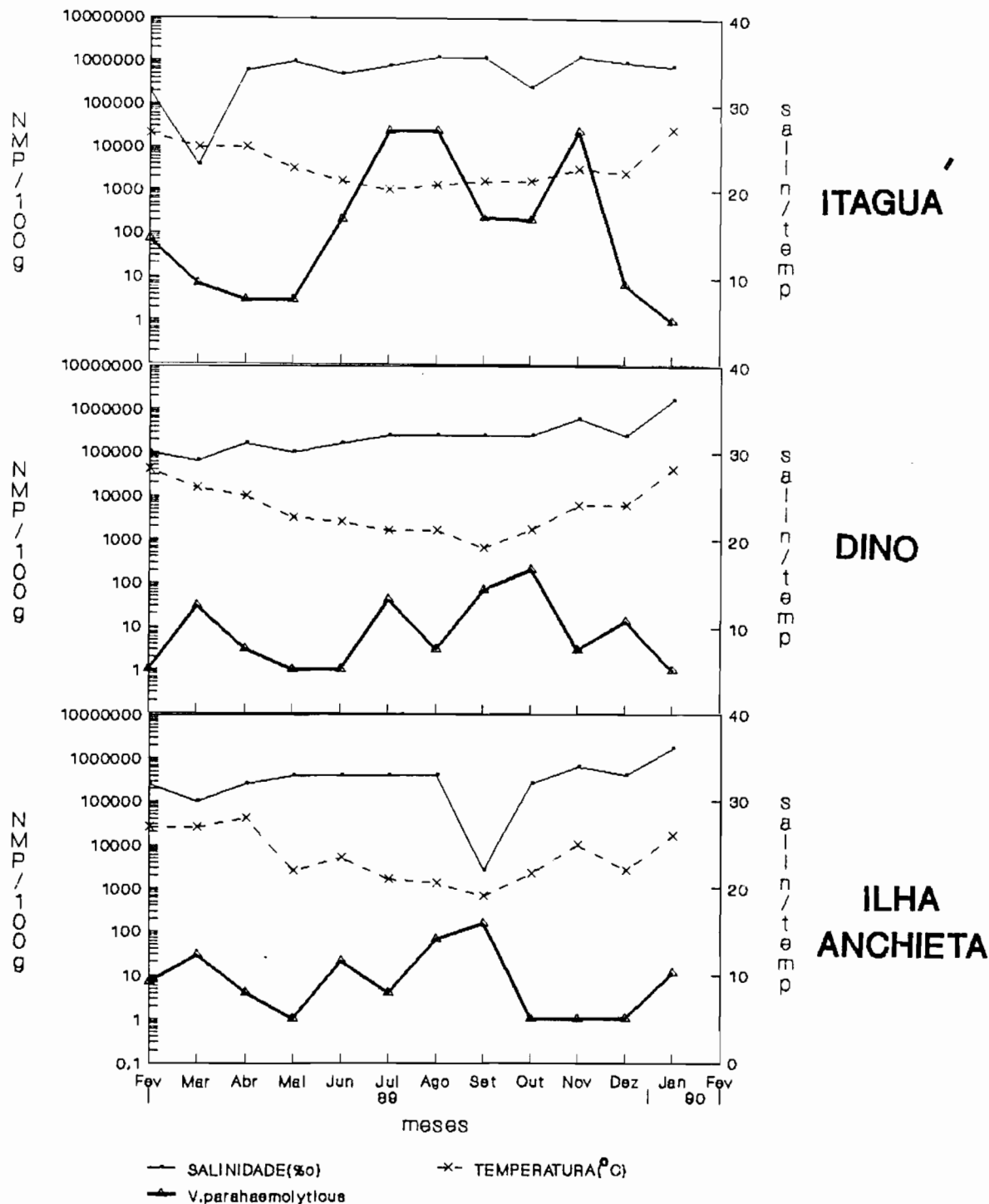


Figura 21. Comparação entre salinidade, temperatura e presença de *Vibrio fluvialis* em amostras de mexilhões (*Perna perna*), colhidos durante o período de Fevereiro/89 a Janeiro/90. Enseada de Ubatuba, Itaguá; Enseada do Flamengo, Dino; e Enseada das Palmas, Ilha Anchieta, Ubatuba-SP.

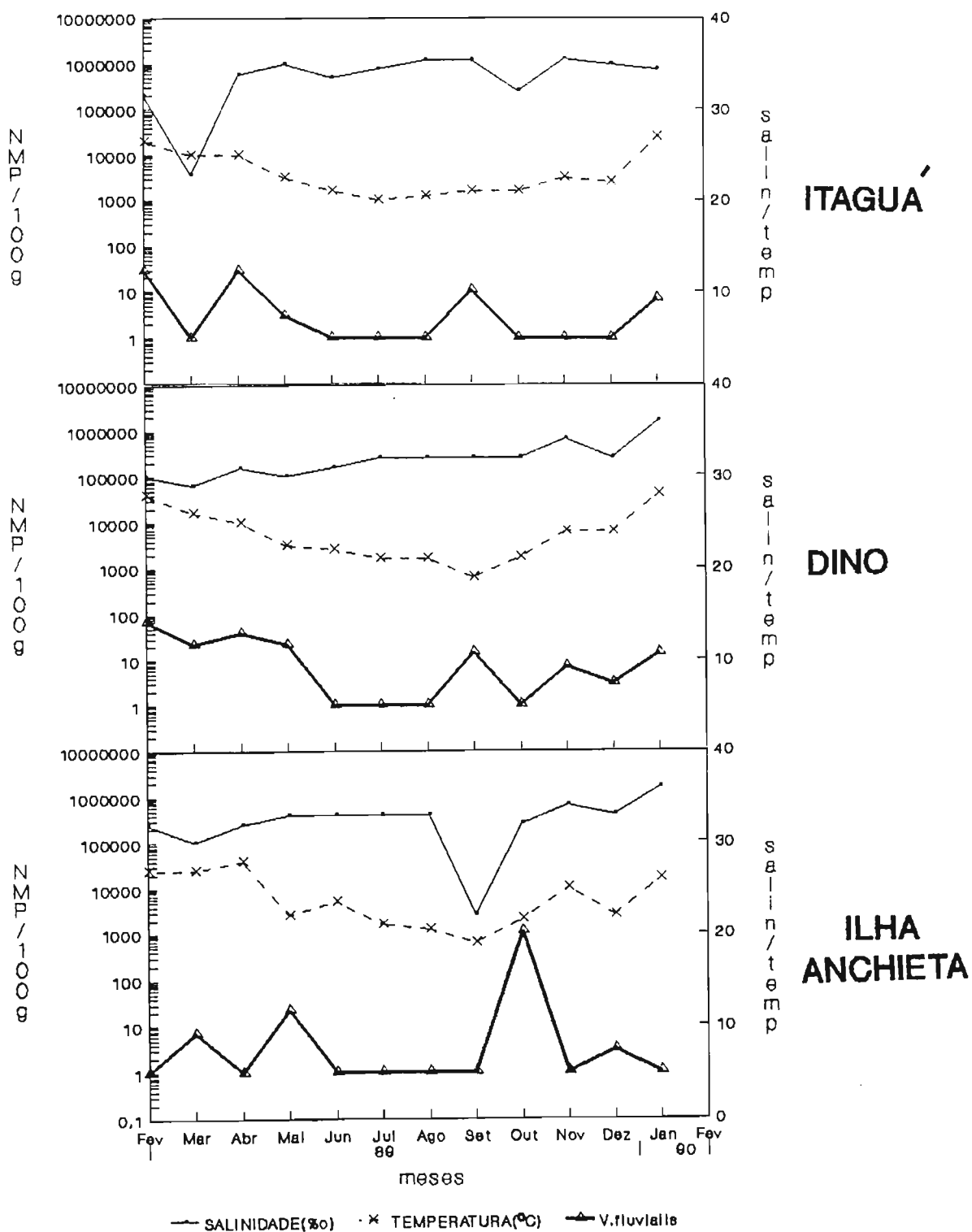


Figura 22. Porcentagem de amostras que atendem aos padrões Brasileiros para coliformes fecais em mexilhões e água do mar, segundo o local de colheita.

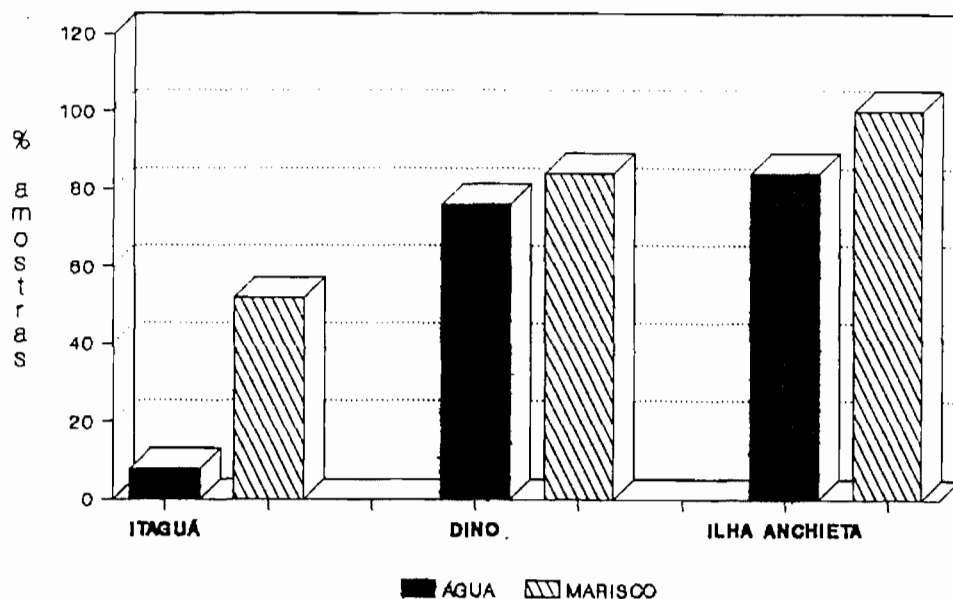


Figura 23. Porcentagem de amostras que atendem aos padrões Brasileiros para coliformes fecais em mexilhões e água do mar, segundo o tipo de amostra.

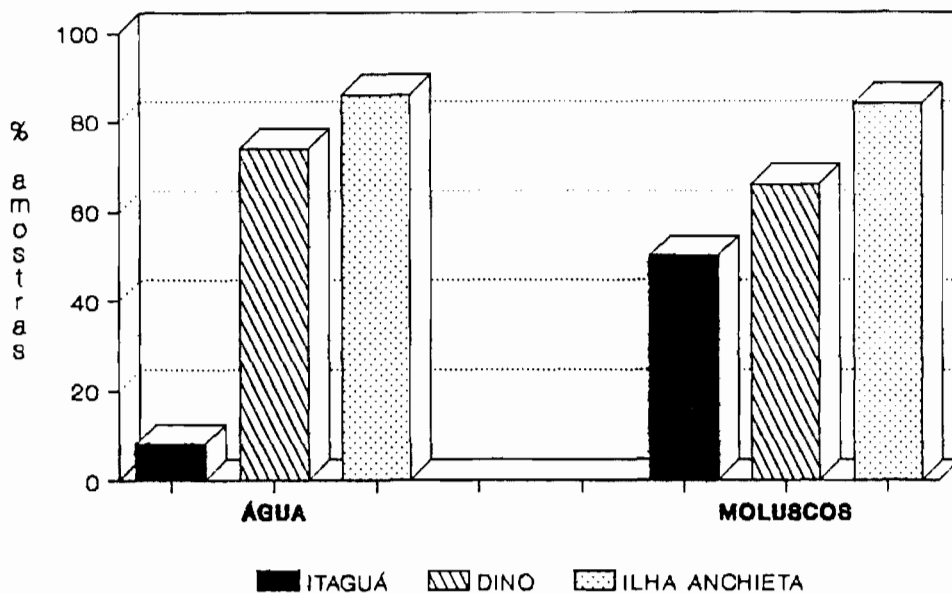
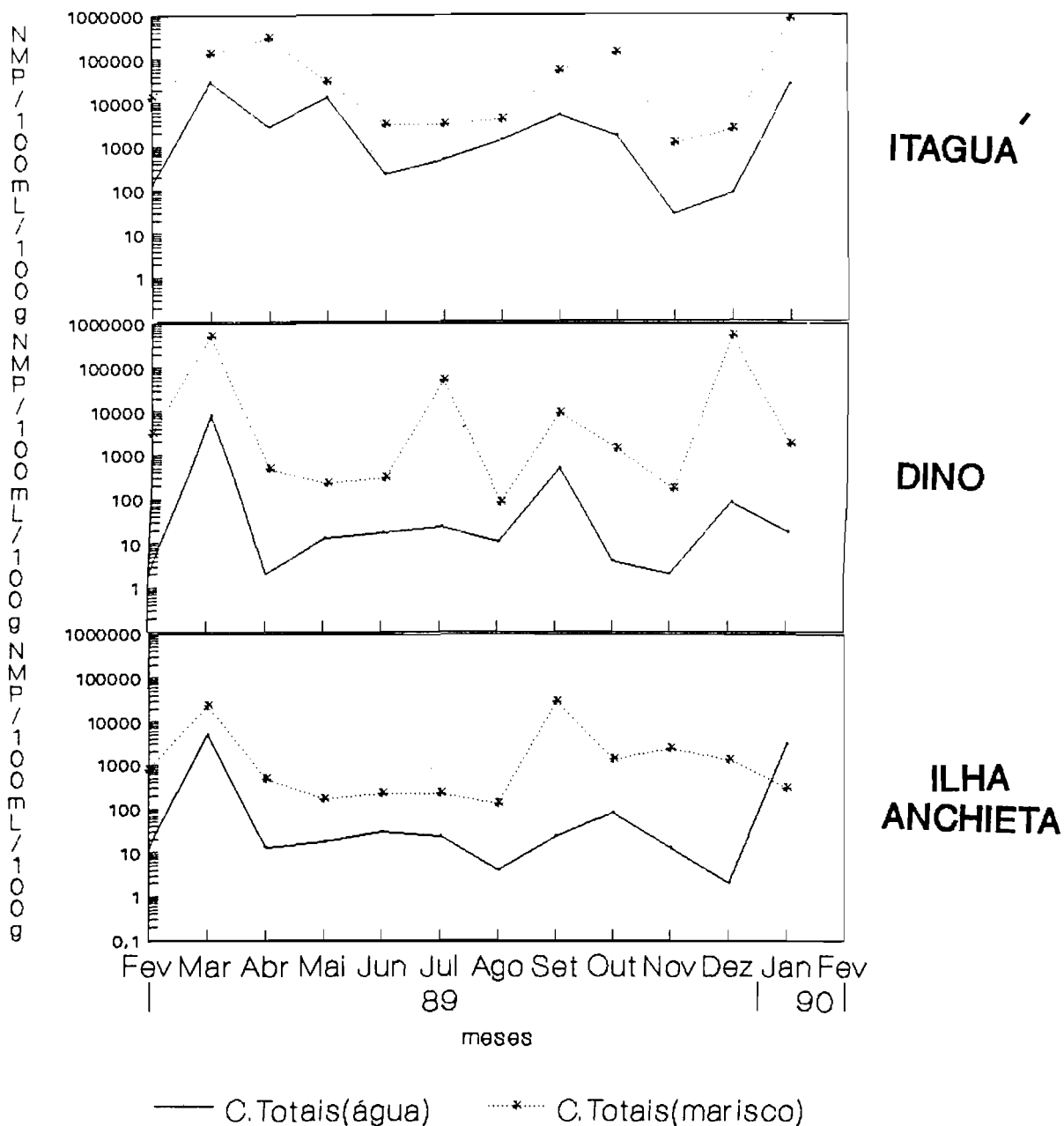
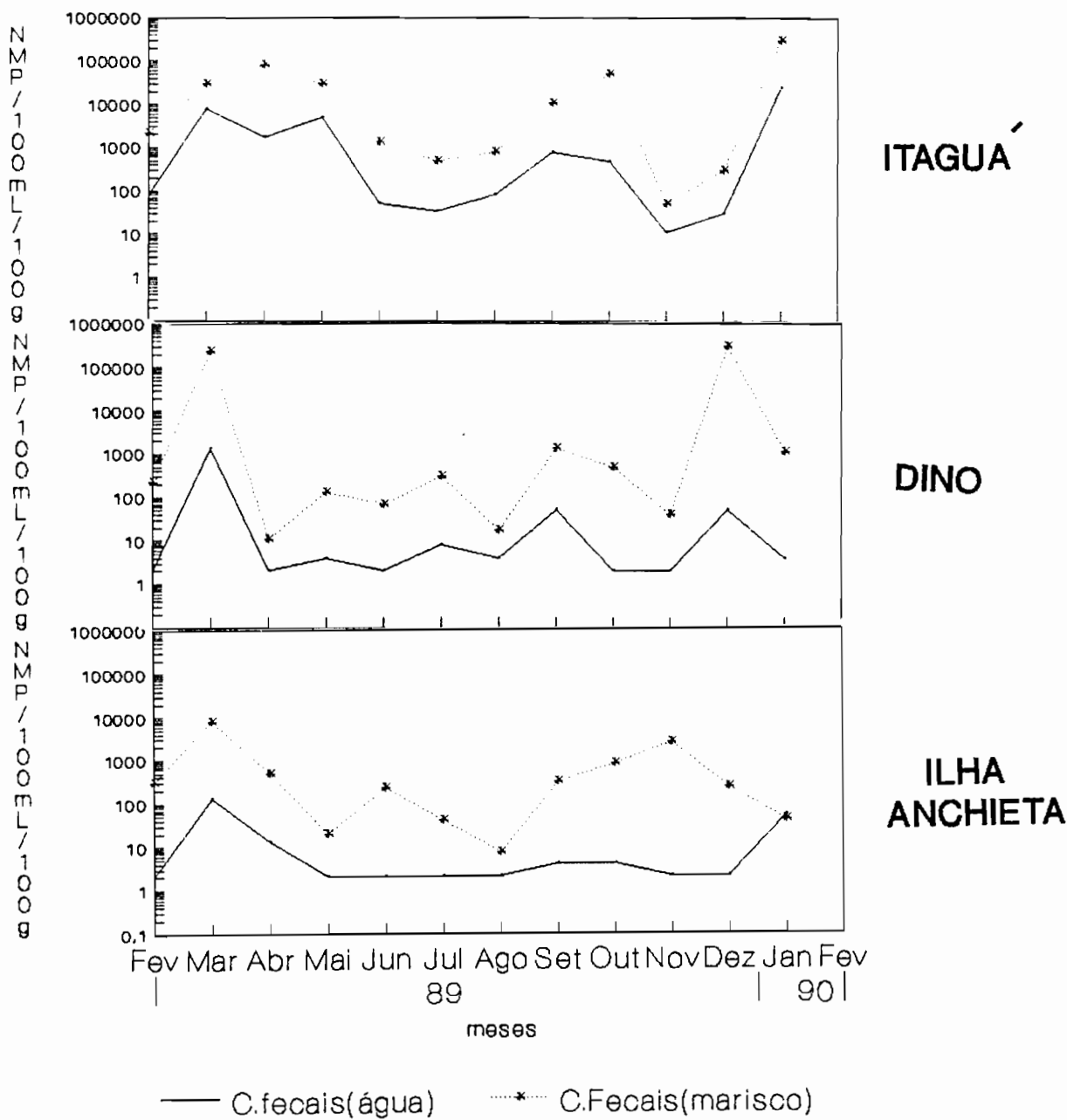


Figura 24. Número estimado de coliformes totais da água (NMP/100ml) e mexilhões (Perna perna) (NMP/100g) colhidos durante o período de Fevereiro/89 a Janeiro/90. Enseada de Ubatuba, Itaguá; Enseada do Flamengo, Dino; e Enseada das Palmas, Ilha Anchieta, Ubatuba-SP.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Figura 25. Número estimado de coliformes fecais da água (NMP/100ml) e mexilhões (*Perna perna*) (NMP/100g) colhidos durante o período de Fevereiro/89 a Janeiro/90. Enseada de Ubatuba, Itaguá; Enseada do Flamengo, Dino; e Enseada das Palmas, Ilha Anchieta, Ubatuba-SP.



4.3. Ensaio de virulência em modelo animal.

Os resultados dos testes de alça ligada em coelhos e teste de Dean, segundo as diferentes espécies de vibrios isoladas e as amostras de ostras e mexilhões, estão apresentados na Tabela 18.

As figuras 26 e 27 apresentam os percentuais de positividade dos testes efetuados segundo a origem de onde foram isoladas as amostras (ostras e mexilhões). O Figura 28 apresenta os resultados considerando a totalidade das amostras (ostras mais mexilhões). A figura 29 mostra que em relação a *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis* e *V. cholerae* não O:1, se forem considerados ambos os testes concomitantemente, ou seja positividade em pelo menos um dos testes, o percentual aumenta para 39,5%, 64,6% e 58,3% respectivamente.

Das 218 amostras de vibrios testadas 58 (26,6%) foram positivas para o teste de Dean, 15 (6,9%) apresentaram acúmulo de fluido em alça ligada de coelho entre 0,25 ml/cm e 0,49 ml/cm, 34 (15,6%) entre 0,50 e 0,99 ml/cm e 33 (15,1%) igual ou superior a 1,00 ml/cm.

De 8 amostras(4 isoladas de ostras e 4 de mexilhões) de *V. vulnificus* (presuntivamente identificadas) submetidas ao teste de virulência em camundongos, 2 (25%), das isoladas de ostras, revelaram-se positivas, as quais mataram 80% e 100% dos camundongos, respectivamente.

4.4. Teste de Kanagawa

Das 477 cepas de *V. parahaemolyticus* isoladas submetidas ao teste de Kanagawa, 3 (0,63%) delas, sendo uma procedente de amostra de ostra 2 de diferentes amostras de mexilhões, apresentaram beta-hemólise.

TABELA 18. Resultados dos testes de alça ligada de íleo de coelho e de Dean em filtrado de cultura realizados com espécies de vibrios isoladas de ostras (*Crassostrea gigas*) e mexilhões (*Perna perna*).

Espécie	Origem	Nº de amostras testadas	No de amostras/ variação de acúmulo de fluido em mL/ cm de alça	Teste de Dean
<i>V. parahaemolyticus</i>	ostra	16	2/ 0,25-0,49	0
			2/ 0,50-0,99	0
			1/ 1,00-1,50	0
	mexilhão	75	8/ 0,50-0,99	3
			6/ 1,00-1,50	1
			0	17
<i>V. cholerae</i> não O:1	ostra	10	5/ 0,50-0,99	1
			1/ 1,00-1,50	0
			0	2
	mexilhão	14	2/ 0,50-0,99	1
			3/ 1,00-1,50	2
			0	1
<i>V. fluvialis</i>	ostra	12	1/ 0,25-0,49	0
			3/ 0,50-0,99	1
			2/ 1,00-1,50	1
			0	1
	mexilhão	67	9/ 0,25-0,49	2
			11/ 0,50-0,99	6
			13/ 1,00-1,50	8
			0	11
<i>V. furnissii</i>	ostra	4	2/ 0,25-0,49	0
<i>V. mimicus</i>	ostra	6	1/ 0,25-0,49	0
			1/ 0,50-0,99	0
			2/ 1,00-1,50	0
	mexilhão	5	1/ 0,50-0,99	0
			2/ 1,00-1,50	0
<i>V. vulnificus</i>	ostra	6	3/ 1,00-1,66	0
	mexilhão	3	1/ 0,50-0,99	0

Figura 26. Porcentagem de cepas isoladas de ostras disponíveis para comércio, positivas para testes de virulência (teste de Dean e de alça ligada em íleo de coelho).

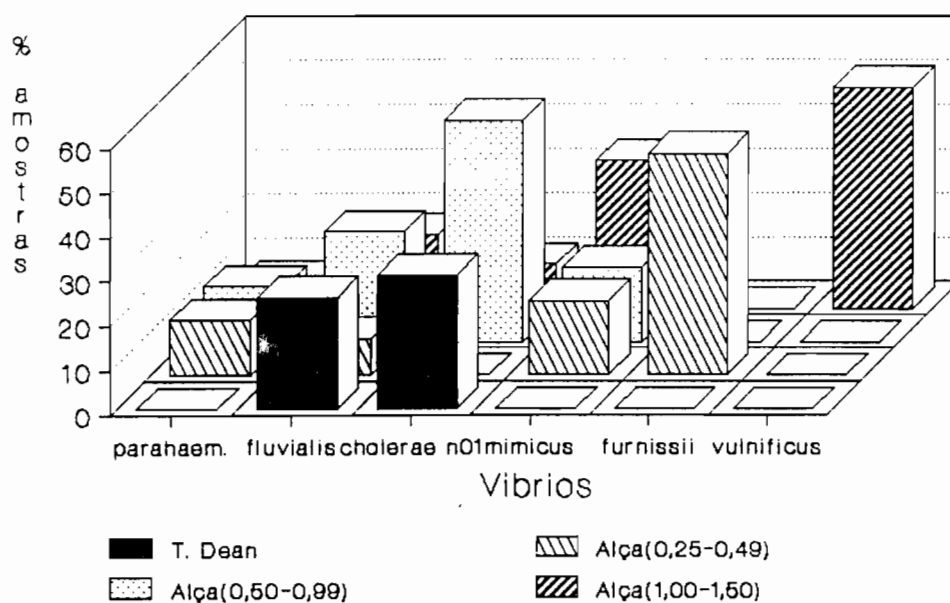


Figura 27. Porcentagem de cepas isoladas de mexilhões (*Perna perna*) colhidos no litoral de Ubatuba-SP., positivas para testes de virulência (teste de Dean e de alça ligada em íleo de coelho).

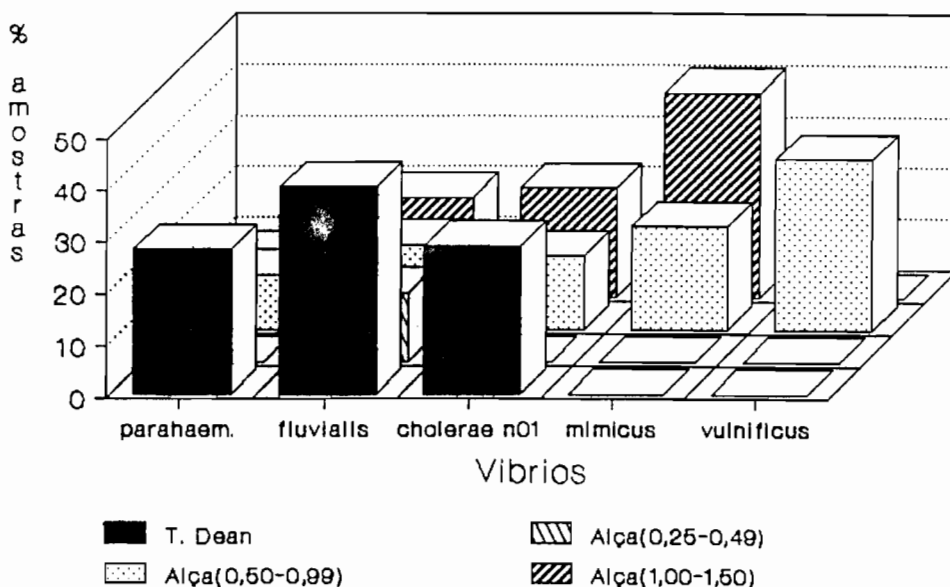


Figura 28. Porcentagem de cepas isoladas de ostras (*Crassostrea gigas*) e mexilhões (*Perna perna*) colhidos no litoral de Ubatuba-SP., positivas para testes de virulência (teste de Dean e de alça ligada em íleo de coelho).

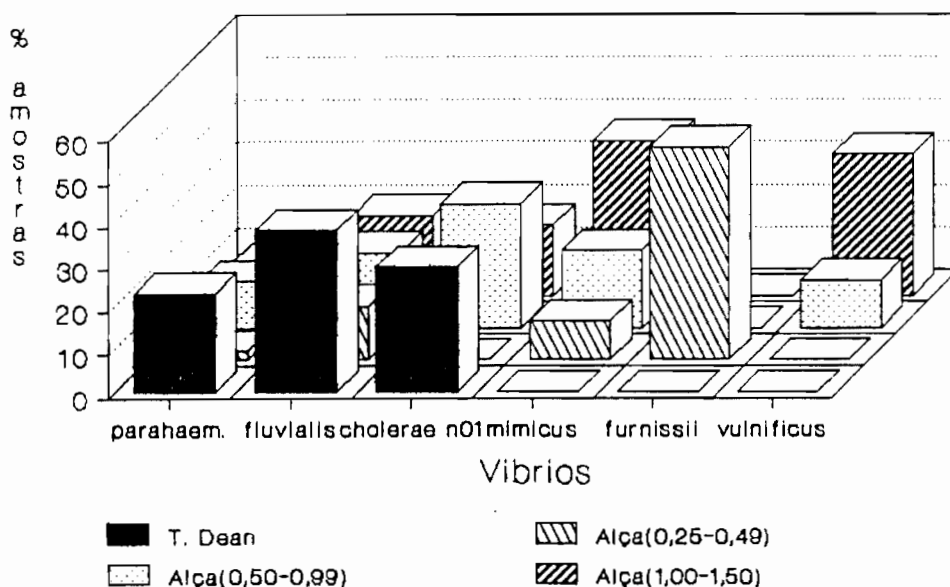
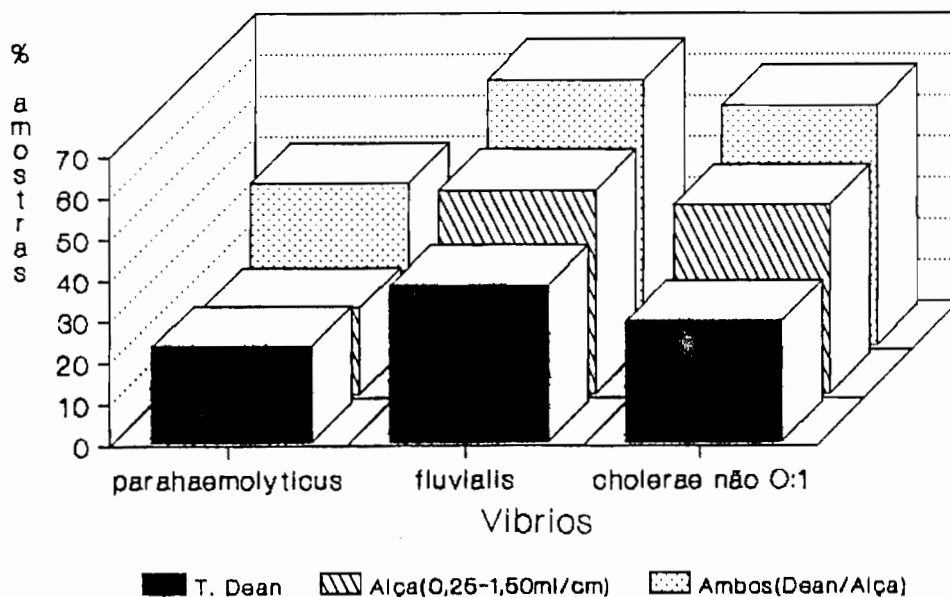


Figura 29. Porcentagem de cepas isoladas de ostras (*Crassostrea gigas*) e mexilhões (*Perna perna*) colhidos no litoral de Ubatuba-SP., considerando-se ambos os testes de virulência (teste de Dean e de alça ligada em íleo de coelho).



5. DISCUSSÃO

5.1. Incidência de vibrios potencialmente patogênicos nas amostras analisadas

Observou-se, nos mexilhões, de forma semelhante ao encontrado nas ostras, a existência de uma grande variedade de espécies potencialmente patogênicas, muitas delas presentes em um percentual elevado de amostras. Verificou-se ainda a coexistência na maioria das amostras de 2, 3 ou mais espécies (Figuras 6,7,11,15).

CHAN e col. (1986) estudando a distribuição de vibrios halofílicos em águas costeiras subtropicais de Hong Kong, China, encontraram *V. alginolyticus*, como o mais freqüentemente isolado, seguido pelo *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. campbellii* e *V. fluvialis*. Considerando-se as espécies potencialmente patogênicas que foram objeto desta pesquisa, observa-se que a distribuição encontrada por esses autores, foi muito semelhante à obtida no presente estudo (Figuras 6 e 11). Esta semelhança talvez seja em parte devida à similaridade do clima, ou seja, ambas as áreas são classificadas como subtropicais.

5.2. Aspectos específicos observados com relação às diferentes espécies de *Vibrio*

5.2.1. *Vibrio cholerae* O:1

Não foi isolado *V. cholerae* O:1 das amostras analisadas, entretanto, salienta-se que as coletas de moluscos bivalves para esta pesquisa, foram realizadas antes do início da atual epidemia de cólera no Brasil (fevereiro/89 a janeiro/90) e, portanto, durante ausência de situação epidêmica ou mesmo endêmica da doença.

A ocorrência de *V. cholerae* O:1 no ambiente aquático, em períodos interepidêmicos ou mesmo na ausência da doença tem sido observada (BRAYTON e col., 1987), entretanto nessas condições, esse microrganismo encontra-se em número reduzido e pode ocorrer em forma não cultivável pelos métodos habituais de cultura, necessitando provavelmente de fatores ambientais que favoreçam sua multiplicação, tais como a floração de zooplâncton quitinoso (WEST, 1989).

MARTINS (1988), relatou o isolamento de *V. cholerae* O:1 a partir de amostras de águas de esgotos, sendo que quatro cepas foram isoladas em Santos no anos de 1978 e 1983 e uma em São Sebastião no ano de 1980, e também outra cepa a partir de água de mar, isolada em São Lourenço, no

ano de 1983. Observa-se que os isolamentos ocorreram de amostras ambientais na ausência de casos da doença diagnosticados na população. A mesma autora e colaboradores (1993), relataram a detecção, por testes de imunofluorescência, de *V. cholerae* O:1, em águas da baixada Santista. *V. cholerae* O:1 não foi isolado pelos métodos convencionais de cultivo, porém foi evidenciado em elevados percentuais pela técnica de imunofluorescência.

Estas observações alertam para a necessidade de se continuar a estudar os aspectos ecológicos que envolvem a sobrevivência de *V. cholerae* O:1, no ambiente natural aquático e, em especial, com a utilização de técnicas mais aprimoradas para detectar este patógeno em sua "forma não cultivável". Também é importante conhecer melhor os fatores que favorecem sua multiplicação a níveis que possam representar doses infectantes necessárias para causarem a enfermidade.

A forma como a cólera vem se disseminando, tanto a nível de América do Sul como de Brasil, indica não apenas a alta capacidade de disseminação do agente mas, principalmente, as precárias condições sócio-econômicas e a inexistência de políticas efetivas que priorizem o saneamento básico (MARTINS, 1992). Haja visto que em países desenvolvidos a cólera também ocorre, porém assumindo um caráter mais esporádico (LOWRY e col., 1989).

Os estudos de MARTINS (1988), realizados vários anos antes da atual epidemia de cólera em nosso país, onde além das 5 cepas de *V. cholerae* O:1, muitas cepas de *V. cholerae* não O:1 também foram isoladas do ambiente aquático, já alertavam para a existência de condições favoráveis à ocorrência de *V. cholerae* O:1 em nosso ambiente, e portanto um elevado potencial para a existência de cólera.

Salienta-se, também, as observações feitas por KAY e col. (1984) quando da ocorrência de um surto de gastroenterite devido a *V. cholerae* não O:1, ocorrido em Lima, Peru, que na época já alertavam para o profundo significado daquele relato, como o reconhecimento, na América do Sul, de condições capazes de possibilitar a manutenção de *V. cholerae*. Observou-se em janeiro de 1991 (CENTER FOR DISEASE CONTROL, MMWR, 1991), confirmando as previsões desses autores, o início de uma "epidemia explosiva" de cólera no Peru, que alastrou-se por vários países da América do Sul, inclusive o Brasil.

5.2.2. *V. cholerae* não O:1

Observou-se que o percentual de amostras de ostras positivas para *V. cholerae* não O:1 (31%) foi maior que os encontrados nas amostras de mexilhões colhidas na Enseada de Ubatuba (ausente), Enseada do Flamengo (8%) e Enseada das Palmas (8%). Essa diferença, mesmo sendo em outra espécie de

molusco bivalve, levanta a hipótese de que sua sobrevivência ou mesmo multiplicação, possam ser favorecidas pelas condições em que as ostras são habitualmente comercializadas, ou seja, na maioria das vezes expostas à temperatura ambiente. Esta observação sugere que a forma de estocagem possa representar risco à saúde, o que é coerente com o fato de que muitos casos e surtos de gastroenterites devidos a esse microrganismo foram associados ao consumo de ostras cruas (DEGEROME & SMITH, 1974; WILSON e col., 1981; PIERGENTILI e col., 1984).

Outra hipótese possível para essa observação, é a de que, quando esse molusco é retirado do seu ambiente natural (salino) para consumo, a sobrevivência das espécies de vibrio que são halofílicas são desfavorecidas, permitindo que a microbiota competidora não halofílica, incluindo o *V. cholerae* não O:1, seja favorecida. Esta hipótese é coerente, uma vez que na presente investigação foram encontrados vibrios halofílicos (*V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus*), em números consideravelmente maiores nas amostras de mexilhões (Tabelas 10, 11 e 12) que nas amostras de ostras (Tabela 6).

HADDOCK e col. (1985) pesquisando amostras de mariscos provenientes das Filipinas, encontraram 26,3% de amostras positivas para *V. cholerae* não O:1. Este resultado

é semelhante ao obtido no presente trabalho (31%), em ostras disponíveis para comercialização.

KAYSNER e col. (1987a), estudando mariscos coletados na costa Oeste do Estados Unidos, para presença de *V. cholerae* não O:1, encontraram 6,1% de amostras positivas, valor este que se apresenta próximo aos percentuais obtidos nas amostras colhidas na Enseada de Ubatuba (8%) e Enseada do Flamengo (8%).

KAISNER e col. (1987a) isolaram *V. cholerae* não O:1 de águas com temperatura variando de 9 a 31°C. TISON e col. (1986) isolaram *V. cholerae* não O:1 de moluscos bivalves de águas com temperaturas variando entre 11 e 19°C. VENKATESWARAN e col. (1989) não detectaram *V. cholerae* não O:1 nos meses de inverno quando a temperatura da água caiu abaixo de 11°C, no ambiente marinho e abaixo de 7°C em água doce. Na presente investigação, a temperatura da água, registrada no momento da colheita, foi igual ou superior a 19°C (Tabela 13), sendo portanto favorável à sobrevivência desse microrganismo.

KAISNER e col. (1987a), isolaram *V. cholerae* de águas com salinidade variando de 0 a 35,6‰, com frequência de isolamentos aparentemente não relacionada com a salinidade. VENKATESWARAN e col. (1989a), isolaram *V. cholerae* não O:1 em ambientes com salinidade variando entre

0,4 e 32,5%. Na presente pesquisa, nos pontos onde foram coletados os mexilhões, a água apresentava salinidade variando entre 22‰ e 36‰ (média 32‰)(Tabela 13). Este nível de salinidade, apesar de relativamente elevado, não impediu o isolamento desse microrganismo.

O isolamento desse agente é relatado, com frequência, em regiões onde a cólera é endêmica ou durante epidemia de cólera, onde além dos casos devidos a *V. cholerae* O:1, são também observados casos de diarreia devidos a *V. cholerae* não O:1 (ZAFARI e col., 1973). Esta bactéria tem sido também isolada com frequência de pacientes atendidos em hospitais que rotineiramente empregam metodologia específica para isolamento de vibrios nas fezes (MCINTYRE e col., 1965; MOYENUDDIN e col., 1987; CASALINO e col. (1988). É possível que a pequena casuística relacionada a esse microrganismo no Brasil, deva-se à inexistência de metodologia específica na rotina dos laboratórios de análises clínicas.

É possível que, em vista da atual epidemia de cólera, iniciada em janeiro/1991, no Peru, a qual rapidamente alcançou o Brasil tendo levado vários laboratórios em nosso país a implantar metodologia específica para isolamento de *V. cholerae* O:1 nas fezes, venha-se a observar um aumento de diagnóstico de casos por *V. cholerae* não O:1. Entretanto, é importante alertar os

profissionais de saúde em nosso País, principalmente os que atuam na área de laboratório, que vibrios com características fenotípicas de *V. cholerae* e que não aglutinam com o antisoro contra o antígeno somático O:1 (*V. cholerae* não O:1), também podem causar gastroenterite.

5.2.3. *Vibrio mimicus*

CHOWDHURY e col. (1989) pesquisando *V. mimicus* obtiveram contagens que variavam de 10 a $9,0 \times 10^2$ UFC/100ml em água de rio e de 0 a 125 UFC/100ml em água de lago. As amostras que foram analisadas nesta pesquisa (ostras e mexilhões) apresentaram contagens que variaram de 0 a 40/100g de amostra.

KAISNER e col. (1987a) encontraram *V. mimicus* em 2,3% das amostras de água, sedimento e moluscos analisadas. Neste estudo esse microrganismo foi encontrado em 12% das amostras de ostras e em 6% das amostras de mexilhões.

5.2.4. *Vibrio parahaemolyticus*

Os percentuais de isolamento de *V. parahaemolyticus* obtidos a partir de amostras de ostras (77%) e de mexilhões (75%) foram superiores aos encontrados por MONSREAL & ABUXAPQUI (1989) (11,5%) e próximos aos

encontrados por MOLITORIS e col. (1985) (72%) a partir de amostras de alimentos de origem marinha crus.

Comparativamente a alguns trabalhos realizados no Brasil, obtivemos percentual de isolamento de *V. parahaemolyticus* a partir de amostras de ostras (77%) e de mexilhões (75%) superiores aos encontrados por FRANCA e col. (1980) de amostras de peixes (5%) e mariscos (19%), e próximos aos obtidos por BARROS & VIANNI (1980) (61,6%) de amostras de água.

As maiores contagens de *V. parahaemolyticus* obtidas por CHAN e col. (1989), a partir de amostras de alimentos marinhos coletados em mercados de Hong Kong, foi de $460 \times 10^4/100g$ para mexilhões e de $340 \times 10^4/100g$ para ostras. No presente estudo as maiores contagens obtidas para esse microrganismo foram de $1,2 \times 10^3/100g$ de ostras e de $24 \times 10^3/100g$ de mexilhões.

Observou-se que na Enseada de Ubatuba, ponto que apresentou os maiores números de coliformes (área mais poluída por esgotos), os maiores números de *V. parahaemolyticus* (média: 6.062/100g / mediana: 140/100g) em relação ao obtido na Enseada do Flamengo (média: 31/100g / mediana: 10/100g) e na Enseada das Palmas (média: 24/100g / mediana: 4/100g) (Figura 20). WHATKINS & CABELLI, 1985 relataram que efluentes de esgoto tem uma influência

indireta sobre o número de *V. parahaemolyticus*, provavelmente mediada por bioestimulação da cadeia alimentar e manifestada ao nível de microfauna.

KUMAZAWA & KATO (1985) referem como temperatura crítica para o reaparecimento de *V. parahaemolyticus*, 16°C no sedimento e 20°C em moluscos e água, pois tem sido relatado que, em temperaturas baixas os vibrios parecem permanecer no meio ambiente em forma "latente" porém não são isolados em meios de cultura específicos. KANEKO & COLWELL (1973), verificaram que 10°C é a temperatura mínima para multiplicação de *V. parahaemolyticus* no ambiente natural aquático, porém o seu crescimento foi visivelmente reduzido em temperaturas iguais ou inferiores a 15°C.

Na presente pesquisa, as temperaturas registradas na água, no momento da coleta dos mexilhões, foram sempre iguais ou superiores a 19°C, com média de 23°C (Tabela 13), o que certamente deve ter favorecido a sobrevivência desse microrganismo durante todas as épocas do ano, não apresentando relação sazonal, como a observada em países de clima frio, como por exemplo no Canadá (KELLY & STROH, 1989).

Espécies de vibrios com características halofílicas, ocorrem mais freqüentemente com a salinidade da água variando de 5‰ a 30‰ (KAISNER e col., 1987). No

presente estudo observou-se uma salinidade média de 32‰(Tabela 13), a qual revelou-se um pouco acima da faixa ideal mencionada por este autor. Mesmo assim, isolou-se *V. parahaemolyticus* em elevado percentual das amostras pesquisadas (Figuras 6 e 11).

A sobrevivência de *V. parahaemolyticus* em alimentos de origem marinha escaldados (4,5%), detectada por MONSREAL & ABUXAPQUI (1989), e a elevada ocorrência desse microrganismo neste estudo, que foi de 77% em amostras de ostras e 75% em mexilhões, sugerem que o cozimento desses alimentos deva ser efetuado de forma completa.

5.2.5. *Vibrio fluvialis*

Observou-se maiores números de *V. fluvialis* (NMP entre <3 e 1100/100g; média de 94/100g)(Tabela 12) na Enseada das Palmas (local menos afetado por esgotos) que na Enseada do Flamengo (NMP entre <3 e 70/100g; média de 16/100g)(Tabela 11) e na Enseada de Ubatuba (NMP entre <3 e 30/100g; média de 6/100g)(Tabela 10). Sua maior densidade no ponto menos poluído, sugere sua maior dificuldade em sobreviver em áreas com maior quantidade de poluentes, provavelmente em função de dificuldade em competir com os demais microrganismos que se adaptam melhor a essas condições. Esta observação foi inversa à obtida com relação ao *V. parahaemolyticus*.

V. fluvialis não foi detectado em nenhum dos três pontos nos meses de junho, julho e agosto, sugerindo maior sensibilidade que os demais vibrios a temperaturas mais baixas. Os resultados são concordantes com os de BOCKENMUHL e col. (1986), que relatam uma sensibilidade acentuada desse microrganismo à climas frios.

Os poucos relatos sobre sua ecologia, descrevem a existência de baixos números em águas quentes (SCHANDEVYL e col., 1984; CHAN e col. 1986 e 1989) sendo raramente encontrado em climas frios (BOCKENMUHL e col., 1986). Entretanto, no presente estudo, os resultados apontam para a existência de números relativamente superiores. Detectou-se *V. fluvialis* em 27% das amostras de ostras (Figura 6) e em 47% das de mexilhões (Figura 11).

É possível, que a elevada ocorrência de *V. fluvialis* observada neste estudo, se deva a pequena variação da temperatura da água, que em nenhuma das determinações foi inferior a 15°C ou excedeu 30°C, ou mesmo da salinidade que foi favorável a presença de vibrios halofílicos.

5.2.6. *Vibrio alginolyticus*

O elevado número de *V. alginolyticus* presentes tanto em mexilhões como em ostras indica, provavelmente, um número elevado desta bactéria na coluna d'água. O maior

número encontrado nos mexilhões (média: 6961/100g / mediana: 1100/100g) em relação às ostras (média: 180/100g / mediana: 70/100g), sugere que a estocagem desfavorece a sobrevivência dessa espécie halofílica.

MOLITORIS e col. (1985) isolaram *V. alginolyticus* em 68% das amostras de alimentos marinhos analisadas. No presente estudo, esse microrganismo foi isolado em 81% das amostras de ostras e em 97% das de mexilhões (Figuras 6 e 11)

Até o momento não foi observado em *V. alginolyticus* a existência de mecanismos que demonstrem capacidade invasiva, como é observado em *V. vulnificus*.

Apesar dos elevados números de *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus* tanto em mexilhões como em ostras, não se observou correlação entre essas duas espécies (Tabelas 14, 15 e 16), o que desaconselha o uso desse microrganismo como indicador da presença de *V. parahaemolyticus*.

Da mesma forma que o observado para *V. parahaemolyticus* não se observou variação sazonal de *V. alginolyticus* com temperatura (Tabelas 14, 15 e 16, Figuras 19), o que é mais uma evidência de que a ocorrência de vibrios potencialmente patogênicos em regiões sub-tropicais, pode se dar em todas as épocas do ano.

A salinidade talvez seja o principal fator que permita a manutenção de *V. alginolyticus* em elevados números, pois este microrganismo pode crescer na presença de concentrações elevadas de cloreto de sódio. A salinidade média de 32‰(Tabela 13) observada nos pontos onde foi isolado, favoreceu, principalmente, os microrganismos com características halofílicas.

Considerando-se que *V. alginolyticus* é um patógeno oportunista e que os estudos sobre sua colonização têm demonstrado que existe associação com algum traumatismo, ou com algum fator predisponente, principalmente nos casos de infecção de ouvido (OPAL & SAXSON, 1986; DALTON e col., 1986; PATTERSON e col., 1988), é aconselhável que pessoas que tenham lesões de pele ou problemas crônicos de ouvido, evitem banhar-se em água do mar.

Tendo em vista sua ubiqüidade, e seu caráter oportunista, é aconselhável que pescadores ou pessoas que manipulam freqüentemente pescado, adotem medidas de proteção individual, como uso de luvas, para evitar ferimentos que venham a favorecer a ocorrência de infecção.

5.2.7. *Vibrio hollisae*

A dificuldade de isolamento de *V. hollisae* devido à impossibilidade de seu crescimento em ágar TCBS (MORRIS JR. & BLACK, 1985), provavelmente, tenha sido a causa da não detecção desse microrganismo a partir das amostras. As escassas informações sobre sua ecologia (WEST, 1989), requerem estudos específicos para que se possa conhecer melhor sua distribuição no ambiente.

5.2.8. *Vibrio metschnikovii*

O fato de ter sido usada a prova de oxidase como triagem, impossibilitou o isolamento desse microrganismo, que é a única espécie do gênero *Vibrio* que não produz citocromo oxidase. Entretanto observou-se que a maioria das cepas que apresentavam características presuntivas de *Vibrio* no meio de Kligler Iron Ágar eram oxidase positivas. Mesmo que *V. metschnikovii* estivesse presente, seu número deveria ser muito pequeno. VENKATESWARAN e col. (1989b), isolaram esse vibrio com elevada frequência de água de rio, porém estava ausente em água de estuário, sugerindo que esta bactéria não halofílica, sobrevive melhor em água doce.

5.3. Aspectos relativos à dificuldade de isolamento de algumas espécies de vibrios potencialmente patogênicos

O pouco conhecimento sobre a ecologia de *V. damsela* e *V. cincinnatiensis*, recentemente descritos (WEST, 1989), não permite analisar se o não isolamento desses microrganismos das amostras estudadas, ocorreu em função da inadequação do meio de isolamento utilizado, por dificuldade devida à competição com outros microrganismos, ou se ocorrem em outros substratos.

CORTÉS & ANTILLÓN (1990), pesquisando vibrios enteropatógenos em moluscos bivalves, no Golfo de Nicoya, Costa Rica, relataram dificuldades no isolamento dos demais vibrios patogênicos em função do supercrescimento de *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus*. Apesar de termos isolado uma grande variedade de vibrios patogênicos de grande percentual das amostras, observou-se fato semelhante ao relatado por estes autores, pois foi também verificado intenso crescimento de *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus* nas placas de TCBS. Estas observações sugerem a existência de um número de patógenos ainda maior que o constatado, e também a necessidade de utilização de meios mais específicos para outros vibrios.

5.4. Aspectos relativos à virulência

Os resultados dos testes de virulência vem confirmar o elevado potencial patogênico que estas espécies de *Vibrio* apresentam, o que de certa forma justifica o aumento de relatos de casos e surtos de doenças causadas por esses agentes observado nos últimos anos.

Outro aspecto importante a ser considerado é que a demonstração não só da presença, como também do potencial patogênico desses microrganismos em nosso meio, implicam na necessidade de se conhecer melhor seus mecanismos de virulência, visto a complexidade que o tema apresenta. Um conjunto de fatores podem estar envolvidos, tais como, enterotoxinas, citolisinas, hemolisinas, mecanismos de adesão, entre outros, o que torna necessária a aplicação concomitante de outros métodos, como por exemplo, testes com linhagens celulares, isolamento e caracterização dessas toxinas através de técnicas cromatográficas e eletroforéticas e também estudos moleculares.

5.4.1. *V. cholerae* não O:1

Foram obtidos 11 (46%) positivos em 24 amostras de *V. cholerae* não O:1 testadas em alça ligada de coelho (0,5 - > 1,00 ml/cm)(Tabela 18). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por SINGH & SANYAL (1978) a partir de

amostras obtidas de animais domésticos (45%), e aos encontrados por DATTA-ROY e col. (1986), a partir de isolados clínicos (45,8%). O mesmo percentual foi superior ao encontrado por DATTA-ROY e col. (1986) (20%) e por NAIR e col. (1988) (36%) para amostras ambientais, e inferior ao obtido por SINGH & SANYAL (1978) e OHASHI e col. (1972) para amostras isoladas de humanos (75% e 100% respectivamente) e de água e esgoto (64%) e por JESUDASON e col. (1991) (62,5%), para amostras isoladas de humanos.

O teste de Dean das amostras de *V. cholerae* não O:1 revelou 7 (29,2%) positivas. Este percentual foi maior do que o observado por MARTINS (1988) (10%) a partir de amostras isoladas de ambiente aquático (água do mar, água doce e águas de esgotos).

Os resultados do teste de alça ligada de íleo de coelho e teste de Dean para as cepas isoladas de *V. cholerae* não O:1 demonstram o potencial enterotoxigênico dessas cepas, o que alerta para um possível risco à saúde do consumidor, principalmente considerando que ostras são habitualmente ingeridas cruas.

Alguns estudos (SINGH & SANYAL, 1978) demonstraram que amostras de *V. cholerae* não O:1, mesmo de fontes ambientais, inicialmente negativas para o teste de alça

ligada, após sucessivas passagens em alça ligada (1 a 2 vezes) passou a provocar acúmulo de fluido.

É possível que outros fatores, não determinados neste estudo, porém detectados por outros autores, possam estar relacionados à virulência. Entre esses fatores podemos citar a produção de hemolisinas (HONDA e col., 1985 e 1986; MCCARDEL & MADDEN, 1985; DATTA-ROY e col., 1986; NAIR e col., 1988), citotoxicidade (MCCARDEL & MADDEN, 1985; BARJA e col., 1990), letalidade para camundongos (KAROLCEK e col., 1974) e atividade hemaglutinante (BARJA e col., 1990).

5.4.2. *V. mimicus*

CHOWDHURY e col. (1987), observaram acúmulo de fluido em alça ligada de íleo de coelho em 24,8% das amostras de *V. mimicus* isoladas de ambiente, 73,7% das amostras de casos clínicos e em 75% das amostras de lagostin. Detectaram também em uma amostra ambiental, uma enterotoxina semelhante à ST pelo teste em camundongos lactentes. No presente estudo, não foi detectada nenhuma amostra, tanto proveniente de ostras como mexilhões, positiva para o teste de Dean. Entretanto, para o teste de alça ligada de íleo de coelho foi observado acúmulo de fluido (variando de 0,25 a 1,50 ml/cm de alça) em 66% das amostras provenientes de ostras, e em 60% (variando de 0,50

a 1,5 ml/cm de alça) das amostras provenientes de mexilhões (Tabela 18).

5.4.3. *V. parahaemolyticus*

As amostras de *V. parahaemolyticus* submetidas ao teste de Kanagawa revelaram que 0,6% eram positivas. Esse resultado é semelhante ao observado por outros autores, que estudaram amostras de origem ambiental, em que, 1% ou menos apresentavam esse teste positivo (MORRIS JR. & BLACK, 1985).

PACE & CHAI (1989) estudando comparativamente amostras de *V. parahaemolyticus* com fator de Kanagawa positivo e negativo, observaram que as mesmas eram estreitamente relacionadas, porém apresentavam diferenças fisiológicas, quando submetidas à privação de nutrientes. Consideraram plausível que células Kanagawa positivas pudessem entrar em forma viável, mas não cultivável, mais facilmente quando confrontadas com condições nutricionais adversas, tais como aquelas encontradas em águas de estuário. Sugeriram que amostras patogênicas devam ser mais comuns no ambiente, e que os procedimentos de isolamento em uso possam perdê-las. Estas observações talvez possam explicar o pequeno percentual de cepas Kanagawa positivas (0,6%) observadas neste estudo.

O recente isolamento e caracterização de hemolisinas relacionadas a Vp-TDH, a partir de amostras de *V. parahaemolyticus* Kanagawa negativas (HONDA e col., 1989b e 1991) evidenciam que não só as amostras Kanagawa positivas, mas também as Kanagawa negativas apresentam potencial patogênico.

5.4.4. *V. fluvialis*

O alto percentual de amostras de *V. fluvialis* positivas para o teste de Dean (38%) e teste de alça ligada em coelhos jovens (12,6% entre 0,25 e 0,49 ml/cm; 17,7% entre 0,50 e 0,99 ml/cm e 19% entre 1,00 e 1,50 ml/cm), demonstrou um elevado potencial desses microrganismos em causar acúmulo de fluido em intestino e portanto causar gastroenterite. SEIDLER e col. (1980), observaram a participação de toxinas que causam acúmulo de fluido em alça ileal ligada de coelho e em camundongos lactentes.

Observou-se a presença de acúmulo de fluido hemorrágico em 64,1% dos testes de alça ligada de coelho positivos, realizados com as cepas de *V. fluvialis*, o que sugere a participação de citolisinas e hemolisinas.

O resgistro, no Recife, por MAGALHÃES e col.(1990), dos primeiros casos de diarréia infantil por *V. fluvialis* no Brasil, pode ser um indicativo de sua

predileção por temperaturas mais elevadas, ou mesmo da ocorrência mais associada a regiões costeiras, nas quais habitualmente ocorre maior contato com o ambiente marinho, e maior consumo de alimentos de origem marinha.

A ocorrência de *V. fluvialis* em ostras disponíveis para comercialização (27%), que são habitualmente ingeridas cruas, e considerando-se o relato de caso de gastroenterite associado ao consumo de ostras cruas (SPELLMAN e col., 1986), sugere que o consumo destes moluscos bivalves nestas condições, constitui-se em um elevado risco para adquirir gastroenterite.

5.5. Relação entre parâmetros ambientais e o isolamento de vibrios

5.5.1. Temperatura

Vibrios patogênicos são mais freqüentemente isolados em ambientes com temperaturas entre 10°C e 30°C (WEST, 1989).

A temperatura média de 23°C encontrada na água dos três pontos estudados em Ubatuba, apresenta-se dentro de um intervalo bastante favorável ao desenvolvimento de vibrios patogênicos (WEST, 1989). Este talvez seja um dos fatores que compensa a salinidade mais elevada (média de 32‰) em

relação à ocorrência de vibrios potencialmente patogênicos não halofílicos(Tabela 13).

Verificou-se que não houve correlação entre temperatura e a maioria das espécies de vibrios potencialmente patogênicos isolados, com excessão de *V. fluvialis* no ponto de Itaguá(Tabelas 14, 15, 16 e 17). A não observação de correlação sazonal pode ter sido devida às características sub-tropicais dessa região, onde, nos meses de inverno, não foram registradas temperaturas extremas, como as que acontecem em países de clima frio (KELLY & STROH, 1989; VENKATESWARAN e col., 1989b).

5.5.2. Salinidade

A salinidade superior a 30‰, classifica a água de onde os mexilhões foram colhidos, como salina (Resolução CONAMA n^o 20 de 18/06/1983). Isto ocorreu na maior parte do ano(Tabela 13), e é um fator ambiental que favorece a presença de espécies halofílicas tais como *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis* e *V. furnissii*.

A salinidade média de 32‰, apesar de ter favorecido a presença de espécies halofílicas, não impediu a ocorrência de vibrios não halofílicos, tais como *V. cholerae* não O:1 e *V. mimicus*. Observa-se entretanto que o percentual de amostras positivas e o número desses microrganismos são

muito inferiores do que os observados para a maioria dos vibrios halofílicos isolados (Figura 11 e Tabelas 7a, 7b, 8a, 8b, 9a e 9b).

5.5.3. Colimetria

As determinações de coliformes totais e fecais da água e dos moluscos colhidos nos três pontos de Ubatuba apresentaram alto nível de correlação entre si ($p < 0,001$). Entretanto, na maioria das vezes, esses indicadores não apresentaram correlação com os vibrios potencialmente patogênicos isolados (Tabelas 14, 15, 16 e 17), o que também foi observado por diversos autores (BLAKE e col., 1980; HOOD & NESS, 1982; TISON e col., 1986; MARTINS, 1988; PÉRES-ROSAS & HAZEN, 1988 e 1989), confirmando que essas espécies de vibrios ocorrem de forma autóctone nesses ambientes.

5.6. Desempenho dos meios de enriquecimento empregados

Nas amostras de mexilhões *V. cholerae* não O:1 foi isolado em maior percentual em água peptonada alcalina sem cloreto de sódio (8,3%) que em água peptonada alcalina com 1% de cloreto de sódio (2,8%) (Tabelas 7b, 8b e 9b). Entretanto nas amostras de ostras observou-se melhor desempenho da água peptonada alcalina com 1% de cloreto de sódio (15,4%) e mesmo de GSTB (15,4%), em relação à água

peptonada alcalina sem cloreto de sódio (7,7%) (Tabela 5). O enriquecimento sem cloreto de sódio foi empregado com a finalidade de inibir as espécies halofílicas de vibrios, de forma a favorecer o isolamento de *V. cholerae* não O:1. Este propósito parece ter sido alcançado nas amostras de mexilhões, entretanto não ocorreu com as amostras de ostras. Essa diferença pode ter ocorrido em função de que as ostras disponíveis para comercialização geralmente são deixadas expostas à temperatura ambiente, sendo que o tempo de estocagem pode ter favorecido a flora competidora não halofílica, uma vez que, nesta condição (fora do ambiente salino), as espécies halofílicas foram encontradas em números menores.

O GSTB apresentou desempenho inferior à água peptonada alcalina com 1% de cloreto de sódio em relação ao isolamento de *V. parahaemolyticus*, nas amostras de mexilhões, entretanto teve melhor desempenho nas amostras de ostras. Uma hipótese para este fato, seria a de que a mudança de ambiente das ostras, associada ao tempo de estocagem tenha favorecido o desenvolvimento de uma flora competidora, para a qual o GSTB tenha apresentado maior capacidade de inibição.

5.7. Aspectos relativos à legislação

Constatou-se que nas áreas mais próximas a locais onde há grande afluxo de pessoas, principalmente com finalidade de turismo, como, Enseada de Ubatuba e Enseada do Flamengo, o percentual de amostras de mexilhões e água que não atenderam aos padrões (Figuras 22 e 23) foi consideravelmente maior do que o ocorrido na Enseada das Palmas-Ilha Anchieta. Estes dados indicam claramente a necessidade de criação de áreas que sejam protegidas de contaminação por esgotos, para que possa efetivamente ser viabilizada a produção ou captura de moluscos bivalves, com menor risco para o consumo humano. Para isso seria necessária a criação de áreas de proteção ambiental, de forma a evitar acúmulo populacional em regiões próximas à costa, o que nos dias de hoje, não parece muito factível, pelo menos em locais onde há forte pressão imobiliária. Outra alternativa, seria o tratamento efetivo dos esgotos domésticos e industriais dessas áreas. Saliencia-se que nesse caso a construção de emissários submarinos não deve ser aconselhada, uma vez que todo esgoto é lançado *in natura* a uma certa distância da costa, o que certamente não irá garantir a qualidade da área para fins de maricultura.

Observou-se que os mexilhões analisados apresentavam invariavelmente maiores números de coliformes totais e fecais que na água (Figuras 24 e 25). Estes

resultados confirmam a capacidade desses moluscos bivalves em concentrar microrganismos. Esta propriedade dos moluscos bivalves alerta para a necessidade de observar-se com maior atenção as áreas onde eles são capturados ou cultivados.

Segundo o decreto n. 12.486, de 20/10/1978, da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, no que se refere às características gerais do pescado, os moluscos e bivalves devem ser expostos à venda vivos, com valvas fechadas e com retenção de grande quantidade de água incolor e límpida nas conchas. A carne deverá estar bem aderente à concha, deve ser úmida, de cor cinzenta clara nas ostras. As amostras de ostras analisadas apresentavam essas características, com exceção das congeladas, que estavam mortas e com as conchas parcialmente abertas.

Observou-se que a maior parte das ostras, no momento da comercialização, se mostravam expostas à temperatura ambiente. Sabe-se que, dependendo da localidade e da época do ano, pode-se ter temperaturas mais elevadas, típicas de clima tropical. A legislação estadual determina que as ostras sejam comercializadas vivas (Decreto n^o 12.486 - 20/10/78 - Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo). Alguns autores (HOOD e col., 1984; FLETCHER, 1985; REILY & HACKNEY, 1985; SAXENA & KULSHRESTHA, 1985; INGHAM & POTTER, 1988) recomendam que mariscos e outros alimentos marinhos crus devam ser mantidos em temperatura de refrigeração

(menos que 5°C) ou colocados no gelo imediatamente após a captura ou processamento para prevenir a multiplicação de microrganismos a números que possam causar doença. Considerando-se a falta de homogeneidade dos critérios existentes, sugere-se a reavaliação dos mesmos para certificar-se da melhor forma de conservação e estocagem desses moluscos.

Foi verificado que uma das amostras de ostras estava sendo conservada em água do mar. O proprietário da banca, mantinha as ostras penduradas dentro de um cesto no atracadouro de uma balsa, com o propósito de mantê-las viáveis por um período mais longo. Entretanto, nas margens do local foi constatado elevado número de residências e estabelecimentos comerciais que, provavelmente, estariam contribuindo para a contaminação fecal dessas águas pela população ali residente, mesmo porque não havia tratamento de esgoto naquele local. Este fato sugere a demanda de maior atenção por parte das autoridades sanitárias em relação às condições de comercialização desses moluscos.

A Portaria nº 001 de 28/01/1987 da DINAL (Divisão Nacional de Alimentos) determina que para moluscos crus comercializados *in natura* o número máximo de *V. parahamolyticus* seja de 5×10^3 /g, e para moluscos crus refrigerados ou congelados seja de 10^3 /g. Para as amostras analisadas, não se obteve em nenhuma oportunidade contagens

próximas a essas (Tabela 5, 7b, 8b e 9b). O número máximo proposto por essa Portaria, em vista das contagens que foram obtidas, nos parece muito elevado. Acredita-se que esses padrões devam ser reavaliados, porém torna-se difícil estabelecer, qual seria o limite seguro, uma vez que esse microrganismo é autóctone no ambiente marinho.

5.8. Aspectos de importância em saúde pública

Existe a necessidade de obtenção de melhor conhecimento sobre o grupo de microrganismos pesquisado, uma vez que até poucos anos atrás, somente *V. cholerae* O:1 era reconhecido como de significância em saúde pública. O presente trabalho contribui no sentido de esclarecer alguns aspectos da ocorrência desse grupo de patógenos potenciais em nosso ambiente, bem como alertar os profissionais de saúde, principalmente os que atuam na área de saúde pública, sobre a necessidade de estarem melhor preparados, tanto para diagnosticar casos e surtos que possam ser causados por estes agentes, como para estabelecer medidas específicas de prevenção de infecções, haja vista as características próprias do gênero de bactérias estudado.

Sabe-se que para uma doença manifestar-se são necessários outros fatores além da presença ou ausência do(s) microrganismo(s), como a virulência do agente, número presente e resistência específica do hospedeiro. Entretanto,

a elevada frequência com que esses microrganismos foram encontrados nos moluscos bivalves estudados, a incidência de fatores de virulência nos mesmos, e o fato de, especialmente as ostras, serem consumidas habitualmente cruas, constituiu-se em fator de risco para a população, o que deve ser melhor considerado pelas autoridades de saúde pública.

Com exceção de áreas endêmicas de cólera, onde ocorrem infecções secundárias seguidas de contaminação de suprimento de água de beber não protegida ou alimentos (WEST, 1989), medidas convencionais de tratamento de esgoto podem eliminar outros agentes de doenças, porém não espécies de vibrios potencialmente patogênicos, pois os mesmos ocorrem no ambiente aquático independentemente da presença de poluição fecal humana. Considera-se, portanto, necessária a adoção de medidas específicas, que possam proteger o consumidor dessas infecções. Para tanto, faz-se necessária uma reavaliação das condições de comercialização de alimentos de origem marinha, bem como a adoção de medidas que procurem esclarecer o consumidor sobre os possíveis riscos da ingestão desses alimentos crus ou mal cozidos.

Outro fator importante, que pode contribuir para a casuística de infecções por esses agentes, é a presença de grande contingente de imigrantes japoneses em nosso país, que cultivam os hábitos da tradicional cozinha japonesa, a qual possui vários pratos que incluem peixe cru.

Se considerarmos a longa extensão de nosso litoral, o que conseqüentemente expõe uma elevada parcela de nossa população ao contato com o ambiente marinho e favorece o consumo de alimentos marinhos tais como: peixes, crustáceos e moluscos bivalves, pode-se supor um risco mais elevado de contrair infecções causadas por vibrios.

Como já foi referido, ausência de exames diagnósticos de rotina para estes agentes em nossos serviços de saúde, talvez seja um fator da baixa casuística dessas infecções em nosso país.

Considerando-se a diversidade de espécies de vibrios potencialmente patogênicos isolados das amostras de ostras, os percentuais de amostras positivas e a elevada frequência de associações de 2 ou mais espécies na mesma amostra (Figuras 5, 6 e 7), e levando-se em consideração que ostras são habitualmente consumidas cruas e mexilhões eventualmente crus ou insuficientemente cozidos, temos convicção de que sua ingestão, sem os devidos cuidados, possam constituir-se em um determinado grau de risco para a saúde do consumidor.

A diversidade de espécies potencialmente patogênicas encontradas nos moluscos estudados, e que causam acúmulo de fluido em alça ligada de coelho e/ou camundongos lactentes, e também o fato de que a maioria das infecções

ocorre devido à ingestão de pescado cru ou insuficientemente cozido, ou inadequadamente manipulados (WEST, 1989), indicam que é prudente que se evite seu consumo nessas condições, e sejam adotadas práticas adequadas para manipulação e estocagem desses alimentos, visando reduzir a possibilidade de contaminação cruzada de alimentos (PAPARELLA, 1984; BRAYAN, 1988).

O cozimento dos alimentos de forma que alcance temperatura interna superior a 60°C por vários minutos parece ser satisfatório para eliminar-se os vibrios patogênicos presentes (BOUTIN e col., 1982; SAXENA & KULSHRESTHA, 1985; MAKUKUTU & GOTHIC, 1986).

6. CONCLUSÕES

- A frequência de amostras de ostras positivas para *V. alginolyticus* (81%), *V. parahaemolyticus* (77%), *V. cholerae* não O:1 (31%), *V. fluvialis* (27%), *V. furnissii* (19%), *V. mimicus* (12%) e *V. vulnificus* (12%), indica que pode haver riscos à saúde da comunidade pela ingestão desses moluscos bivalves, principalmente porque são habitualmente ingeridos crus.

- A frequência de amostras de mexilhões positivas para *V. alginolyticus*(97%), *V. parahaemolyticus*(75%), *V. fluvialis* (47%), *V. vulnificus* (11%), *V. cholerae* não O:1 (6%), *V. furnissii* (6%) e *V. mimicus* (6%), indica que há riscos à saúde da comunidade, pela ingestão desses moluscos bivalves insuficientemente cozidos.

- A presença de mais de uma espécie de vibrio potencialmente patogênica na maioria das amostras de ostras e mexilhões analisadas, indica um risco ainda maior à saúde do consumidor.

- Os percentuais de amostras que apresentaram acúmulo de fluido em alça ligada de coelho (6,9% entre 0,25 e 0,49 ml/cm; 15,6% entre 0,5 e 0,99 ml/cm e 15,1% maior ou igual a 1 ml/cm) e/ou intestino de camundongos lactentes

(Teste de Dean) (26,6%), confirmam o elevado potencial desses microrganismos em causar gastroenterite.

- A ausência de correlação entre vibrios potencialmente patogênicos isolados, com os indicadores de contaminação fecal (coliformes totais e fecais), confirmou que estes microrganismos são autóctones no ambiente estudado.

- Constatou-se a ausência de distribuição sazonal em relação à maioria dos vibrios potencialmente patogênicos isolados.

- A salinidade média anual (32‰) foi favorável à ocorrência, principalmente, das espécies de vibrios potencialmente patogênicas halofílicas, tais como *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii* e *V. vulnificus*, entretanto espécies não halofílicas, como *V. cholerae* não O:1 e *V. mimicus*, também a ocorreram.

7. RECOMENDAÇÕES

Com base nas conclusões desta pesquisa, e considerando-se que o risco de infecção com espécies de vibrios patogênicas é associado com a presença de fatores de resistência do hospedeiro; uso recreacional ou ocupacional do ambiente aquático e com o consumo de alimentos contaminados, particularmente alimentos marinhos (WEST, 1989), recomenda-se que:

- A pesquisa de vibrios potencialmente patogênicos deve ser estendida para outras regiões do país, principalmente as litorâneas, tendo em vista a extensão de nosso litoral e também a diversidade de climas existentes, que variam desde os típicos de regiões frias até os de regiões tropicais, que possivelmente devem apresentar aspectos ecológicos diversos dos encontrados na região estudada (sub-tropical).

- Em casos de gastroenterites relacionadas à ingestão de ostras e mariscos, os exames laboratoriais para

diagnóstico deverão incluir métodos de isolamento e identificação de vibrios.

- considerando-se que os casos mais graves de infecções extraintestinais por espécies de *Vibrio*, ocorrem principalmente em pessoas portadoras de fatores predisponentes tais como, alterações hepáticas, alterações no metabolismo do ferro, diabetes, alcoolismo, entre outras, é importante recomendar aos profissionais de saúde para que orientem os pacientes portadores dessas alterações, a evitar o consumo de alimentos marinhos crus ou mal cozidos, contato com o ambiente marinho, ou desenvolver atividades em que há risco constante de se ferir com pescado.

- A constatação de que Cananéia é um dos principais pontos fornecedores de ostras para o Estado de São Paulo, sugere a necessidade da intensificação de estudos e ações por parte da vigilância sanitária naquela região, visando garantir a saúde do consumidor.

- Considerando-se que espécies de *Vibrio* podem estar naturalmente presentes em alimentos de origem marinha, recomenda-se em especial, que nutricionistas responsáveis por cozinhas hospitalares, adotem medidas mais rigorosas para evitar contaminação cruzada com estes tipos de alimentos, uma vez que os pacientes internados em hospitais, são com frequência, pessoas que tem suas defesas naturais comprometidas, portanto mais suscetíveis, não só aos

microrganismos que ocorrem com frequência em infecções hospitalares, como também por eventuais patógenos que possam estar presentes nos alimentos.

- Considerando-se que espécies de *Vibrio* podem estar naturalmente presentes em alimentos de origem marinha, recomenda-se a observação dos cuidados para evitar contaminação cruzada de alimentos, principalmente em cozinhas industriais, lembrando por exemplo a possibilidade de multiplicação de *V. cholerae* não O:1 em outros alimentos.

- É importante estudar também a eficiência de diversos métodos de processamento do pescado à nível industrial, na redução do número de vibrios potencialmente patogênicos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, S.L.; POWES, C.; KAYSNER, C.A.; TAKEDA, Y.;
ISHIBASHI, M; JOSEPH, S.W.; JANDA, J.M. Emergence of
a restricted bioserovar of *Vibrio parahaemolyticus*
as the predominant cause of vibrio associated
gastroenteritis on the West Coast of the United
States and Mexico. *J. Clin. Microbiol.*, 27(12):2891-
3, 1989.
- AHSAN, N.; CONTER, R.L.; APPELBAUM, P.C. Postoperative
wound infection associated with *Vibrio*
parahaemolyticus in a patient without exposure to
seawater. *J. Clin. Microbiol.*, 26(6):1214-5, 1988.
- AMAKO, Z.; SHIMODORI, S.; IMOTO, T.; MIAKE, S.; UMEDA,
A. Effects of chitin and its soluble derivates on
survival of *Vibrio cholerae* O1 at low temperature.
Appl. Environ. Microbiol., 53(3):603-5, 1987.

- ARITA, M.; TAKEDA, T.; HONDA, T.; MIWATANI, T.
Purification and characterization of *Vibrio cholerae*
Non-O1 heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.*,
52(1):45-9, 1986.
- ARITA, M.; HONDA, T.; MIWATANI, T.; OHMORI, K.; TAKAO,
T.; SHIMONISHI, Y. Purification and characterization
of a new heat-stable enterotoxin produced by *Vibrio*
cholerae Non-O1 serogroup Hakata. *Infect. Immun.*,
56(6):2186-8, 1991a.
- ARITA, M.; HONDA, T.; MIWATANI, T.; TAKEDA, T.; TAKAO,
T.; SHIMONISHI, Y. Purification and characterization
of a heat stable enterotoxin of *Vibrio mimicus*. *FEMS*
Microbiol. Lett., 79:105-10, 1991b.
- ARNOLD, M.; WOO, M.L.; FRENCH, G.L. *Vibrio vulnificus*
septicaemia presenting as spontaneous necrotising
cellulitis in a woman with hepatic cirrhosis.
Scand. J. Infect. Dis., 21:727-31, 1989.
- BARJA, J.L.; SANTOS, Y.; HUQ, I.; COLWELL, R.R.;
TORANZO, A.E. Plasmids and factor associated with
virulence in environmental isolates of *Vibrio*
cholerae Non-O1 in Bangladesh. *J. Med. Microbiol.*,
33:107-14, 1990.

- BARROS, G.C. & VIANNI, M.C.E. *Vibrio parahaemolyticus*: isolamento e identificação em águas da Baía de Guanabara. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 22:163-9, 1980.
- BASSLER, B.L.; GIBBONS, P.J.; YU, C.; ROSEMAN, S. Chitin utilization by marine bacteria, chemotaxis to chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. *J. Biol. Chem.*, 266(36):24268-75, 1991a.
- BASSLER, B.L.; YU, C.; LEE, Y.C.; ROSEMAN, S. Chitin utilization by marine bacteria. *J. Biol. Chem.*, 266(36):24276-86, 1991b.
- BAUMANN, P. & SCHUBERT, R.H.. Family II. Vibrionaceae Veron In: MURRAY, R.G.E.; BRENER, D.S.; BRYANT, M.P.; HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; MOULDER, J.W.; PFENNING, N.; SNEATH, P.H.A.; STALCY, J.T. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore/London, Willians & Wilkins, 1984, 10 Edição, Volume 1 pp. 516-50.
- BINTA, G.M.; TJABERG, T.B.; NYAGA, P.N.; VALLARD, M. Market fish hygiene in Kenya. *Journal of Hygiene*, 89:47-52, 1982.

- BRAYTON, P.R.; BODE, R.B; COLWELL, R.R.; M
M.T.; HALL, H.L.; GRIMES, D.J.; WEST, P.A.; BRYANT,
T.N. *Vibrio cincinnatiensis* sp. nov. a new human
pathogen. *J. Clin. Microbiol.*, 23:104-8, 1986.
- BRAYTON, P.R.; TAMPLIN, M.L.; HUQ, A.; COLWELL R.R.
Enumeration of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh
waters by fluorescents-antibody direct viable count.
Appl. Environ. Microbiol., 53:2862-5, 1987.
- BRENNET, C.E.; WRIGHT, A.C.; DUTTA, S.K.; MORRIS, J.G.
Growth of *Vibrio vulnificus* in serum from alcoholics
association with high transferrin iron saturation.
Infect. Dis., 164:1030-32, 1991.
- BURNS, K.D.; YURACK, J.; MCINTYRE, R.W. Non-O1 *Vibrio*
cholerae septicemia associated with a motor vehicle
accident. *Can. Med. Assoc. J.*, 140:1334-5, 1989.
- BRYANT, R.G.; JARVIS, J.; JANDA, J.M. Use of sodium
dodecyl sulfate-polymyxin B sucrose medium for
isolation of *vibrio vulnificus* from shellfish. *Appl.*
Environ. Microbiol., 53(7):1556-9, 1987.

CASALINO, M.; YUSUF, M.W.; NICOLETTI, M.; BAZZICALUDO, P.; COPPO, A.; COLONNA, B.; CAPELLI, C.; BIANCHINI, C.; FALBO, V.; AHMED, H.J.; OMAR, K.H.; MAXAMUUD, K.B.; MAIMONE, F. A two year study of enteric infections associated with diarrhoeal disease in children in urban Somalia. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 82:637-41, 1988.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Cholera. Peru 1991. *Morb. Mort. Wkly. Rep.*, 40(6):108-10, 1991.

CHAGLA, A.H.; PILLAI, D.K.; KHAN, M.A.; ZAMAN, A.U. Septicaemia caused by *Vibrio vulnificus*. *J. Infect.*, 17:135-8, 1988.

CHAN, K.Y.; WOO, M.L.; LO, K.W.; FRENCH, G.L. Occurrence and distribution of halophilic vibrios in subtropical coastal waters of Hong Kong. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52:1407-11, 1986.

CHAN, K.Y.; WOO, M.L.; LAM, L.Y.; FRENCH, G.L. *Vibrio parahaemolyticus* and other halophilic vibrios associated with seafood in Hong Kong. *J. Appl. Bacteriol.*, 66:57-64, 1989.

- CHIN, K.P.; LOWE, M.A.; TONG, M.J.; KOEHLER, A.L.
Vibrio vulnificus infection after raw oyster ingestion in a patient with liver disease and acquired immune deficiency syndrome related complex. *Gastroenterology*, 92:796-9, 1987.
- CHOWDHURY, M.A.R.; AZIZ, K.M.S.; KAY, B.A.; RAHIM, Z.
Toxin production by *Vibrio mimicus* strains isolated from human and environmental sources in Bangladesh. *J.Clin. Microbiol.*, 25:2200-3, 1987.
- CHOWDHURY, M.A.R.; YAMANAKA, H.; AZIZ, K.M.S.; SHINIDA, S.
Ecology of *Vibrio mimicus* in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(8):2073-8, 1989.
- CHOWDHURY, M.A.R.; MIYOSHI, S.I.; SHINODA, S.
Purification and characterization of a protease produced by *Vibrio mimicus*. *Infect. Immun.*, 58(12):4159-62, 1990.
- CHOWDHURY, M.A.R.; MIYOSHI, S.I.; SHINODA, S. Role of *Vibrio mimicus* proteases in enterotoxigenicity. *J. Diarrhoeal Dis. Res.*, 9(4):332-334, 1991.
- CHUANG, Y.C.; YOUNG, C.; CHEN, C.W. *Vibrio vulnificus* infection. *Scand. J. Infect. Dis.*, 21:721-6, 1989.

- COFFEY, J.A.; HARRIS, R.L.; BRADSHAW, M.W.; WILLIAMS, T.W. *Vibrio damsela*: another potentially virulent marine vibrio. *J. Infect. Dis.*, 153:800-2, 1986.
- COLWELL, R.R. *Vibrio cholerae* and related vibrios in aquatic environment and ecology. Fourth International Symposium on microbial Ecology, Proceedings. Slovene Society for Microbiology, 1986, p. 426-34.
- CORTEZ, V.G.; ANTILLON, G.F. Aislamiento de vibrios enteropatógenos de bivalvos y cieno del Golfo de Nacoya, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.*, 38(2B):437-40, 1990.
- DAKIN, W.P.H.; HOWELL, D.J.; SUTTON, R.G.A.; O'KEEFE, M.F.; THOMAS, P. Gastroenteritis due to non-agglutinable (non-cholerae) vibrios. *Med. J. Aust.*, 2:487-90, 1974.
- DALTON, M.T.; MACINTOSH, O.G.; CHISHOLM, D.; BENT, J.M. Extra intestinal Non cholera vibrio infections in Nova Scotia. *Can. J. publ. Hlth.*, 77:371-2, 1986.
- DANIEL, M. Proteases as a virulence factor for *Vibrio vulnificus*. Dissertation abt. International, 49 (12):5143-b, 1989.

DATTA-ROY, K; BANERJEE, S.P.; DE GHOSE, A.C.
Comparative study of expression of hemagglutinins,
hemolysins, and enterotoxins by clinical and
environmental isolates of non-O1 *Vibrio cholerae* in
relation to their enteropathogenicity. *Appl.*
Environ. Microbiol., 52:875-9, 1986.

DAVIS, B.R.; FANNING, G.R.; MADDEN, J.M.; STEIGERWALT,
A.G.; BRADFORD Jr., H.B.; SMITH Jr., H. L.; BRENNER,
D.J. Characterization of biochemically atypical
Vibrio cholerae strains and designation of a new
pathogenic species, *Vibrio mimicus*. *J. Clin.*
Microbiol., 14(16):631-9, 1981.

DE, S.N. & CHATTERJEE, D.N. An experimental study of
the mechanism of action of *Vibrio Cholerae* on the
intestinal mucous membrane. *J Pathol Bacteriol.*,
66:559-62, 1953.

DEAN, A.G.; CHING, Y.; WILLIAMS, R.G.; HARDEN, L.B.
Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant
mice: application in a study of diarrhea in
children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 225:407-11,
1972.

DeGEROME, J.H. & SMITH, M.T. Noncholera vibrio enteritis contracted in the United States by an american. *J. Infect. Dis.*, 129:587-9, 1974.

DePAOLA, A. *Vibrio cholerae* in the marine foods and environmental waters: a literature review. *J. Food Sci.*, 46:66-79, 1981.

DHAR, R.; GHAFOR, M.A.; NASRALAH, A.Y. An unusual non serogroup O1 *Vibrio cholerae* bacteremia associated with liver disease. *J. Clin. Microbiol.*, 27(12):2853-5, 1989.

DiGAETANO, M.; BALL, S.F.; STRAUS, J.G. *Vibrio vulnificus* corneal ulcer. *Arch. Ophthalmol.*, 107:323-4, 1989.

DUMLER, J.S.; OSTERHOUT, G.J.; SPANGLER, J.G.; DICK, J.D. *Vibrio cholerae* non serogroup O1 cystitis. *J. Clin. Microbiol.*, 27(8):1898-9, 1989.

ECHEVERRIA, P.; SERIWATANA, J.; TAYLOR, D. N.; YANGGRATOKE, S.; TIRAPAT, C. A comparative study of enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Shigella*, *Aeromonas* and *Vibrio* as etiologies of diarrhea in Northeastern Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34:547-54, 1985.

- ENG, R.H.K.; CHMEL, H.; SMITH, S.M.; HAACKER, D.; GRIGORIN, A. Early diagnosis of overwhelming *Vibrio vulnificus* infection. *South. Med. J.*, 81(3):410-1,
- FARINAS, L.B.; BOADA, R.J.M.; BLANCO, M.G.; TURINO, T.P.; VALDIVIESO, S.D. Identificación de especies de microorganismos del género vibrio. *Rev. Cubana, Med. Trop.*, 43(2)107-10, 1991.
- FARMER III, J.J.; HICKMAN-BRENNER, F.W.; KELLY, M.T. Vibrios In: LENNETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER Jr., W.J.; SHADOMY, H.J. *Manual of clinical microbiology*, Washington, American Society for Microbiology, 1985, p. 282-301.
- FINCH, M.J.; VALDESPINO, L.; WELLS, J. G.; PEREZ-PEREZ, G.; ARJONA, F.; SEPULVEDA, A.; BESSUDO, D.; BLAKE, P.A. Non-O1 *Vibrio cholerae* infections in Cancun, Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 36:393-7, 1987.
- FLETCHER, G.C. The potential food poisoning harzard of *Vibrio parahaemolyticus* in New Zeland Pacific oysters. *N. Zeland J. Mar. Freshwater Res.*, 19:495-505, 1985.

- FONDÉ, E.C.; BRITTON, J.; POLLOCK, H. Marine vibrios sepsis manifesting as necrotizing fasciitis. *South. Med. J.*, 77(7):933-4, 1984.
- FRANCA, S.M.C.; GIBBS, D.L.; SAMUELS, P.; JOHNSON Jr, W.D. *Vibrio parahaemolyticus* in Brazilian coastal waters. *J. Amer. Med. Ass.*, 244:587-8, 1980.
- GOEI, S.H. & KARTHIGASU, K.T. Systemic vibriosis due to non-cholera vibrio. *Med. J. Aust.*, 1:286-8, 1978.
- GRAY, L.D. & KREGER, A.S. Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.*, 48(1): 62-72, 1985.
- GUARD, R.W.; BRIDGEN, M.; DESMARCHELIER, P. Fulminating systemic infection causes by *Vibrio cholerae* species which does not agglutinate with O-1 *Vibrio cholerae* antiserum. *Med. J. Aust.*, 28:659-61, 1980.
- GUPTA, N.P.; GUPTA, S.P.; MANGLIK, U.S.; PRASAD, B.G.; YAJNIK, B.S. Investigations into the nature of vibrio strains isolated from the epidemic of gastroenteritis in Kumbh Fair at Allahabad in 1954. *Indian J. Med. Sci.*, 10:781, 1956.

- GYOBU, Y.; KODAMA, H.; UETAKE, H. Production and partial purification of a fluid accumulating factor of Non-O1 *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Immunol.*, 32(6):565-77, 1988.
- HADDOCK, R.L. & NOCON, F.A. NAG *Vibrio cholerae* isolated from imported shellfish in Guam. *J. Trop. Med. publ. Hlth.*, 16:113-6, 1985.
- HAISHIMA, Y.; KONDO, S.; HISATSUNC, K. Lipopolysaccharides of *Vibrio fluvialis* 181-86 Kobe possessing an antigenic factor in common with O1 *Vibrio cholerae*. *Current Microbiology*, 18:51-5, 1989.
- HOFER, E. & SILVA, C.H.D. Caracterização sorológica de amostras de *Vibrio parahaemolyticus* isolados de peixes capturados no litoral Brasileiro. *Rev. Microbiol.*, 17(4):327-31, 1986.
- HOFER, E. *Vibrio cholerae* não O1 associado à infecção entérica humana no Estado da Bahia, Brasil. *Rev. Microbiol.*, 18:1-4, 1987.
- HOFFMANN, T.J.; NELSON, B.; DAROUICHE, R.; ROSEN, T. *Vibrio vulnificus* septicemia. *Arch. Intern. Med.*, 148:1825-7, 1988.

- HONDA, T.; ARITA, M.; TAKEDA, T.; YOU, M.; TOSHIO, M.
Non-O1 *Vibrio cholerae* produced two newly identified toxins related to *Vibrio parahaemolyticus* haemolysin and *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Lancet*, 20:163-4, 1985.
- HONDA, T.; NISHIBUCHI, M.; MIWATANI, T.; KAPER, J.B.
Demonstration of a plasmid-borne gene encoding a thermostable direct hemolysin in *Vibrio cholerae* Non O1 strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52(5):1218-20, 1986.
- HONDA, T.; KASEMSUKSAKUL, K.; OGUSHI, J.; KOHDA, M.; MIWATANI, T. Production and partial characterization of Pili on Non-O1 *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Dis.*, 157(1):217-8, 1988.
- HONDA, T.; NI, Y.; MIWATANI, T. Purification of a TDH related hemolysin produced by a Kanagawa phenomenon-negative clinical isolate of *Vibrio parahaemolyticus* O6: K46. *FEMS Microbiol. Lett.*, 57: 241-6, 1989a.
- HONDA, T.; NI, Y.; HORI, S.H.; TAKAKWRA, H.; TSUNASAWA, S.; SAKIYAMA, F.; MIWATANI, T. A mutant hemolysin with lower biological activity produced by a mutant *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 61:95-100, 1989b.

HONDA, T.; LAPUEBLA, M.A.A.; NI, Y.; YAMAMOTO, K.; MIWATANI, T. Characterization of a new thermostable direct hemolysin produced by a Kanagawa-phenomenon-negative clinical isolate of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Gen. Microbiol.*, 137:253-9, 1991.

HOOD, M.A. & NESS, G.E. Survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in estuarine waters and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43(3):578-84, 1982.

HUNG, L.K.; KINNINMONTH, A.W.G.; WOO, M.L. *Vibrio vulnificus* necrotizing fasciitis presenting with compartmental syndrome of the hand. *J. Hand. Surg.*, 13b(3):337-9, 1988.

HUQ, M.I.; ALAM, A.K.M.; BRENNER, D.J.; MORRIS, G.K. Isolation of *Vibrio*-like group, EF-6, from patients with diarrhoea. *J. Clin. Microbiol.*, 11(6): 621-4, 1980.

ICHINOSE, Y.; YAMAMOTO, K.; NAKASONE, N.; TANABE, M.J.; TAKEDA, T.; MIWATANI, T.; IWANAGA, M. Enterotoxicity of El-Tor like hemolysin of Non-O1 *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.*, 55(5):1090-3, 1987.

INGHAM, S.C.; POTTER, N.N. Survival and growth of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus aureus* on cooked mince and surimi made from Atlantic Pollack. *J. Food Protect.*, 51:634-38, 1988.

ISLAM, M.S.; DRASAR, B.S.; BRADLEY, D.J. Long term persistence of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in the mucilaginous sheater of a blue green alga, *Anabaena variabilis*. *J. Trop. Med. Hyg.*, 93:133-9, 1990.

IWANAGA, M. & ICHINOSE, Y. An aberrant hemolysin of *Vibrio cholerae* Non-O1. *Microbiol. Immunol.*, 35(9):705-15, 1991.

JEAN-JACQUES, W.; RAJASHEKARAI AH, K.R.; FARMER III, J.J.; HICKMAN, F.W.; MORRIS, J.G.; KALLICK, C.A. *Vibrio metschnikovii* bacteremia in a patient with cholecystitis. *J. Clin. Microbiol.*, 14:711-2, 1981.

JENKINS, R.D. & JOHNSTON, J.M. Inland presentation of *Vibrio vulnificis* primary septicemia and necrotizing fasciitis. *Western J. Med.*, 144(1):78-80, 1986.

- JESUDASON, M.V.; LALITHA, M.K.; KOSHI, G. Non O1 *Vibrio cholerae* in intestinal and extra intestinal infection in Vellore, S. India. *Indian J. Pathol. Microbiol.*, 34(1):26-9, 1991.
- JOHNSTON, J.M.; BECKER, S.F.; MCFARLAND, L.M. Gastroenteritis in patient with stool isolates of *Vibrio vulnificus*. *Am. J. Med.*, 80:336-8, 1986.
- JORDAN, J.H.; FLYNN, T. *Vibrio* sepsis in a cirrhotic patient. *South. Med. J.*, 82(6):799-800, 1989.
- KANEKO, T. & COLWELL, R.R. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *J. Bacteriol.*, 113(1):24-32, 1973.
- KAROLCEK, J.; DRASKOVICOVA, M.; CIZNAR, I. Toxic properties of filtrates of NAG-vibrio cultures. *Cs. Epidem.*, 23(4-5):227-35, 1974.
- KARUNASAGAR, I.; VENUGOPAL, M.N.; KARUNASAGAR, I.; SEGAR, K. Role of chitin in the survival of *Vibrio parahaemolyticus* at different temperatures. *Can. J. Microbiol.*, 32:889-91, 1986.

KATZ, B.Z. *Vibrio vulnificus* meningitis in a boy with thalassemia after eating raw oysters. *Pediatrics*, 82(5):784-6, 1988.

KAY, B.A.; SACK, R.B.; SPIRA, W.M.; GUERRA, H.E.; GERREIRO, C.E.; CHAPARRO, E.; YI, A.E.; SALAZARLINDO, E.; CHEA, E.; WACHSMUTH, I.K.; DAVIS, B.R. *Vibrio cholerae* non-O1 isolated from five people with diarrhoea in Lima. *Lancet*, 28:218, 1984.

KAYE, J.J. *Vibrio vulnificus* infection in the hand. report of three patients. *J. Bone Joint Surg.*, 72A(2):283-285, 1990.

KAYSNER, C.A.; ABEYTA JR., C.; WEKELL, M.M.; DePAOLA JR. A.; STOTT, R.F.; LEITCH, J.M. Incidence of *Vibrio cholerae* from estuaries of the United States West Coast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53:1344-8, 1987a.

KAYSNER, C.A.; ABEYTA Jr., C.; WEKLL, M.M.; DePAOLA, J.A.; STOTT, R.F.; LEITCH, J.M. Virulent strains of *Vibrio vulnificus* isolated from estuarine of the United States West coast. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(6):1349-51, 1987b.

- KAYSNER, C.A.; TAMPLIN, M.L.; WEKELL, M.M.; STOTT, R.F.; COLBURN, K.G. Survival of *Vibrio vulnificus* in shellstock and shucked oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*) and effect of isolation medium on recovery. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(12):3072-9, 1989.
- KELLY, M.T. & STROH, E.M.D. Temporal relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in patients and the environment. *J. Clin. Microbiol.*, 26(9):1754-6, 1988.
- KELLY, M.T. & STROH, E.M.D. Urease positive Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus* from patients and the environments in the Pacific Northwest. *J. Clin. Microbiol.*, 27(12):2820-2, 1989.
- KHAN, M.V. & SHAHIDULLAH, M. Epidemiologic patterns of diarrhoea caused by non agglutinating vibrios (NAG) and EF-6 organisms in Dacca. *Trop. Geogr. Med.*, 34:19-27, 1982.
- KHAN, M.V.; SHAHIDULLAH, M.D.; HAQUE, M.S.; AHMED, W.U. Presence of vibrios in surface water and their relation with cholera in a community. *Trop. Geogr. Med.*, 36:335-40, 1984.

- KLONTZ, K.C.; LIEB, S.; SCHREIBER, M.; JANOWSKI, H.T.;
BALDY, L.M.; GUNN, R.A. Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections. *Ann. Int. Med.*, 109:318-23, 1988.
- KOTHARY, M.H. & KREGER, A.S. Purification and characterization of an extracellular cytolyisin produced by *Vibrio damsela*. *Infect. Immun.*, 49:25-31, 1985a.
- KOTHARY, M.H. & KREGER, A.S. Production and partial characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.*, 50(2): 534-540, 1985b.
- KOTHARY, M.H. & KREGER, A.S. Purification and characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*. *J. Gen. Microbiol.*, 133:1783-91, 1987.
- KOTHARY, M.H. & RICHARDSON, S.H. Fluid accumulation in infant mice caused by *Vibrio hollisae* and its extracellular enterotoxin. *Infect. Immun.*, 55(3): 626-30, 1987.
- KUMAZAWA, N.H. & KATO, E. Survival of Kanagawa-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* in a brackish-water area. *J. Hyg. Camb.*, 95:299-307, 1985.

LAM, S.C.Ng.; KOH, D.R.; TAN, M.L. Fatal septicaemia caused by *Vibrio vulnificus*. Singapore. Med. J., 29:176-8, 1988.

LEE, J.V.; SHREAD, P.; FURNISS, A.L. Taxonomy and discription of *Vibrio fluvialis* sp nov. (synonym. group F vibrios, group EF6). J. Appl. Bacteriol., 50:73-94, 1981.

LIMPERT, G.H. & PEACOCK, J.E. Soft tissue infections due to noncholera vibrios. APF, 37(2):193-8, 1988.

LOCKWOOD, D.E.; KREGER, A.S.; RICHARDSON, S.H. Detection of toxins produced by *Vibrio fluvialis*. Infect. Immun., 35(2):702-8, 1982.

LOWRY, P.W.; PAVIA, A.T.; MCFARLAND, L.M.; PELTIER, B.H.; BARRET, T.J.; BRADFORD, H.B.; QUAN, J.M.; LINCH, J.; MATHISON, J.B.; GUNN, R.A.; BLAKE, P.A. Cholera in Louisiana. Arch. Intern. Med., 149:2079-84, 1989.

MCCARDELL, B.A. & MADDEN, J.M. Isolation and characterization of a cytolisin produced by *Vibrio cholerae* sergroup Non-O1. Can. J. Microbiol., 31:711-20, 1985.

MCEWAN, R. & LEONG, R.W.M. Cases of non-cholera vibrio gastroenteritis acquired from overseas travel. *Med. J. Aust.*, 22:280, 1980.

McINTYRE, O.R. & FEELEY, J.C. Characteristics of non-cholera vibrio isolated from cases of human diarrhoea. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 32:627-32, 1965.

McINTYRE, O.R.; FEELEY, J.C.; GREENNOUGH III, W.B.; BENESON, A. S.; HASSAN, S.I.; SAAD, A. Diarrhoea caused by non-cholera vibrios. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 14:412-8, 1965.

McGIBBON, J.B. An unusual vibrio infection. *Maryland Medical Journal*, 38(9):735-7, 1989.

MAGALHÃES, M.; SILVA, G.P.; MAGALHÃES, V.; ANTAS, M.G.; ANDRADE, M.A.; TATENO, S. *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* associated with infantile diarrhea. *Rev. Microbiol.*, 24(4):295-8, 1990.

MAGALHÃES, M.; MAGALHÃES, V.; ANTAS, M.G.; TATENO, S. *Vibrio cholerae* non O1 isolated from sporadic cases of diarrhea in Recife, Brazil. *Rev. Microbiol.*, 23(1):1-4, 1992.

MAKUKUTU, C.A.; GUTHRIC, R.K. Behaviour of *Vibrio cholerae* in hot foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52:824-31, 1986.

MALATHI G.R.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Virulence of *Vibrio vulnificus* strains isolated from seafoods. *Indian J. Med. Res.*, 89:128-31, 1989.

MANNION, P.T. & MELLOR, S. Non cholerae vibrio bacteremia associated with acute cholecystitis. *Br. Med. J.*, 292:450, 1986.

MARTINS, M.T. Ecologia de *Vibrio cholerae* no ecossistema aquático. São Paulo. (1988)./ Tese de livre-Docência, Instituto de Ciências Biológicas da USP/.

MARTINS, M.T. Water as a vehicle for cholera In: Simposio Internacional de Cólera no Continente Americano. São Paulo. 1992. *Proceedings*. ILSI press U.S.A.. /No prelo/.

MARTINS, M.T.; SANCHEZ, P.S.; SATO, M.I.Z.; COLWELL, R.R. Detection of *Vibrio cholerae* in the aquatic environment in Brazil employing direct immunofluorescence microscopy. *World J. Microbiol. Biotech.*, (3), July 1993. /No prelo/.

- MASSAD, G. & OLIVER, J.D. New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(9):2262-4, 1987.
- MEHTAR, S.; BANGHAM, L.; KALMONOVITCH, D.; WREN, M. Adult epiglottitis due to *Vibrio vulnificus*. *Br. Med. J.*, 296:827-8, 1988.
- MIYAKE, M.; HONDA, T.; MIWATANI, T. Purification and characterization of *Vibrio metschnikovii* cytolysin. *Infect. Immun.*, 56(4):954-60, 1988.
- MOINARD, D.D.; GUIAVARCH, P.Y.; CAILLON, J.; BARRE, P. Septicémie à *Vibrio cholerae* Non-O1. *Presse Med.*, 18(17):898, 1989.
- MOLITORIS, E.; JOSEPH, S.W.; KRICHEVSKY, M.I.; SINDHAUARDJA, W.; COLWELL, R.R. Characterization and distribution of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Indonesia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50(6):1388-94, 1985.
- MONSREAL, J.F. & ABUXAPQUI, J.F. Prevalencia de *Vibrio parahaemolyticus* en alimentos marinos de restaurantes de la ciudad de Mérida, Yucatán. *Salud. Publica Mex.*, 31:314-25, 1989.

- MORGAN, D.R.; BALL, B.D.; MOORE, D.G.; KOHL, S. Severe *Vibrio cholerae* sepsis and meningitis in a young infant. *Tex. Med.* 81:37-8, 1985.
- MORRIS, G.K.; FISHBEIN, N.; BAROSS, J.A.; DEWITT, W.E. *Vibrio* In: SPECK, M.L. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, Washington, D.C. pp 358-69, 1976.
- MORRIS JR., J.G.; & BLACK, R.E. Cholera and other vibrioses in the United States. *New Engl. J. med.*, 312:343-50, 1985.
- MORRIS Jr, J.G. Non O group 1 *Vibrio cholerae*: a look at the epidemiology of an occasional pathogen. *Epidem. Rev.*, 12:179-91, 1990.
- MOYENUDDIN, M.; RAHMAN, K.M.; SACK, D.A. The aetiology of diarrhoea in children at an urban hospital in Bangladesh. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 81:299-302, 1987.
- MULDER, G.D.; RIES, T.M.; BEAVER, T.R. Nontoxigenic *Vibrio cholerae* wound infection after exposure to contaminated lake water. *J. Infect. Dis.* 159(4):809-10, 1989.

- MYATT, D.C. & DAVIS, G.H.G. Extracellular and surface bound biological activities of *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii* and related species. *Med. Microbiol. Immunol.*, 178:279-87, 1989.
- NACESCU, N.; CLUFECU, C.; NOCOARA I.; FLORESCU, D.; KONRAD, I. Morphological, cultural and biochemical characteristic of so called NAG. vibrios isolated from human feces and vomitus. *Zbl. Bakt. Hyg.J. Abt. Orig.* 229:209-15, 1974.
- NAIR, G.B.; OKU, Y.; TAKEDA, Y.; GHOSH, A.; GHOSH, R.K.; CHATTOPADHYAY, S.; PAL, S.C.; KAPER, J.B.; TAKEDA, T. Toxin profiles of *Vibrio cholerae* Non-O1 from environmental sources in Calcutta India. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(12):3180-2, 1988.
- NAKASONE, N. & IWANAGA, M. The role of pili in colonization of the rabbit intestine by *Vibrio parahaemolyticus* Na2. *Microbiol. Immunol.*, 36(2):123-30, 1992.
- NILSSON, L.; OLIVER, J.D.; KJELLEBERG, S. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.*, 173(16):5054-9, 1991.

NISHIBUCHI, M. & KAPER, J.B. Nucleotide sequence of the thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.*, 162(2):558-64, 1985.

NISHIBUCHI, M.; DOKE, S.; TOIZUMI, S.; UMEDA, T.; YOH, M.; MIWATANI, T. Isolation from a coastal fish of *Vibrio hollisae* capable of producing a hemolysin similar to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(8):2144-6, 1988.

OGG, J.E.; RYDER, R.A.; SMITH Jr., H.L. Isolation of *Vibrio cholerae* from aquatic birds in Colorado and Utah. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(1):95-9, 1989.

OHASHI, M.; SHIMADA, T.; FUKUMI, H. In vitro production of enterotoxin and hemorrhagic principle by *Vibrio cholerae*, *NAG. Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 25:179-94, 1972.

OKADA, K.; MIAKE, S.; MORIYA, T.; MITSUYAMA, M.; AMAKO, K. Variability of haemolysin(s) produced by *Vibrio vulnificus*. *J. Gen. Microbiol.*, 133:2853-7, 1987.

- OLIVER, J.D.; ROBERTS, D.M.; WHITE, V.K.; DRY, M.A.; SIMPSON, L.M. Bioluminescence in a strain of the human pathogenic bacterium *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52(5):1209-11, 1986.
- OLIVER, J.D.; NILSSON, L.; KJELLEBERG, S. Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(9):2640-4, 1991.
- OLIVER, J.D.; GUTHRIE, K.; PREYER, J.; WRIGHT, A.; SIMPSON, L.M.; SIEBELING, R.; MORRIS Jr., J.G. Use of colistin polymyxin B cellobiose agar for isolation of *Vibrio vulnificus* from the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(2):737-9, 1992.
- O'NEILL, K.R.; JONES, S.H.; GRIMES, D.S. Incidence of *Vibrio vulnificus* in northern New England water and shellfish. *FMES Microbiol. Lett.*, 72:163-8, 1990.
- OO, K.N.; HAN, A.M.; HLAIG, T.; AYE, T. Bacteriologic studies of food and water consumed by children in Myanmar: 1 The nature of contamination. *J. Diarrhoeal Dis. Res.*, 9(2):87-90, 1991.

- OPAL, S.M. & SAXON, J.R. Intracranial infection by *Vibrio alginolyticus* following injury in salt water. *J. Clin. Microbiol.*, 23(2):373-4, 1986.
- PACE, J. & CHAI, T. Comparison of *Vibrio parahaemolyticus* grown in estuarine water and rich medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(8):1877-87, 1989.
- PAPARELLA, M.V. Sanitary precautions for seafood packer in preventing disease caused by vibrios species. In: *Vibrios in the Environment* Ed Colwell, R.R. pp. 593-9, New York: John Wiley & Sons, Inc. 1984.
- PATTERSON, T.F.; BELL, S.R.; BIA, F.J. *Vibrio alginolyticus* cellulitis following coral injury. *Yale J. Biol. Med.*, 61:507-12, 1988.
- PÉREZ-ROSAS, N. & HAZEN, T.C. In situ survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in tropical coral reefs. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(1):1-9, 1988.
- PÉREZ-ROSAS, N. & HAZEN, T.C. In situ survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in a tropical rain forest watershed. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(2):495-9, 1989.

- PIERGENTILI, P.; CASTELLANI-PASTORIS, M.; FELLINI, R.D.; FARISANO, G.; BONELLO, C.; RIGOLI, E.; ZAMPIERI, A. Transmission of non O group 1 *Vibrio cholerae* by raw oyster consumption. *Int. J. Epidemiol.*, 13(3):340-3, 1984.
- PITRAK, D.L. & GINDORF, J.D. Bacteremia cellulitis caused by non serogroup O1 *Vibrio cholerae* acquired in a freshwater inland lake. *J. Clin. Microbiol.*, 27(12):2874-6, 1989.
- PUY, H.; CANARELLI, B.; DENAMUR, E.; STRUNSKY, V.; ORFILA, J. Otite à *Vibrio alginolyticus*. *Presse Med.* 18(19):985, 1989.
- RANK, E.L.; SMITH, I.B.; LANGER, M. Bacteremia caused by *Vibrio hollisae*. *J. Clin. Microbiol.*, 26(2):375-6, 1988.
- REILY, L.A. & HACKNEY, C.R. Survival of *Vibrio cholerae* during cold storage in artificially contaminated seafoods. *J. Food. Sci.*, 50:838-9, 1985.
- RHODES, J.B.; SMITH Jr, H.L.; OGG, J.E. Isolation of non O1 *Vibrio cholerae* serovars from surface waters in Western Colorado. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51(6):1216-9, 1986.

- RODRIGUES, D.P.; RIBEIRO, R.V.; HOFER, E. Analysis of some virulence factors of *Vibrio vulnificus* isolated from Rio de Janeiro, Brazil. *Epidemiol. Infect.*, 180:463-7, 1992.
- SABAPATHI, R. *Vibrio vulnificus* and pulmonary infection. *Ann. Intern. Med.*, 15 Dec, pp 988-9, 1988.
- SAKAMOTO, C.J.N. & PIEN, F.D. *Vibrio vulnificus* infection in Hawaii. *Intern. J. Dermatology*, 28(5):313-6, 1989.
- SARASWATHI, K.; BARVE, S.M.; DEODHAR, L.P. Septicaemia due to *Vibrio vulnificus*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 83:714, 1989.
- SARKAR, B.L.; KUMAR, R.; DE, S.P.; PAL, S.C. Observation on a 65 kilodalton protein isolated from Kanagawa positive strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Can. J. Microbiol.*, 33:1113-6, 1987a.
- SARKAR, B.L.; KUMAR, R.; DE, S.P.; PAL, S.C. Hemolytic activity of and lethal toxin production by environmental strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(11):2696-8, 1987b.

- SAUTTER, R.L.; TEYLOR, J.S.; OLIVER, J.D.; O'DONNELL, C. *Vibrio parahaemolyticus* (Kanagawa negative) wound infection in a hospital dietary employee. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 9:41-5, 1988.
- SAXENA, M.P.; KULSHRESTHA, S.B. Effect of physiochemical factors on the survival of *Vibrio parahaemolyticus* on fish. *Aquaculture*, 47:369-72, 1985.
- SCHANDEVYL, P.; VAN DYCK, E.; PIOT, P. Halophilic vibrios species from seafish in Senegal. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48:236-8, 1984.
- SEIDLER, R.J.; ALLEN, D.A.; COLWELL, R.R.; JOSEPH, S.W.; DAILY, O.P. Biochemical characteristics and virulence of environmental group F bacteria isolated in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40:715-20, 1980.
- SHANDERA, W.; JOHNSTON, J.M.; DAVIS, B.R.; BLAKE, P.A. Disease from infection with *Vibrio mimicus*, a newly recognized vibrio specie: Clinical characteristics and epidemiology. *Ann. Int. Med.*, 99:169-71, 1983.

- SHEHABI, A.A.; DRUXLER, H.; RICHARDSON, S.H. Virulence mechanisms associated with clinical isolates of Non-01 *Vibrio cholerae*. *Zentralbl. Bakt. Hyg.*, 261:232-9, 1986.
- SIMON, T.P.; RAJAKULENDRAN, S.; YEUNG, H.T. Acute hepatic failure precipitated in a patient with subclinical liver disease by vibrionic and clostridial septicemia. *Pathology*, 20:188-190, 1988.
- SIMPSON, L.M.; WHITE, V.K.; ZANE, S.F.; OLIVER, J.D. Correlation between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.*, 55(1):269-72, 1987.
- SINGH, S. J. & SANYAL, S.C. Enterotoxicity of the so-called NAG vibrios. *Am. Soc. Belge Med. Trop.*, 58:133-40, 1978.
- SPELLMAN, J.R.; LEVY, C.S.; CURTIN, J.A.; ORMES, C. *Vibrio fluvialis* and gastroenteritis. *Ann. Int. Med.*, 105:294-5, 1986.

- SPIRA, W.M. & FEDORKA-CRAY, P.J. Production of cholerae toxin-like toxin by *Vibrio mimicus* and Non-O1 *Vibrio cholerae*: batch culture conditions for optimum yields and isolation of hypertoxigenic lincomycin-resistant mutants. *Infect. Immun.*, 42(2):501-9, 1983.
- STAHR, B.; THREADGILL, T.; OVERMAN, T.L.; NOBLE, R.C. *Vibrio vulnificus* sepsis after eating raw oyster. *KMA Journal.*, 87:219-22, 1989
- TAMPLIN, M.L. & CAPERS, G.M. Persistence of *Vibrio vulnificus* in tissues of Gulf Coast oysters *Crassostrea virginica* exposed to seawater disinfected with UV light. *Appl Environ. Microbiol.*, 58(5):1506-10, 1992.
- TAMPLIN, M.L.; GAUZENS, A.L.; HUQ, A.; SACK, D.A.; COLWELL, R.R. Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(6):1977-80, 1990.
- TESTA, J.; DANIEL, L.W.; KREGER, A.J. Extracellular phospholipase A2 and lypophospholipase produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.*, 45(2):458-63, 1984.

- THEKDI, R.J.; LAKHANI, A.G.; RALE, V.B.; PANSE, M.V. An outbreak of food poisoning suspected to be caused by *Vibrio fluvialis*. *J. Diarrhoeal Dis.*, 8(4):163-5, 1990.
- THIBAUT, K.; VAN de HEYNING, P.; PATTYN, S.R. Isolation of non-O1 *Vibrio cholerae* from ear tracts. *Eur. J. Epidemiol.*, 2:316-7, 1986.
- THOM, S.; WARHUSEST, D.; DRASAR, B.J. Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. *J. Med. Microbiol.*, 36:303-6, 1992.
- TISON, D.L. & KELLY, M.T. Vibrios species of medical importance diagnostic microbiol. *Infect. Dis.*, 2:263-76, 1984.
- TISON, D.L.; NISHIBUCHI, M.; SEIDLER, R.J.; SIEBELING, R.J. Isolation of non-O1 *Vibrio cholerae* serovars from Oregon coastal environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51:444-5, 1986.
- TODA, H.; SAKIYAMA, F.; YOH, M.; HONDA, T.; MIWATANI, T. Tryptophan 65 is essential for hemolytic activity of the thermostable direct hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. *Toxicon.*, 29(7)837-44, 1991.

- TRUWIT, J.D.; BADESCH, B.D.; SAVAGE, A.M.; SHELTON, M.
Vibrio vulnificus bacteremia with endocarditis.
South. Med. J., 80(11):1457-9, 1987.
- VEENSTRA, J.; RIETRA, P.J.G.M; STOUTENBEE, C.P.;
COSTER, J.M.; GIER, H.H.W.; DIRKS-GO, S. Infection
by an indole negative variant of *Vibrio vulnificus*
transmitted by eels. **J. Infect. Dis.**, 166:209-10,
1992.
- VENKATESWARAN, K.; TAKAI, T.; NAVARRO, I.M.; NAKANO,
H.; HASHIMOTO, H.; SIEBELING, R.J. Ecology of *Vibrio*
cholerae non O1 and *Salmonella* spp. and role of
zooplankton in their seasonal distribution in
Fukuyama Coastal waters, Japan. **Appl. Environ.**
Microbiol., 55(6):1591-8, 1989a.
- VENKATESWARAN, K.; KIIYUKIA, C.; TAKAKI, M.; NAKANO,
H.; MATSUDA, H.; KAWAKAMI, H.; HASHIMOTO, H.
Characterization of toxigenic vibrios isolated from
freshwater environment of Hiroshima, Japan. **Appl.**
Environ. Microbiol., 55(10):2613-8, 1989b.

XU, H.S.; ROBERTS, N.; SINGLETON, F.L.; ATTWELL, R.W.; GRIMES, D.J.; COLWELL, R.R. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbiol. Ecol.*, 8:313-23, 1982.

XU, H.S.; ROBERTS, N.C.; ADAMS, L.B.; WEST, P.A.; SIEBELING, R.J.; HUQ, M.I.; RAHMAN, R.; COLWELL, R.R. An indirect fluorescent anti body staining produced for detection of *Vibrio cholerae* serovar O1 cells in aquatic environmental samples. *J. Microbiol. Meth.*, 2:221-31, 1984.

YAMAMOTO, K.; AL-OMANI, M.; HONDA, T.; TAKEDA, Y.; MIWATANI, T. Non O1 *Vibrio cholerae* hemolysin: purification partial characterization, and immunological relatedness to El Tor hemolysin. *Infect. Immun.*, 45(1):192-6, 1984.

YAMAMOTO, K.; ICHINOSE, Y.; NAKASONE, N.; TANABE, M.; NAGAHAMA, M.; SAKURAI, J.; IWANAGA, M. Identity of hemolysins produced by *Vibrio cholerae* O1, biotype *El Tor*. *Infect. Immun.*, 51(3):927-31, 1986.

YAMAMOTO, T, & YOKOTA, T. *Vibrio cholerae* Non-O1 production of cell associated hemagglutinins and "in vitro" adherence to mucus coat and apithelial surfaces of the vilii and lymphoid follicles of human small intestines treated with formalin. *J. Clin. Microbiol.*, 26(10):2018-24, 1988.

YAMAMOTO, T. & YOKOTA, T. Adherence targets of *Vibrio parahaemolyticus* in human small intestines, *Infect. Immun.*, 57(8):2410-9, 1989.

YAMANAKA, H.; SUGIYANA, K.; FURUTA, H.; MIYOSHI, S.; SHINODA, S. Cytolytic action of *Vibrio vulnificus* haemolysin on most cells from rat peritoneal cavity. *J. Med. Microbiol.*, 32:39-43, 1990.

YOH, M., HONDA, T.; MIWATANI, T. Purification and partial characterization of a non-O1 *Vibrio cholerae* hemolysin that cross-reacts with thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infec. Immun.*, 52(1): 319-22, 1986a.

YOH, M.; HONDA, T.; MIWATANI, T. Purification and partial characterization of *Vibrio hollisae* hemolysin that relates to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Can. J. Microbiol.*, 32:632-6, 1986b.

YOH, M.; HONDA, T.; MIWATANI, T. Comparison of hemolysins of *Vibrio cholerae* Non-O1 and *Vibrio hollisae* with thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Can. J. Microbiol.*, 34:1312-24, 1988.

YOH, M.; HONDA, T.; MIWATANI, T. Homogeneity of a hemolysin (Vh-rTDH) produced by clinical and environmental isolates of *Vibrio hollisae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 61:171-6, 1989.

YOSHII, Y.; NISHINO, H.; SATAKE, K.; UMEYAMA, K. Isolation of *Vibrio fluvialis* an unusual pathogen in acute suppurative cholangitis. *Am. J. Gastroenterol.*, 82(9):903-5, 1987.

WAGATSUMA, S. A medium for the test of the hemolytic activity of *Vibrio parahaemolyticus*. *Media circle*, 13:159-61, 1968.

WEST, P.A. & COLWELL, R.R. Identification and Classification of *Vibrionaceae* - An overview in COLWELL, R.R. & HATEN, M.B. *Vibrios in the environment*. New York, John Wiley Sons, 1983, p. 285-363.

WEST, P.A.; BRAYTON, P.R.; BRAYANT, T.N.; COLWELL, R.R.
Numerical taxonomy of Vibrios isolated from aquatic environments. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36(4):a-m, 1986.

WEST, P.A. The human pathogenic vibrios - A public health update with environmental perspectives. *Epidem. Inf.*, 103: 1-34, 1989.

WHATKINS, N.D. & CABELLI, V.J.. Effect of fecal pollution on *Vibrio parahaemolyticus* densities in an estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49:1307-13, 1985.

WILLIAM, S.L. & La ROCK, P.A. Temporal occurrence of vibrios species and *Aeromonas hydrophila* in estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50:1490-5, 1985.

WILSON, R.; LIEB, S.; ROBERTS, A.; STRYKER, S.; JAMOWSKI, H.; GUNN, R.; DAVIS, B.; RIDDLE, C.F.; BARRET, T.; MORRIS JR., J.G.; BLAKE, P. Non-O group 1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis associates with eating raw oysters. *Amer. J. Epidem.*, 114:293-8, 1981.

WINSTRON, J. A case of Non-O1 *Vibrio cholerae* bacteremia from Northern Europe. *J. Infect. Dis.*, 160(4):732, 1989.

WONGPAITON, V.; SATHAPATAYAVONGS, B.; PRACHAKTAM, R.; BUNYARATVE, S.; KURATHONG, S. Spontaneous *Vibrio vulnificus* peritonitis and primary sepsis in two patients with alcoholic cirrhosis. *Am. J. Gastroenterol.*, 80(9):706-8, 1985.

WOO, M.L.; PATRICK, W.G.D.; SIMON, M.T.P.; FRENCH, G.L. Necrotizing fasciitis caused by *Vibrio vulnificus*. *J. Clin. Pathol.*, 37:1301-4, 1984.

ZAFARI, Y.; ZAFARO, A.Z.; RAHMANZADEH, S.; FAKHAK, N. Diarrhoea caused by non-agglutinable *Vibrio cholerae* (non-cholera vibrio). *Lancet*, 25:429-30, 1973.

ZEBRAL, A.A. *Vibrio cholerae* não O1 isolado de água de esgoto, cidade de Niteroi, Estado do Rio de Janeiro. *Ci. Med.*, 5/6:19-23, 1986/87.

RESUMO

Neste estudo, 26 amostras de ostras (*Crassostrea gigas*) comercializadas na cidade de São Paulo e em alguns pontos do litoral de São Paulo, e 36 amostras de mexilhões (*Perna perna*) colhidas mensalmente em 3 pontos do litoral de Ubatuba - SP., foram submetidas à pesquisa de vibrios potencialmente patogênicos.

As amostras desses moluscos eram submetidas a enriquecimento em água peptonada alcalina sem cloreto de sódio e com 1% de cloreto de sódio, e GSTB. O isolamento foi realizado em ágar TCBS. Colônias sacarose positivas e negativas, sugestivas de espécies de *Vibrio* foram identificadas presuntivamente em meio de ágar ferro de Kligler, sendo confirmadas através de provas bioquímicas complementares. Uma parte das amostras de vibrios potencialmente patogênicos isoladas foi submetida ao teste de Dean e teste de alça ligada em íleo de coelhos.

Os vibrios potencialmente patogênicos encontrados em amostras de ostras foram *V. alginolyticus* (81%), *V. parahaemolyticus* (77%), *V. cholerae* não O:1 (31%), *V. fluvialis* (27%), *V. furnissii* (19%), *V. mimicus* (12%) e *V. vulnificus* (12%) e em amostras de mexilhões foram *V. alginolyticus*(97%), *V. parahaemolyticus*(75%), *V. fluvialis* (47%), *V. vulnificus* (11%), *V. cholerae* não O:1 (6%), *V. furnissii* (6%) e *V. mimicus* (6%).

Observou-se acúmulo de fluido em alça ligada de íleo de coelho entre 0,25 e 0,49 ml/cm em 6,9% das amostras, entre 0,5 e 0,99 ml/cm em 15,6% e maior ou igual a 1 ml/cm em 15,1%, e/ou intestino de camundongos lactentes (Teste de Dean) em 26,6% das

amostras testadas, confirmando o elevado potencial desses microrganismos em causar gastroenterite.

Verificou-se ausência de variação sazonal e também, de correlação entre os vibrios potencialmente patogênicos isolados e os indicadores de contaminação fecal, confirmando que a presença desses microrganismos ocorre de forma autóctone e que, as condições climáticas foram favoráveis à sobrevivência dessas espécies em todas as épocas do ano.

Considerando-se os resultados obtidos no presente estudo e o fato de que ostras e mexilhões são habitualmente ingeridos crus ou insuficientemente cozidos, pode-se concluir que sua ingestão constitui-se em um determinado grau de risco para a saúde do consumidor.

ABSTRACT

In this work, 26 oysters samples (*Crassostrea gigas*), found in the market of São Paulo city and some coastal areas of São Paulo State, and 36 mussels samples (*Perna perna*), that were collected monthly in 3 coastal areas of Ubatuba city - SP., were analyzed for the potential pathogenic vibrios occurrence.

Samples were enriched in alcalin peptone water with (1%) and without sodium chloride and GSTB. Isolation was performed on TCBS agar. Suspect saccharosis positive and negative colonies, resembling vibrio species, were presumptively identified on Kligler iron agar, and confirmed by complementary biochemical tests. Some of this potential pathogenic vibrios were submitted to suckling mouse assay and rabbit ileal loop assay.

Potential pathogenic vibrios isolated from oyster samples were: *V. alginolyticus* (81%), *V. parahaemolyticus* (77%), *V. cholerae* non O:1 (31%), *V. fluvialis* (27%), *V. furnissii* (19%), *V. mimicus* (12%) and *V. vulnificus* (12%) and from mussels samples were: *V. alginolyticus* (97%), *V. parahaemolyticus* (75%), *V. fluvialis* (47%), *V. vulnificus* (11%), *V. cholerae* non O:1 (6%), *V. furnissii* (6%) and *V. mimicus* (6%).

It was found 6,9% of samples between 0,25 and 0,49 ml/cm of fluid accumulation in ileal loop assay, 15,6% between 0,5 and 0,99 ml/cm and 15,1% was equal or higher than 1 ml/cm. Among the samples assayed for suckling mouse 26,6% were positive.

These results confirm the high potential of these microorganisms to induce gastroenteritis.

Seasonal variation as well as correlation between the potential pathogenic vibrios isolated and the fecal contamination indicators were not found, confirming that the presence of such microorganisms occurs autochthonously and that the climate conditions were favourable to these species survival during the whole year.

With the results of this work and considering that oyster and mussels are usually ingested raw or insufficiently cooked, the conclusion is that the ingestion of such mollusks presents a certain degree of risk for the consumer's health.