UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

" CARACTERIZAÇÃO DE *Vibrio* E *Aeromonas* , EM PEIXES COMERCIALIZADOS EM FEIRAS LIVRES, NO MUNÍCIPIO DO RIO DE JANEIRO"

DENISE CASTELHANO CORRÊA ALVES

SEROPÉDICA, R.J.
2000

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

"CARACTERIZAÇÃO DE *VIBRIO* E *AEROMONAS* , EM PEIXES COMERCIALIZADOS EM FEIRAS LIVRES, NO MUNÍCIPIO DO RIO DE JANEIRO, RJ."

AUTORA: DENISE CASTELHANO CORRÊA ALVES

Sob a Orientação da Profª NORMA DOS SANTOS LÁZARO

Co-orientação da Drª Dália dos Prazeres Rodrigues

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de *Magister Scientiae* em Microbiologia Veterinária.

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO

2000

TÍTULO DA TESE

"Caracterização de *Vibrio* e *Aeromonas* , em peixes comercializados em feiras livres, no munícipio do Rio de Janeiro, RJ."

AUTORA

Denise Castelhano Corrêa Alves

Em 29/03/00.

DÁLIA DOS PRAZERES RODRIGUES _____

FRANCISCO BENEDITO RANGEL FILHO _____

MARIA DA GRAÇA F. DO NASCIMENTO _____

Dedico este trabalho

A minha filha Caroline, pelos momentos que lhe furtei
Aos meus pais queridos, Edson Alves Corrêa e
Judite Castelhano Corrêa, pela compreensão
amor e incentivo.
À Artur Arnaldo Alves, amigo e companheiro,
pelo seu amor e apoio.
A meu irmão e amigo Ricardo C.Corrêa.

AGRADECIMENTOS

A minha gratidão a todos aqueles que de modo amigo contribuiram na execução deste trabalho.

Aos meus pais e esposo pelo apoio conferido à minha vida.

A Dra. Norma dos Santos Lázaro, pela orientação, compreensão, amizade, apoio e estímulo, durante a fase final deste trabalho.

A Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues, a quem devo meu aprendizado, pelo estímulo, pela amizade, compreensão e orientação em todos os momentos.

Aos amigos João Claúdio e Claúdio, pela amizade, colaboração e incentivo.

À Fundação Oswaldo Cruz, representada pelo seu presidente Dr. Eloy Garcia, pelos recursos técnicos científicos ofertados para execução deste trabalho.

Ao Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, na pessoa do seu chefe, Dra. Leila Carvalho Campos, pelo apoio e disponibilização das instalações para os experimentos.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, em particular `a Pós- Graduação em Microbiologia Veterinária, na pessoa do seu Coordenador Professor Ronald Bastos Freire, pelo apoio e confiança.

Ao corpo docente e discente do curso de Mestrado em Microbiologia Veterinária da UFRRJ, por todo incentivo prestado durante a obtenção dos créditos.

À mestranda Liliane Miyuki Seki, pelo companheirismo e amizade durante todo o decorrer do curso.

À mestre Christiane Soares Pereira, pela amizade, colaboração e companheirismo durante todo o decorrer do curso e na fase inicial deste trabalho.

Aos colegas de laboratório do Departamento de Bacteriologia da FIOCRUZ, principalmente às colegas Débora Medeiros Melo e Bárbara Coelho, pelo apoio, amizade e colaboração em todas as etapas deste trabalho.

Aos demais pesquisadores, técnicos e estagiários do Departamento de Bacteriologia, pelos ensinamentos e ajuda direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Aos integrantes da equipe do Setor de Meios de Cultura, pelo preparo da maior parte dos meios e materiais utilizados nos experimentos, e em especial ao Sr. Evaldo Soares da Silva, que sempre se mostrou amigo e atencioso e pronto para ajudar.

Aos funcionários da Biblioteca Nacional do Instituto Oswaldo Cruz, pela colaboração em todos os momentos necessários.

Aos Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa concedida durante um ano do Curso de Mestrado.

BIOGRAFIA

Denise Castelhano Corrêa Alves, filha de Edson Alves Corrêa e Maria Judite Castelhano Corrêa, nascida em 23 de abril de 1969, natural do Rio de Janeiro, RJ.

Ingressou na Universidade do Rio de Janeiro, no curso de Ciências Biológicas (Modalidade Médica), em 1988, graduando-se em janeiro de 1993.

Foi bolsista de aperfeiçoamento do Programa Pesquisa UNI-RIO em 1993, desenvolvendo o projeto "Etiologia bacteriana de processos entéricos agudos infantis", e bolsista de aperfeiçoamento do CNPq de 1995 a 1997, desenvolvendo o projeto "Isolamento da família *Vibrionaceae* em especimens fecais, amostras de águas e alimentos", respectivamente no Laboratório de Enterobactérias e Vibrios do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

Ingressou na Universidade do Grande Rio – Unigranrio, em 1992, no curso de Especialização em Análises Clínicas, concluindo em agosto de 1998.

Em 1998, ingressou no Curso de Pós – Graduação em Microbiologia Veterinária, do Instituto de Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	3
3. Material e Métodos	18
3.1. Amostragem	18
3.2. Procedimento Laboratorial	19
3.2.1.Isolamento	19
3.2.2.Caracterização bioquímica	19
3.2.3.Caracterização antigênica.	20
3.2.3.1.*Aeromonas* spp.	20
3.2.3.2. *Vibrio cholerae* não O1	20
3.2.4. Detecção de fatores de virulência	21
3.2.3.1. Teste de Kanagawa	21
3.2.3.2. Prova da colagenase	21
3.2.3.3. Prova da elastase	22
3.2.3.4. Pesquisa de hemolisina	22
4. Resultados e Discussão	28
5. Conclusões	57
6. Apêndice	59
7. Referências Bibliográficas	65

ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS

		Página
Fluxograma	Procedimentos Laboratoriais	23
Quadro 1.	Local de colheita de amostras	24
Quadro 2.	Distribuição das espécies de peixe (nome vulgar) de acordo com a feira livre.	25
Quadro 3.	Caracterização dos peixes de acordo com o nome científico, habitat e número de espécimes.	26
Quadro 4.	Reações típicas no Agar mCPC.	27
Tabela 1.	Distribuição numérica de Vibrio spp. e Aeromonas spp. isoladas de pescado de 10 feiras livres, no município do Rio de Janeiro.	46
Tabela 2.	Distribuição das espécies de Vibrio e Aeromonas de acordo com a origem e época de coleta.	47
Tabela 3.	Distribuição das 128 espécies de Vibrio (potencialmente patogênicas e não patogênicas) de acordo com a origem, de pescados comercializados em feiras livres, no município do Rio de Janeiro.	48
Tabela 4	Distribuição das 17 espécies de Vibrio isoladas de pescado oriundas de 10 feiras livres no município do Rio de Janeiro de acordo com os peixes e seu habitat.	49
Tabela 5.	Distribuição das 11 cepas de Aeromonas spp. isoladas de pescado oriundas de 10 feiras livres no município do Rio de Janeiro de acordo com as espécies de peixe .	50
Tabela 6.	Perfil sorológico das cepas de Aeromonas spp. isoladas de pescado oriundas de 07 feiras livres no município do Rio de Janeiro.	51

ÍNDICE DE GRÁFICOS E PLANILHAS

		Página
Gráfico 1, Planilha 1	Distribuição dos isolados de *Vibrio* spp. e *Aeromonas* spp. de acordo com a origem.	52
Gráfico 2, Planilha 2.	Freqüência dos gêneros *Vibrio* (espécies patogênicas e não patogênicas) e *Aeromonas* de acordo com o revestimento dos peixes.	53
Gráfico 3, Planilha 3.	Distribuição das espécies de *Vibrio* (patogênicas e não patogênicas), de acordo com o revestimento dos peixes.	54
Gráfico 4.	Classificação das nove cepas de *V. cholerae* não O1 segundo o esquema de Heiberg.	55

ÍNDICE DE FIGURA

		Página
Prancha 1.	**A e B.** Prova da colagenase em *V. alginolyticus*	56
	C. *A. hydrophila* hemolisina	

RESUMO

Foi pesquisada a presença de representantes dos gêneros *Vibrio* e *Aeromonas* em 187 espécimes de peixes expostos e comercializados em 10 feiras livres, no município do Rio de Janeiro. No computo geral, foram isoladas 345 cepas, cuja caracterização bioquímica permitiu a identificação de 17 espécies do gênero *Vibrio*, em 128 amostras, e cinco espécies do gênero *Aeromonas*, em 11 amostras. Não foi possível determinar a espécie em 200 amostras de *Vibrio* , o mesmo ocorrendo com seis cepas de *Aeromonas*. Dentre os 79 isolados de *Vibrio* potencialmente patogênicos, os maiores percentuais foram obtidos para *Vibrio alginolyticus e Vibrio carchariae* (24,05%), seguidos de *Vibrio parahaemolyticus* (12,66%), *Vibrio cholerae* não O1 (11,39%), *Vibrio metschinikovii* (7,59%), *Vibrio vulnificus* (6,33%), *Vibrio furnissii e Vibrio cincinatiensis* (3,79%), *Vibrio dansela* e *Vibrio mimicus* (2,53%) e *Vibrio fluvialis* (1,27%). Nas 49 cepas de *Vibrio* não patogênicos, *Vibrio orientalis* (36,73%) e *Vibrio harvey* (34,69%) foram os mais freqüentes, seguidos de *Vibrio anguillarum* (20,41%), *Vibrio costicola* (4,08%), *Vibrio aestuarinus* e *Vibrio mediterranei* (2,04%).

Quanto às 11 cepas de *Aeromonas* spp, reporta-se a detecção de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas trota* em 27,27% dos isolados, *Aeromonas eucrenophila* e *Aeromonas schuberttii* (18,18%) e *Aeromonas veronii* (9,09%). A presença de fatores enzimáticos possivelmente envolvidos em processo de patogenicidade, foi pesquisada nas amostras pertencentes a *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* e nas espécies de *Aeromonas*. Somente uma cepa de *Vibrio parahaemolyticus* revelou atividade hemolítica no Ágar Wagatsuma (Kanagawa positiva). A produção de hemólise em agar sangue de carneiro a 5% foi detectada em apenas uma cepa de

Aeromonas. Nenhuma das amostras de *Vibrio alginolyticus* e *Aeromonas*, foram positivas para a produção de colagenase e elastase, respectivamente. Considerando-se a diversidade de membros das famílias *Vibrionaceae* e *Aeromonadacea* e detectados neste estudo e as implicações dos gêneros *Vibrio* e *Aeromonas* em infecções intestinais e extraintestinais, no homem, ressalta-se a importância da adoção de medidas mais efetivas relacionadas com, práticas adequadas de conservação, manipulação e cozimento, para o consumo humano.

SUMMARY

The present study was developed to search for the presence of representatives of the genera *Vibrio* and *Aeromonas* from 187 fish specimen, exposed and sold at 10 street markets, in the Rio de Janeiro municipality. In the overall estimation 345 strains were isolated from which, biochemical characterization allowed the identification of 17 *Vibrio* species, from 128 samples, and five *Aeromonas* species, from 11 samples. It was not possible to determinate the specie from 200 samples of *Vibrio* , neither from six *Aeromonas* strains. Among all the 79 isolated *Vibrios* potencially patogenic, the highest percentage was for obtained to *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio carchariae* (24.05%), followed by *Vibrio parahaemolyticus* (12.66%), *Vibrio cholerae* not O1(11.39%), *Vibrio metschinikovii* (7.59%), *Vibrio vulnificus* (6.33%) *Vibrio furnissii* and *Vibrio cincinatiensis* (3.79%), *Vibrio dansela* and *Vibrio mimicus* and *Vibrio fluvialis* (1.27%). Among the 49 strains of no pathogenic *Vibrio*, *Vibrio orientalis* (36.73%) and *V. harvey* (34.69%) were more frequent, followed by *Vibrio anguillarum*, (20.41%), *Vibrio costicola* (4.08%), *Vibrio aestuarinus* and *Vibrio mediterranei* (2.04%). In relation to the 11 *Aeromonas* spp. strains, it was reported the detection of *Aeromonas hydrophila* in 27,27% of the isolates, and *Aeromonas trota* in 27.27% of the isolates, *Aeromonas eucrenophila* and *Aeromonas schuberttii* (18.18%) and *Aeromonas veronii* (9.09%). The presence of enzimatic factors possibly envolved in the pathogenicity process, was searched in the samples that belonged to *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* and in the *Aeromonas* species. Only one strain of *Vibrio parahaemolyticus*

showed haemolitic activity on Wagatsuma agar (Kanagawa positive).The hemolysin production on sheep blood agar at 5% was detected in just *Aeromonas* strain. None of the samples of *Vibrio alginolyticus* and *Aeromonas*, were positive for the production of collagenase and elastase, respectively. Considering the diversity of members of the *Vibrionaceae* and *Aeromonadaceae* families detected in this study and the implications of the genera *Vibrio* and *Aeromonas* in the intestinal and no intestinal diseases, in man, it was high lighted the importance of the adoption of more effective control measures related to the fish source, as well as suitable practices of conservation, manipulation and cooking, to the human consuption.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, algumas espécies patogênicas pertencentes às Famílias *Vibrionaceae* e *Aeromonadaceae*, oriundas do meio aquático e de pescado, vêm sendo incriminadas como um dos principais patógenos responsáveis por doenças no homem, caracterizadas por processos gastrintestinais, septicemia, bem como em diferentes sítios.

O modo de infecção humana por estes microrganismos está associado a fatores inerentes ao hospedeiro. Assim, indivíduos imunodeprimidos e portadores de processos degenerativos crônicos, em decorrência de diabete, alcoolismo, etc. , são mais susceptíveis, quando em contato com o ambiente aquático, como fonte recreacional ou como conseqüência do consumo de pescado insuficientemente cozido ou manipulado sob condições higiênicas precárias, resultando na contaminação cruzada.

Por esses microrganismos representarem parte da microbiota do pescado e terem condições autóctones no ambiente marinho em águas de estuário, reveste-se de importância ressaltar seu potencial patogênico para o pescado, destacando-se dentre os diferentes processos de agressão, a

septicemia hemorrágica, furunculose e lesões necrotizantes da pele e carapaças, resultando em grandes perdas econômicas.

Tendo em vista a relevância destes microrganismos como patógenos humanos, o crescente consumo de pescado obtido em feiras livres e, aliado à importância da avaliação da qualidade higiênico-sanitária desses produtos, o presente trabalho teve como objetivos:

- Isolar e caracterizar as espécies pertencentes aos gêneros *Vibrio* e *Aeromonas* de peixes comercializados em feiras livres no município do Rio de Janeiro.

- Avaliar a incidência de espécies potencialmente patogênicas para o homem com base nas características do pescado (habitat e revestimento).

- Caracterizar os fatores de virulência, tais como produção de hemolisina, colagenase e elastase nas espécies isoladas, patogênicas para o homem.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os valores nutritivos do pescado são considerados altíssimos quando comparados com os da carne bovina, suína e de aves, apresentando maior digestibilidade e menor teor de ácidos graxos não saturados (USNHLE, 1990).

A água das baias e estuários contém milhões de microrganimos/ml sendo esta microbiota autóctone e também de origem entérica, lançada no ambiente, através dos efluentes domésticos. Desta forma, a contaminação do mar, devido a estes lançamentos de efluentes pode ocasionar problemas relevantes para a saúde pública, à partir de banhos em locais contaminados. Adicionalmente, os animais que ali habitam contribuem sobremaneira para a concentração de patógenos no ambiente marinho (CERUTTI & BARBOSA,1991).

Assim sendo, o pescado pode ser veiculador de uma gama imensa de microrganismos patogênicos para o homem através da ingestão de produtos crús, ou parcialmente cozidos (OMS, 1975). Outra fonte de contaminação importante é o manejo do pescado, desde o momento da captura, ainda nos barcos (ZICAN, 1994) até seu destino final, após passar

por inúmeras fases de processamento, armazenamento e transporte (CARDONHA et al., 1994).

Microrganismos do habitat aquático, como os pertencentes à família *Vibrionaceae* vêm recebendo especial atenção. O comprometimento humano por algumas espécies do gênero *Vibrio* envolve uma complexa série de interações ecológicas, salientando-se a exposição ou contato e, principalmente, após consumo de alimentos oriundos de águas contaminadas (OMS, 1975; LOPES et al., 1977; RODRIGUES & HOFER, 1986; HUQ et al., 1986; VARADARAJ, 1993).

Há um risco bastante significativo de adquirir as vibrioses após a ingestão de alimentos de origem marinha como moluscos ou pescado contaminados, preparados ao estilo oriental para consumo sem cocção, especialmente em condições de manipulação pouco higiênicas, favorecendo a contaminação cruzada e consequentemente, propiciando a multiplicação do microrganismo a níveis $\geq 10^6$ células, necessários para causar infecção (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Das 38 espécies que fazem parte do gênero, 12 são consideradas patogênicas para o homem: *Vibrio cholerae* O1, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. carchariae*, *V. cincinnatiensis*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. damsela*, *V. metschnikovii*, *V. furnissii* e *V. hollisae* (FRANCO & LANDGRAF, 1996; MORRIS et al., 1998).

São bacilos Gram-negativos, não-esporogênicos, com formato reto, curvo ou em vírgula, móveis, produtores de oxidase (exceto *V. metschnikovii* e *V. gazogenes*), catalase positivos e fermentadores de glicose, sem produção de gás. Sua condição autóctone no ambiente exige condições salinas de 0,5 a 3%, sendo entretanto compensada quando em

água doce e em ambientes que possuam fontes poluidoras e temperatura elevada da água (SINGLETON et al., 1982).

As infecções associadas com as diferentes espécies incluem aquelas do trato gastrentérico ou extraintestinal, e, em algumas situações, quadros septicêmicos, como no caso de infecção por *Vibrio vulnificus* (HACKNEY & DICHARRY, 1988; COOK & RUPLE, 1989; VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992; OLIVER & KAPER, 1997).

Dependendo da espécie e/ou cepa de *Vibrio*, vários fatores de virulência estão particularmente envolvidos, dentre outros, enterotoxinas (termo-lábil e termoestável), citotoxina, hemolisina, adesinas e enzimas extracelulares, tais como mucinase, quitinase, elastase, amilase, colagenase, (MURRAY et al., 1998). Um aspecto importante refere-se à produção da enzima quitinase a qual permite a fixação destes microrganismos em animais onde a quitina representa elemento básico do exoesqueleto, escamas e carapaças (KOLLY & DAN STROH, 1988).

Descoberto por ROBERT KOCH em 1884 o *Vibrio cholerae* O1, vem sendo incriminado como agente causal de epidemias e pandemias de cólera desde 1817, tendo como reservatório o homem. A presença desse microrganismo no habitat aquático e sua associação à quitina de copépodes, zooplancton e peixes, vem sendo relatada, conseguindo, possibilitando a essa bactéria uma forma de sobreviver, mesmo quando as condições ambientais são desfavoráveis (HUQ et al. 1984;1986; WEST, 1989; BRASIL, 1994; MOTES et al. 1994; ITAL, 1995).

Vibrio cholerae apresenta antígenos somáticos O sendo a espécie dividida em mais de 100 sorogrupos diferentes. Até recentemente, associava-se à epidemia de cólera somente as cepas capazes de produzir

toxina e pertencentes ao sorogrupo O1. Por essa razão, as cepas de *Vibrio cholerae* eram classificadas em *V. cholerae* O1 e *V. cholerae* não O1 (MURRAY et al. 1998). Entretanto, em 1992, houve o primeiro relato de uma doença, semelhante à cólera, na região da Índia e Bangladesh. Estudos revelaram que esse microrganismo não pertencia a nenhum dos sorogrupos previamente descritos para *V. cholerae*, mas a um outro sorogrupo, ao qual foi dada a designação de O139 e o sinônimo Bengal, a primeira cepa não O1, capaz de causar doença epidêmica (ALBERT, 1994).

A cólera é uma doença exclusiva do intestino delgado. Para se estabelecerem neste habitat e se multiplicarem, os vibriões colégicos possuem um ou mais fatores de aderência que lhes possibilitam aderir às microvilosidades. A motilidade dos vibriões é um fator de virulência, capacitando-os a penetrar na camada de muco do intestino. Eles também produzem enzimas mucolíticas, neuraminidase e proteases. Quando estão se multiplicando, elaboram a toxina colérica (SILVA, 1999). A importância da toxina como fator de virulência é indiscutível. Esta toxina é um complexo tóxico A-B que se liga a receptores específicos no intestino delgado, penetra na mucosa levando a uma série de reações que resultam na rápida secreção de sódio, potássio e bicarbonato no lumen intestinal (MURRAY et al., 1998).

As pessoas infectadas com *Vibrio cholerae* podem ou não apresentar sintomatologia ou, ainda, apresentar diarréia moderada a aquosa e profusa. Nos casos mais graves, pode haver eliminação de mais de um litro de fezes por hora, levando à perda rápida de líquido, colapso circulatório e morte, quando na ausência de terapia (FRANCO & LANDGRAG, 1996).

Diferente de outros sorotipos não-O1, o *Vibrio cholerae* O139 possui o mesmo complexo de virulência apresentado pelas cepas O1. Então a habilidade de O139 para aderir à mucosa intestinal e produzir toxina colérica é a razão para que estas cepas sejam tão virulentas quantos às cepas O1 (MURRAY et al., 1998).

A gastrenterite determinada pelas demais espécies do gênero caracteriza-se por um quadro de moderada gravidade incluindo diarréia, cólicas abdominais, náuseas, vômitos e febre. Em geral, é uma doença autolimitante, restringindo a necessidade de hospitalização, entretanto casos fatais também podem ocorrer. Quanto às infecções extraintestinais envolvendo pele, ouvidos e olhos, estas ocorrem após contato com águas naturais salgadas, enquanto que os casos de septicemia, seguidos de óbito, apresentam uma frequência relativamente baixa (West, 1989; Hally et al, 1995).

Outra espécie halofílica, identificada como *Vibrio parahaemolyticus* (SAKAZAKI et al, 1968), assume relevância, tendo um vista a possibilidade de determinar casos isolados ou surtos epidêmicos devido ao consumo de produtos de origem marinha (LEITÃO et al,1975).

As cepas isoladas de casos clínicos de gastrenterite por *Vibrio parahaemolyticus* são hemolíticas, enquanto as provenientes de águas marinhas não apresentam esta característica no meio de Wagatsuma. Este meio é composto por hemácias humanas e agar, entre outras substâncias. A hemólise ocorre devido a produção de uma hemolisina extracelular termoestavel, a qual e citotóxica e cardiotóxica em animais de experimentação, e que recebeu o nome de fenômeno de Kanagawa,

distinguindo-a de outros fatores hemolíticos presentes em *Vibrio* spp. ((FRANCO & LANDGRAG, 1996; MURRAY et al., 1998).

No Japão, em 1951 ocorreu um surto de gastroenterite envolvendo 272 pessoas e 20 óbitos, ocasionado pela ingestão de shirasu (sardinhas jovens, semi dessecadas e parcialmente aquecidas), de onde foi isolado pela primeira vez o *Vibrio parahaemolyticus*, por FUJINO et al.(1951), nesta ocasião denominado *Pasteurella parahaemolyticus*.

Vibrio parahaemolyticus vem sendo cada vez mais reconhecido como um importante patógeno causador de infecções diarréicas agudas na Ásia, Europa, África, Austrália e América do Norte (MURRAY et al., 1998)

PEFFERS et al.(1973), relataram cinco casos de gastroenterite causados por *Vibrio parahaemolyticus*, em passageiros de um vôo entre Bangkok e Londres; as cepas eram Kanagawa positivas predominando o sorotipo O2:K3. Ao analisarem a refeição servida a bordo, a carne de caranguejo foi incriminada como a fonte de infecção, demonstrando não ter sofrido cocção suficiente.

No período de março a agosto de 1974, JEGATHESAN & PARAMASIVAM (1976), isolaram 47 cepas de *Vibrio parahaemolyticus* a partir de fezes de pacientes com gastrenterite, durante um suposto surto de cólera. Diante de tais resultados, os autores chamam a atenção para a similaridade da sintomatologia determinada por *Vibrio parahaemolyticus* com o do *V. cholerae*, tornando-se necessária a comprovação laboratorial.

Quanto a sua ocorrência no Brasil, salienta-se o trabalho de HOFER (1983) o qual relata a primeira ocorrência de uma cepa de *V. parahaemolyticus* Kanagawa positivo, isolada de fezes diarréicas de uma

criança, em Cascavel, Ceará, caracterizando-a como pertencente ao sorotipo O5:K17.

MAGALHÃES et al.(1990), analisando 1100 fezes de pacientes com diarréia em Recife, Pernambuco, obtiveram 1,3% de isolamento *de V. parahaemolyticus*, todos Kanagawa positivos.

Por outro lado, sua detecção em amostras ambientais foi obtida por SILVA & HOFER(1977) que analisando 234 cepas de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de peixes (75 amostras), escargot (11), camarão (57), ostra (90) e fezes humana (1), obtiveram 11,53% de amostras Kanagawa positivo.

BARROS & VIANNI (1981), analisando a ocorrência de membros do gênero *Vibrio* em águas da Baia de Guanabara, obtiveram 1,42% de cepas Kanagawa positivo em 140 culturas de *Vibrio parahaemolyticus.*

Mais recentemente, cita-se a detecção por VIEIRA & TIMO (1993) em cauda de lagosta e o relato de RODRIGUES et al.(1994) em isolados ambientais, de 25% e 9,2% de cepas Kanagawa positivas, respectivamente.

Dentre outras citações da ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* no ambiente aquático, citam-se as observações de GELLI et al. (1975), FRANCA et al. (1980) e HOFER & SILVA (1986) que obtiveram 74,25%, 10,0% e 54,8%, respectivamente, de isolamento de *Vibrio parahaemolyticus.*

Além do *V. parahaemolyticus*, definido atualmente, como de grande interesse em Saúde Pública, nas últimas duas décadas observou-se um série de acontecimentos com a participação de outros membros do gênero *Vibrio*, especificados como *V. cholerae* não O1, Vibrios do grupo F (atualmente *V. fluvialis*), *V. furnissis, V. vulnificus* e outras espécies afins

(WHO, 1980, LEE et al., 1981; HOFER, 1987; MAGALHÃES et al., 1992), determinando, com certa freqüência, diferentes quadros patológicos na espécie humana (KENYON et al., 1983; GHOSH et al., 1994)

LANDGRAF et al. (1996), pesquisaram 100 amostras de alimentos marinhos, das quais isolaram espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicos como *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus* e *Vibrio cholerae* não O1, em 89% de amostras de ostras , 50% de mexilhões e 17% de camarões. Devido à alta ocorrência desses microrganismos, os autores concluíram que os consumidores estão expostos a esta contaminação, particularmente em função dos hábitos alimentares, ao consumirem alimentos crus ou mal cozidos.

Segundo TISON et al. (1982), *V. cholerae* não O1 pode ser isolado em uma variedade de condições ambientais sendo, aparentemente, componentes autóctones das comunidades microbianas estuarinas.

Entre as espécies de maior relevância nas infecções extra-intestinais, ressalta-se *Vibrio vulnificus* que na década de 80, nos Estados Unidos foi associado a 81% das infecções ocorridas em pessoas consumidoras de ostras, com 40% de mortalidade (CDC,1993). É isolado com frequência a partir de infecções de ferimentos ou em casos de septicemias fatais; ao contrário de outras espécies de *Vibrio,* esta é invasora e capaz de entrar na corrente sanguínea através do epitélio intestinal , sendo reconhecida nos últimos anos como um novo patógeno emergente e de interesse alimentar (SILVA,1999).

A ocorrência deste microrganismo no ambiente marinho é sempre favorecida por temperaturas acima de 13°C, e por salinidade inferior a 1,6% (GARCIA et al, 1997).

SIMPSON et al. (1987), estudaram a correlação entre o aspecto morfológico da colônia com a virulência em *Vibrio vulnificus*. Os autores observaram que as não virulentas produziram colônias translúcidas enquanto que as virulentas, com exceção daquelas cepas pertencentes ao biogrupo 2 (patógenos de enguias) exibiram colônias opacas e translúcidas.

Os vários potenciais fatores de virulência de *Vibrio vulnificus* vêm sendo identificados nos últimos anos. Dentre eles, citam-se a cápsula polissacarídica (CPS) e produtos extracelulares, tais como a citolisina, protease/elastase, e colagenase, sendo a cápsula polissacarídica (CPS) de extrema importância para a virulência deste *Vibrio*, conferindo proteção contra a fagocitose e efeito bactericida do complemento (FIORE et al. 1995).

HOLLIS et al. (1976), descreveram o *V. vulnificus* como uma espécie potencialmente patogênica para o homem após a ingestão de alimentos marinhos crus ao mal cozidos. Existe naturalmente em regiões como o Oceano Atlântico, Oceano Pacífico e Golfo do México.

A multiplicação desse microrganismo no verão, em alimentos de origem marinha mantidos sem refrigeração adequada, representa um risco para a Saúde Pública (OLIVER et al., 1982; 1983; VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992; TAMPLIN et al (1982) DePAOLA et al., 1994; DOYLE, 1992;1994; WRINGT et al., 1996; COOK, 1997; DALSGAARD & HOI, 1997; LANDGRAF, 1997).

OLIVER et al.(1992) isolaram *Vibrio vulnificus* de amostras de água de mar, sedimento, plâncton, caranguejo, pescados e outros frutos do mar, colhidos durante o verão, em 80 pontos compreendidos entre Miami (Florida) e Portland (Miami).

DALSGAARD & HOI (1997), pesquisando a prevalência de *Vibrio vulnificus* em camarão congelado produzido principalmente em países tropicais, obtiveram 7,0% de positividade. Entretanto, *Vibrio vulnificus* não foi recuperado em nenhum dos 61 produtos quando cozidos e congelados, sugerindo tratamento térmico adequado e ausência de contaminação cruzada, no decorrer do processamento.

Outras espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicas para o homem, como *V. alginolyticus, V. metschnikovii, V. furnissii, V. mimicus, V. damsela e V. hollisae* são citadas na literatura, como possíveis agressores do trato entérico, além de, apresentarem localizações extra-intestinais (CASTILHO et al., 1981; LEE et al., 1981; MORRIS et al., 1982; ALBERT et al., 1992; MAGALHÃES et al, 1992).

Vibrio alginolyticus é uma espécie halofílica, bastante comum no ambiente marinho. Contudo, não está associada a casos de gastroenterite, sendo por isso, considerada uma espécie oportunista cujo isolamento é maior a partir de infecções extraintestinais, nos casos onde ferimentos de pacientes foram expostos ao ambiente marinho contaminado (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Embora a infecção, na maioria das vezes, seja autolimitante, indivíduos imunocomprometidos são bastante susceptíveis a esse patógeno. Casos de otite media crônica foram descritos na Grécia, em mergulhadores, de onde foi isolado *Vibrio alginolyticus*, sugerindo que a longa permanência na água do mar favorece a infecção (TSAKRIS et al. 1995).

V. carchariae assemelha-se ao *V. alginolyticus*, estando presente em ambientes aquáticos, porém somente foi isolado há alguns anos atrás, a

partir de infecção extra-intestinal no homem (WEST,1989; LOPES et al, 1993).

ABBOTT & JANDA (1994), descreveram o isolamento de *Vibrio hollisae* de dois casos de gastroenterite aguda, onde houve relato de ingestão de mariscos crus, porém os autores ressaltam que normalmente esta especie de *Vibrio* não esta associada com gastroenterite.

O isolamento de *Vibrio hollisae* das fezes de uma paciente com 40 anos, apresentando diarréia aquosa, febre, vômitos e dores abdominais, cinco dias após ter ingerido ostras cruas, foi relatado por CARNAHAM et al.(1994).

ESTEVE et al.(1995), relataram o primeiro caso de isolamento de *Vibrio furnissii*, em enguias (*Anguilla anguilla*), na Europa. Os autores ressaltam que estes vibrios podem ser patogênicos para esta espécie de peixe.

Ao se considerar ainda a veiculação de espécies autóctones, através do pescado, com ou sem comprometimento humano, merecem destaque, dentre outros, os membros do gênero *Aeromonas*.

São bastonetes Gram negativos, pertencentes à Família *Aeromonadaceae*, possuem metabolismo oxidativo e fermentativo sobre a glicose, resultando na produção de ácido ou ácido/gás. Produzem catalase, citocromo-oxidase e revelam resistência ao composto vibriostático O/129 (POPOFF, 1984).

O gênero *Aeromonas* compreende um grupo de espécies bacterianas ubiquas no ambiente hídrico, principalmente em água doce, compondo a microbiota de peixes e anfíbios (WEST & COLWELL, 1983).

Diferente de outros enteropatógenos, *Aeromonas spp.* não necessita de um hospedeiro para sobreviver e/ou se multiplicar; sobrevive no ambiente aquático e constitui a microbiota das águas superficiais. O ciclo fecal-oral pode contribuir para o aumento do número de bactérias no ambiente, entretanto, este número é determinado muito mais por fatores ecológicos do que por contaminação humana (Le BLANC et al., 1988; KING et al., 1992).

O gênero *Aeromonas* tem sido responsabilizado como agente causal de doenças em diversas espécies animais como peixes, répteis, anfíbios e no homem (FIGUEROA, et al., 1988; KIROV, 1993). O aumento da ocorrência em infecções do trato entérico e extra-intestinal, por membros deste gênero, os permitem serem incluídas na categoria de patógenos emergentes (WHO, 1998).

A variedade das formas de infecção que as espécies de *Aeromonas* podem determinar, tem relação com diversos fatores de virulência. Dentre estes, destacam-se as citotoxinas, proteinases, hemolisinas, enterotoxinas, leucocidinas, quitinase e adesinas que, de forma combinada ou isolada, podem produzir uma gama de efeitos patogênicos para o hospedeiro (LJUNG, 1987).

A taxonomia do gênero está constantemente mudando com a adição de novas espécies ou a reclassificação das antigas espécies (HUYS et al., 1997), sendo constituído de espécies móveis e imóveis. As móveis são: *Aeromonas hydrophila* (espécie tipo), *A. caviae*, *A. veronii* (biogrupos veronii e sobria), *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. eucrenophila*, *A. trota*, *A. allosaccharophila*, *A. ichthiosma*, *A. encheleia*, *A. bestiarum* e *A. popoffii*. As espécies imóveis compreendem *A.salmonicida* (ssp.*salmonicida*,

achromogenes, masoucida, smithia) e *A. media* (MONTEIL & MONTEIL-HARF, 1997).

Com base em hibridização de ADN-ADN e nos perfis de restrição de RNA ribossomal, existem 13 espécies genotípicas bem definidas (LUCCHINI & ALTWEGG, 1992). Certas espécies propostas, como *A. ichthiosma e A. enteropelogenes* são idênticas a *A.veronii* e *A. trota, respectivamente* (COLLINS et al., 1993), o mesmo em relação a *A. encheleia* e *A. eucrenophila,* que são fenotipicamente muito próximas (HUYS et al., 1997).

As espécies móveis estão relacionadas com doenças no homem sendo a principal delas a diarréia autolimitante e, ainda, formas severas similares à diarréia colérica. Em menor proporção, aparecem relacionadas à infecções da pele, ouvido, em casos de necrose cutânea e septicemia, tendo como fatores predisponentes ferimentos, cirurgias, especialmente em pacientes imunodeprimidos (ROLSTON et al., 1988; 1991).

De um total de 100 cepas oxidase positiva, isoladas de diferentes produtos patológicos tais como, fezes, escarro, exudato de faringe, narina, bile e líquido cefalorraquideano, durante o período de janeiro a outubro, FARIÑAS et al.(1993), caracterizaram uma como pertencente ao gênero *Vibrio,* 66 ao *Aeromonas* spp. e 33 ao gênero *Plesiomonas*. Os autores ressaltam a importância de estabelecer estudos de vigilância destes microrganismos para investigar sua circulação em nosso meio.

NAIDU & YADAV, (1997), isolaram 19 cepas de *Aeromonas hydrophila* a partir de amostras clínicas de diarréia e 11 de ambiente, obtidas de lago com criação de peixes.

YAMADA et al.(1997), relataram a alta ocorrência de *Aeromonas* spp em viajantes com diarréia em Tokyo, Japão, procedentes de vários países asiáticos, durante o período de julho de 1986 a dezembro de 1995. Das 23.215 amostras de fezes, 1265 (5,5%) foram caracterizadas como pertencentes a *Aeromonas veronii* biovar sobria (893 amostras, 70,6%), *Aeromonas hydrophila* (330, 26,1%) e *Aeromonas caviae* (42 cepas, 3,3%).

RODRIGUEZ & HERNÁNDEZ (1997) isolaram *Aeromonas hydrophila* em casos de septicemia hemorrágica em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), no México. Os autores concluíram que este microrganismo se encontra regularmente associado a septicemia hemorrágica em peixes submetidos a condições de "stress", particularmente relacionado a variações na temperatura da água (>18°C), propiciando desta forma , condições ideais para a multiplicação desses patógenos.

ALVES et al. (1997a), estudando 38 amostras de *Aeromonas* spp de origem humana, oriundas de diferentes regiões do Brasil, caracterizaram 19 cepas de *Aeromonas caviae*, 11 de *Aeromonas hydrophila*, 3 de *Aeromonas schubertii*, 1 de *Aeromonas sobria* e 1 de *Aeromonas veronii*. A atividade hemolítica foi detectada em *Aeromonas hydrophila* (7 amostras), *Aeromonas veronii* (1) e *Aeromonas schubertii* (1).

ALVES et al.(1997b), reportaram a detecção de 23 amostras de *Aeromonas* spp. em espécies clínicos oriundos de : bovino (3 animais), suíno (1), canino(1), coruja(1), cobra(1), rã (9) e peixes de água doce (1truta "Arco-íris"-6 e peixe ornamental "Guppy"-1). Os resultados revelaram que 7% das amostras identificadas como *Aeromonas hydrophila*

e *Aeromonas veronii* produziram hemólise beta em agar sangue de carneiro e, 13,9% comportaram-se como elastase-positivas, refletindo as suas características de agressão.

WANG & SILVA (1999) analisando 238 filés de bagre oriundos do Delta do Mississipe, entre Agosto de 1994 a Maio de 1995, obtiveram 36,1% de isolamento de *Aeromonas hydrophila*, 35,7% de *Aeromonas sobria*, 10,9% de *Aeromonas caviae;* 86,0% destas cepas produziram hemólise em Agar Sangue de carneiro a 5%.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia do Institudo Oswaldo Cruz - FIOCRUZ - RJ

3.1. Amostragem

Amostragem utilizada neste estudo originou-se de um total de 187 peixes expostos à venda em 10 feiras livres no município do Rio de Janeiro (Quadro 1). Para a caracterização das espécies de peixes levou-se em consideração inicialmente o nome vulgar informado pelos feirantes (Quadro 1) e , posteriormente, catalogados de acordo com a denominação científica, revestimento externo (Quadro 2) e habitat (Quadro 3)

Para a colheita do material, procedeu-se à fricção de swabs esterilizados na superfície cutânea dos peixes, sendo em seguida, introduzidos em meio de transporte (Cultureswab Cary & Blair Medium – Difco) e transportados ao laboratório em recipiente isotérmico com gelo, protegidos da luz, sendo processados no período de três horas após a colheita.

3.2. Procedimento Laboratorial (Fluxograma)

3.2.1. Isolamento

Primeiramente, foi efetuado o enriquecimento em Água Peptonada Alcalina – APA (pH 8,4 - 8,6) acrescida de 1% de NaCl, por um período de 6 a 8 horas a 37°C, seguindo-se a semeadura do inóculo em Agar Colistina Polimixina Celobiose modificado (Agar mCPC) de acordo com as recomendações do FDA (1995) e em duas placas de Agar Tiossulfato - Citrato - Sais Biliares – Sacarose (Agar TCBS – Difco) originalmente e acrescido de 3% de NaCl. As placas foram incubadas por 18 - 24 h a 40°C e 18 - 24 h a 37°C, respectivamente.

Cerca de três a cinco colônias (fermentadoras ou não da sacarose) em agar TCBS e colônias amarelas (fermentadoras de celobiose), com 1 - 2 mm de diâmetro, achatadas e translúcidas em Agar mCPC (Quadro 4) sugestivas de *Vibrio vulnificus*, foram inoculadas em tubos contendo os meios de triagem Kliger Iron agar (Difco) e Lysine Iron agar (Difco) e Agar Nutriente inclinado, acrescidos de 1 % de NaCl, e incubadas 37°C por 18-24h.

3.2.2. Caracterização Bioquímica

Todas as amostras que apresentaram reações sugestivas nos meios de triagem, foram submetidas a testes bioquímicos complementares. Inicialmente procedeu-se à prova da citocromo - oxidase a partir do Agar Nutriente, passando-se à caracterização bioquímica consistindo na análise

da atividade fermentativa sobre a glicose, manitol, lactose, sacarose, arabinose e manose, descarboxilação da lisina e ornitina; dehidrolação da arginina, via de utilização da glicose, através da prova de Voges Proskauer e pesquisa de beta - galactosidade - ONPG (ortofenitrofenil-beta-d-galactopiranosideo).

Adicionalmente, foi verificada, nas amostras em estudo, a capacidade de crescimento em diferentes concentrações de NaCl (0 , 3 , 6, 8, 10%), segundo os criterios estabelecidos por HOFER (1974) RODRIGUES (1983) e NOGUEIRA (1996) e resistência ao agente vibriostático O/129 (2,4 diamino-6,7-di-isopropil - pteridine - Sigma) com a finalidade de diferenciar os membros do gêneros *Vibrio* e *Aeromonas*.

Com intuito de complementar a análise bioquímica, as amostras identificadas como *Vibrio cholerae* não O1 foram enquadradas na classificação de HEIBERG (1936), através do comportamento fermentativo sobre a arabinose, manose e sacarose.

3.2.3. Caracterização antigênica.

3.2.3.1 *Aeromonas* spp.

A caracterização antigênica das amostras de *Aeromonas* spp. foi realizada pelo Dr. Toshio Shimada do National Institute of Infectious Diseases. Tokyo, Japan.

3.2.3.2. *Vibrio cholerae* não O1.

A caracterização antigênica das amostras de *Vibrio cholerae* foi realizada utilisando-se antisoros de *Vibrio cholerae* O1 e O139,

produzidos no Centro de Referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas, IOC-FIOCRUZ. Para tal obteve-se a suspensão do crescimento bacteriano em Agar Nutriente inclinado (acrescido de 1% de NaCl), pela adição de 2 mL de solução salina a 0,85% de NaCl, com a qual realizou-se o ensaio diante do antisoro ou em lâmina pela técnica de aglutinação rápida (HOFER, 1974).

3.2.4. Detecção de Fatores de Virulência

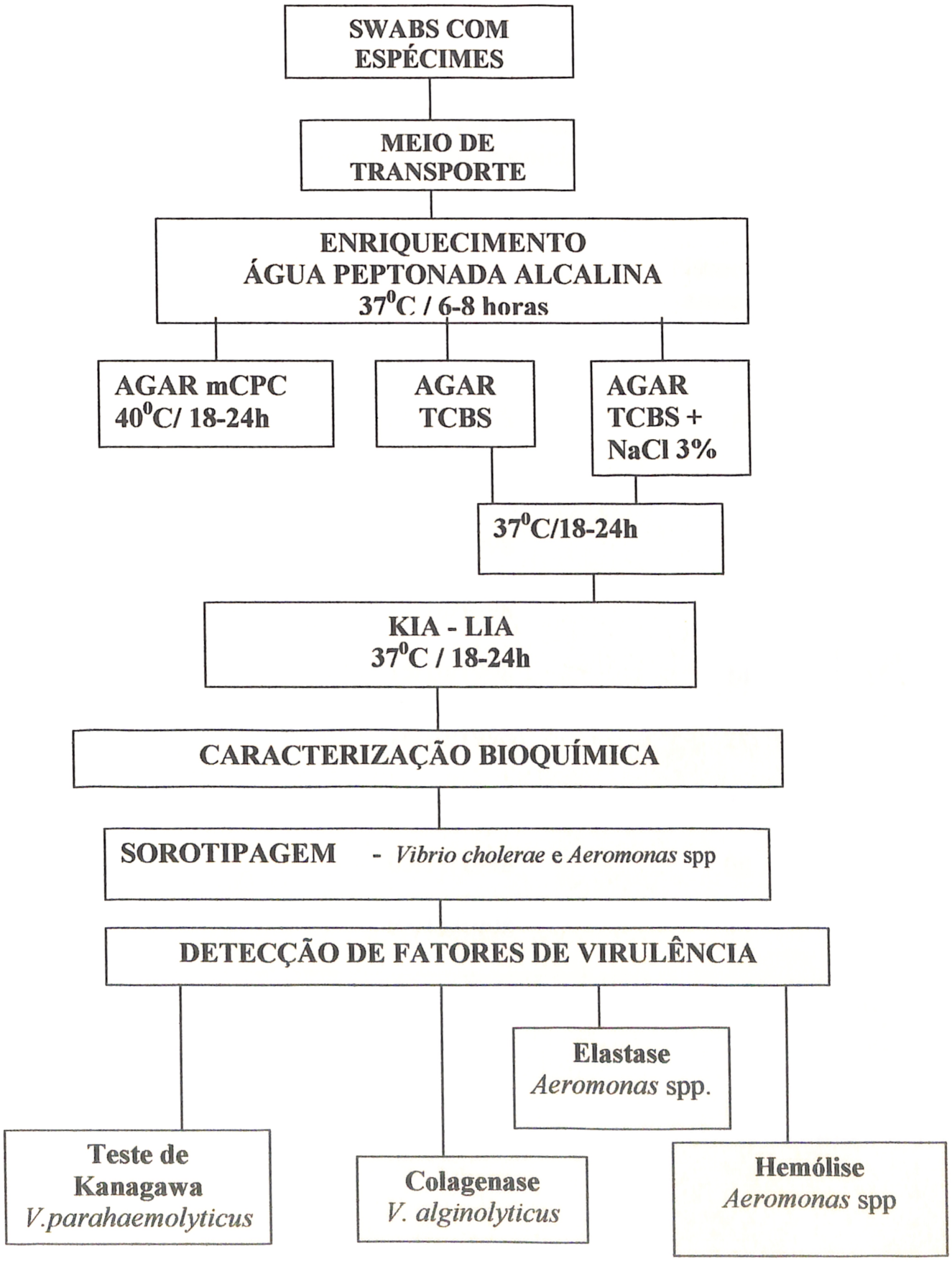
3.2.4.1. Teste de Kanagawa

Amostras caracterizadas bioquimicamente como *V. parahaemolyticus* foram submetidas ao teste Kanagawa, com a finalidade de verificar seu poder patogênico através de hemólise total em eritrócitos humanos, de acordo com a metodologia descrita por SAKAZAKI (1965) e FISHBEIN & WENTZ (1973). Para tal, do crescimento prévio em Caldo Infuso de Cérebro Coração (BHI Broth - Difco) foram efetuadas semeaduras em "spot" em Agar Wagatsuma , procedendo-se a leitura após incubação por 18 -24 h a 37 °C.

3.2.4.2. Prova da Colagenase (SMITH & MERCKEL,1982)

Efetuada nas cepas de *Vibrio alginolyticus*. O meio de cultura empregado foi o Agar Infuso de Cérebro Coração (BHI Agar – Difco) acrescido de 1% de colágeno bovino (Sigma 9879). Na superfície do meio,

FLUXOGRAMA


SWABS COM ESPÉCIMES
MEIO DE TRANSPORTE
ENRIQUECIMENTO ÁGUA PEPTONADA ALCALINA 37°C / 6-8 horas
AGAR mCPC 40°C/ 18-24h
AGAR TCBS
AGAR TCBS + NaCl 3%
37°C/18-24h
KIA - LIA 37°C / 18-24h
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA
SOROTIPAGEM - Vibrio cholerae e Aeromonas spp
DETECÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA
Elastase Aeromonas spp.
Teste de Kanagawa V.parahaemolyticus
Colagenase V. alginolyticus
Hemólise Aeromonas spp

Quadro 01: Distribuição dos locais de colheita das amostras (swabs de pescado) em 10 feiras livres, no município do Rio de Janeiro, RJ.

Feira Livre	Data	Número de amostras
01	24/09/1998	10
02	26/09/1998	09
03	27/09/1998	17
04	06/10/1998	18
05	11/10/1998	21
06	15/10/1998	14
07	18/10/1998	27
08	20/10/1998	21
09	03/11/1998	08
10	03/11/1998	42

Quadro 02: Distribuição das espécies de peixe examinados (nome vulgar) de acordo com a feira livre, no município do Rio de Janeiro, RJ.

Feira	Espécie (nome vulgar)
01	Pescadinha, Linguado, Corvina, Enchova e Congro rosa.
02	Corvina, Sardinha e Dourado.
03	Xerelete, Trilha, Corvina, Salmão, Cherne, Dourado e Namorado.
04	Galo, Trilha, Sardinha, Corvina, Enchova e Pescada amarela.
05	Namorado, Corvina, Curimatã, Pescadinha, Corvina de linha e Congro rosa.
06	Ciaba, Corvina, Pescadinha, Enchova e Badejo.
07	Cherne, Pescada, Pescadinha, Corvina, Pargo, Enchova e Xerelete.
08	Corvina, Namorado, Curimatã, Congro rosa, Enchova e Tainha.
09	Sardinha, Pescada, Corvina e Namorado
10	Pescadinha, Xerelete, Namorado, Batata, Enchova, Dourado, Olho de cão, Corvina de linha, Corvina e Pargo.

Quadro 03: Caracterização dos peixes de acordo com nome científico, habitat e número de espécimes, em 10 feiras livres, no município do Rio de Janeiro, RJ.

Nome vulgar	Nome científico	Habitat	Número de espécimes
Peixes com revestimento de couro			
Badejo	*Mycteroperca sp*	Costeiro	02
Batata	*Lopholatilus villaru*	Costeiro	03
Cherne	*Epinephelus niveatus*	Costeiro	08
Congro rosa	*Conger sp*	Alto mar	08
Galo	*Selene setapinnis*	Costeiro	03
Xerelete	*Caranx crysus*	Costeiro	13
Namorado	*Pseudopercis numida*	Alto mar	12
Peixes com revestimento de escamas			
Corvina	*Micropogon furnieri*	Costeiro	30
Corvina de linha	*Micropogon opercularis*	Costeiro	08
Curimatã	*Prochilahus sp*	Rio	06
Dourado	*Coryphaera hippurus*	Alto mar	08
Enchova	*Pomatomus saltatrix*	Alto mar	21
Linguado	*Paralichthys brasilirnsis*	Costeiro	02
Pescada amarela	*Cynoscion acoupa*	Costeiro	03
Pescada verdadeira	*Cynoscios steindachneri*	Costeiro	09
Pescadinha	*Cynoscios virescens*	Costeiro	20
Salmão	*Salmon salar*	Rio	02
Sardinha	*Sardinella aurita*	Costeiro	08
Tainha	*Mugil platanus*	Costeiro	03
Trilha	*Mullus argentinae*	Costeiro	06
Ciaba	*Lutjanus analis*	Costeiro	03
Olho de cão	*Priacanthus arenatus*	Costeiro	03
Pargo	*Lutjanus purpureus*	Alto mar	06
Total			187

Quadro 04: Reações típicas no Agar mCPC (Colistina Polimixina Celobiose modificado), das amostras isoladas.

Espécie	Resistência		Crescimento a 40°C	Fermentação da Celobiose	Colônia
	Polimixina B	Colistina			
V.cholerae	+	+	+	_	Púrpura / zona azul
V. vulnificus	+	+	+	+	Amarela/ Zona amarela
Vibrio spp	_	_	_	_	Sem* Crescimento

*De acordo com os resultados laboratoriais as amostras de *Vibrio* spp. obtiveram crescimento.

foram depositados nos vários quadrantes, uma alça do crescimento das amostras bacterianas, semeadura em "spot", em Caldo Infuso de Cérebro Coração (BHI Broth – Difco) incubando-se por 18-24h a 37°C. A presença da enzima é indicada por uma zona de clareamento do meio sob e ao redor do induto bacteriano.

3.2.4.3. Prova da Elastase (RIBEIRO. 1994).

Realizada nas amostras de *Aeromonas* spp. O meio de cultura empregado foi o Agar Infuso de Cérebro Coração (BHI Agar – Difco) acrescido de 1% de Elastina (Sigma E 1625). Na superfície do meio, foram depositados nos vários quadrantes, uma alça do crescimento das amostras bacterianas, semeadura em "spot", em Caldo Infuso de Cérebro Coração (BHI Broth – Difco) incubando-se por 18-24h a 37°C. A presença da enzima é indicada por uma zona de clareamento do meio sob e ao redor do induto bacteriano.

3.2.4.4. Pesquisa de hemolisina em ágar sangue de carneiro a 5% (EWING et al.,1979 e JANDA et al., 1995).

Realizada nas amostras pertencentes ao gênero *Aeromonas*. Empregou-se Agar Nutriente (Difco) acrescido de sangue de carneiro desfibrinado a 5%. Procedeu-se à semeadura em "spot"de uma alça do crescimento obtido em Caldo Infuso de Cérebro Coração (BHI Broth-Difco), seguido de incubação a 37^0C por 18 - 24 horas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escassez de proteínas em numerosos países tem ressaltado a importância nutritiva do pescado, pelo seu alto valor biológico na nutrição humana, considerado tão importante quanto a carne bovina (LEDERLE, 1991). Entretanto, quando consumido indevidamente, o pescado pode acarretar perigos para a Saúde Pública sendo responsável por muitas das infecções e intoxicações, conhecidas como transmissíveis por alimentos, assim como por certas enfermidades que se associam com freqüência ao pescado (OMS, 1975).

Na maioria dos países que dispõem de dados estatísticos, as infecções bacterianas constituem a maior parte das doenças transmitidas pelo pescado, o qual pode ser veiculador de um grande número de microrganismos patogênicos para o homem, sejam eles autóctones deste habitat e, na maioria deles, fruto de contaminação ambiental. O lançamento de esgotos nas águas de reservatórios, lagos, rios e no próprio mar, é a causa poluidora mais comum no mundo inteiro (CONSTANTIDINO, 1994).

Por estar sujeito à contaminação pelos mais variados microrganismos, adquiridos já no ambiente aquático, ou durante as diferentes estapas de captura, transporte e distribuição

(CONSTANTINIDO, 1994; ZICAN, 1994), o pescado exige cuidados especiais, notadamente os relacionados com a conservação pelo frio (LEDERLE, 1991).

A amostragem utilizada neste estudo, foi proveniente de 10 coletas em feiras livres, situadas em bairros da zona norte da cidade do Rio de Janeiro, identificadas numericamente, onde foi pesquisada a presença de representantes do gêneros *Vibrio* e *Aeromonas* em 187 espécimens de peixes, distribuídos entre 23 diferentes espécies, tendo 7 com revestimento externo de couro e 16, de escamas (Quadro 3).

No cômputo geral, foram isoladas 345 cepas, pertencentes às famílias *Vibrionaceae* e *Aeromonadaceae*, cuja identificação bioquímica, permitiu a caracterização em 128 amostras, correspondendo 11 espécies patogênicas de *Vibrio* (79 cepas) e seis não patogênicas (49), além de 11 do gênero *Aeromonas* cuja distribuição, de acordo com a feira livre encontra-se representada nas tabelas 1 e 2. Assinala-se que no gênero *Vibrio*, não foi possível determinar a espécie em 200 amostras, sendo portanto, caracterizadas como *Vibrio* spp (C), o mesmo ocorrendo com seis cepas de *Aeromonas* (Tabela 1).

Analisando ainda na tabela 1, a distribuição numérica dos amostras de *Vibrio* e *Aeromonas*, em relação à feira de origem, observou-se um maior número de isolamentos nas feiras 5, 7 e 10, o que de certa forma, seria esperado, uma vez que o número de amostras coletadas foi maior nessas feiras (Quadro 1). Nestas foi possível notar -se uma diversidade de espécies (Tabela 2) , com 8, 10 e 11 espécies de *Vibrio* e 2, 2, 3 de *Aeromonas* spp., respectivamente.

Ao relacionarmos no Gráfico 1, Planilha 1, o número de isolamentos de espécies dos gêneros *Vibrio* (potencialmente e não patogênicos) e *Aeromonas*, de acordo com a feira de origem, verificamos que os espécimes obtidos das feiras 7 e 10, caracterizaram-se por maior número de isolados (42 e 24 amostras, respectivamente) assim como de *Aeromonas* (6 amostras).

Admiti-se que a permanência do pescado no ambiente, enquanto expostos à venda, por período de tempo variável, favoreça, portanto, a multiplicação de patógenos.

A presença de *Vibrio*, no ambiente aquático é modulada por vários fatores, dentre eles a temperatura da água a qual parece ser de suma importância para a incidência e densidade de membros deste gênero, sendo de maior prevalência no verão (BOCKEMÜHL et al., 1986; KIIYUKIA et al., 1991; RIBEIRO, 1994).

Este fato foi constatado por CHAN et al. (1989) que verificaram redução dos isolamentos em temperatura inferior a 10^0C. Sob tal condição, apresentam diminuição da atividade metabólica, sendo reativados quando esta se torna mais propícia, o que geralmente ocorre na faixa de 17 a 35^0C, com variações de acordo com a espécie (SINGLETON et al., 1982).

Considerando-se que o período de coletas das amostras foi entre Setembro e Dezembro, que corresponde a estação de primavera e verão, a temperatura ambiente varia de 25 a 30°C, o que deve ter favorecido a multiplicação destes microorganismos, pois segundo SINGLETON et al (1982) o isolamento é mais propício na faixa de 17-35°C.

Entre as espécies do gênero *Vibrio* identificadas (Tabela 3), 11 são consideradas potencialmente patogênicas para o homem e animais, perfazendo um total de 79 amostras , os maiores percentuais foram obtidos para *V. alginolyticus e V. carchariae* - 19 (24,05%), seguidos de *V. parahaemolyticus* -10 (12,66%), *V. cholerae* não O1 - 09 (11,39%), *V. metschinikovii* - 06 (7,59%), *V. vulnificus* - 05 (6,33%), *V. furnissii e V. cincinnatiensis* - 03 (3,79 %), *V. damsela* e *V. mimicus* - 02 (2,53%) e *V. fluvialis* - 01 (1,27%).

Quanto às cepas de *Vibrio*, não patogênicos, foram caracterizadas seis espécies entre as 49 amostras, destacando-se *Vibrio orientalis* (36,73%) e *V. harvey* (34,69%) como os mais frequentes, seguidos de *V. anguillarum* (20,41%), *V. costicola* (4,08%), *V. aestuarinus* e *V. mediterranei* (2,04%).

Dos membros do gênero, *V. cholerae* O1 é o mais reconhecido por suas características epidêmicas, porém outras espécies também são clinicamente significantes por determinarem infecções gastrintestinais e extraintestinais para o homem. Particularmente no pescado, algumas apresentam importância econômica, por determinarem infecções em animais de cativeiro (SILVA et al., 1999).

É importante salientar o comprometimento humano pelas espécies do gênero *Vibrio*, identificadas em nosso estudo.

V. alginolyticus, foi a espécie identificada com maior freqüência juntamente com *V. carchariae* (24,05%). Percentuais também elevados foram obtidos por RIBEIRO, em 1994 (26, 7%), em praias no Rio de

Janeiro e NOGUEIRA, em 1996 (82,88%) em peixes. É interessante salientar que segundo AUSTIN & ALLEN-AUSTIN (1985), este microrganismo tem mostrado maior relevância como patógeno de moluscos que de peixes.

Outras espécies, como *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. metschnikovii*, *V. mimicus* e *V. damsela*, também isoladas neste estudo (Tabela 3) vem sendo citadas na literatura como possíveis agressores do trato entérico, assim como, apresentam localizações extra-intestinais, estando envolvidos em casos de bacteremia, infecções cutâneas por *V. carchariae* e casos de meningite por *V. cincinnatiensis* (MORRIS et al., 1982; MAGALHÃES et al., 1990; ALBERT et al., 1992; MURRAY et al., 1998). Cabe destacar a importância do *V. damsela*, classificado entre os patogênicos (Tabela 3), que possui capacidade de produzir potente toxina com atividade fosfolipásica a qual, provavelmente, desempenhe importante papel na agressão a peixes (FOUZ et al., 1993).

O percentual de isolamento de *Vibrio parahaemolyticus* em nosso estudo permitiu incluí-lo como a terceira espécie patogênica de maior prevalência (12,66%).

Vários são os relatos sobre o isolamento de *Vibrio parahaemolyticus* a partir de amostras de água do mar, estuários, peixes e frutos do mar (LEITÃO et al., 1976; HOFER & SILVA, 1986; RODRIGUES & HOFER, 1986; VIEIRA & LARIA, 1993; RIBEIRO, 1994; NOGUEIRA, 1996; LANDGRAF et al., 1996). KAYSNER et al. (1990) detectaram elevada prevalência (71,5%) desta espécie na Baía de Willapa, Washington.

Raras são as notificações sobre seu isolamento a partir de águas e peixes de água doce, merecendo destaque aqueles efetuados por SARKAR et al., 1983, 1985; BOCKEMÜHL et al., 1986 e BOIKO et al., 1994, concluindo-se que o teor salino dessas amostras de água provavelmente era alto, sendo este, um elemento importante para manutenção desta espécie

Quanto à ocorrência de *Vibrio paraemolyticus* no Brasil, salientam-se índices variando de 10,0% a 74,5% (GELLI et al., 1975; FRANÇA et al. 1980; HOFER & SILVA, 1986; RIBEIRO, 1994; LANDGRAF et al., 1996). Percentuais inferiores foram obtidos por RODRIGUES & HOFER (1986) em ostras (7,94%) e NOGUEIRA (1996) em peixes. De acordo com os resultados do presente estudo o percentual de isolamento encontra-se em concordância com as citações anteriores.

V. cholerae não O1, a quarta espécie patogênica de maior freqüência (11,39%) detectada em nossa investigação, é muito importante, pois tem sido associada com doença semelhante à cólera e outras infecções extra-intestinais, como septicemia e infecções em tecidos, no homem (KOBAYASHI & OHNAKA, 1989).

Confrontando a freqüência de isolamento de *Vibrio cholerae* não O1 obtida em nosso estudo, com aquelas registradas no Brasil, destacam-se os trabalhos de RODRIGUES & HOFER (1986) que analisando ostras e agua do mar para a presença de *Vibrio* spp., identificaram *Vibrio cholerae* não O1 em 65,12% dos isolados.

HOFER & ERNANDEZ (1990) detectaram 644 amostras de *V. cholerae* não O1 em espécimes de afluentes de duas estações de

25866

U.F.R.R.J. BIBLIOTECA CENTRAL
N.º REGISTRO 1515-97

tratamento de esgoto da cidade do Rio de Janeiro, sendo 290 (45,03%) pertencentes ao grupo I e 305 (47,35%) ao grupo II de Heiberg.

RIBEIRO em 1994, obteve 49,2% de isolamento deste microrganismo em praias do litoral do município do Rio de Janeiro; LANDGRAF et al.(1996), 3,6% e 4,2%, respectivamente, em ostras e camarão e NOGUEIRA (1996), um percentual de 2,73% em peixes comercializados no Estado do Rio de Janeiro. De acordo com esses relatos, percentuais mais elevados de isolamento de *V.cholerae* não O1, tem sido obtidos de amostras de água e percentuais baixos, semelhantes ao desse estudo foram também detectados anteriormente de peixes por NOGUEIRA (1996).

A ocorrência de *V. vulnificus* reportada na literatura revela índices na maioria das vezes, significativamente mais elevados, variando de 12,0% a 65,0% (KAYSNER, et al., 1987; O'NEIL et al. 1992; MATTÉ et al., 1994 a, b; LANDGRAF et al., 1996; MORENO & LANDGRAF, 1997) quando confrontados ao detectado neste trabalho (6,33%). Indices inferiores (0,18% a 3,0%) foram obtidos por RODRIGUES & HOFER (1986), RIBEIRO (1994) e NOGUEIRA (1996).

A presença do *V. vulnificus* em peixes, isolado de espécimes expostas nas feiras livres 5, 7 e 10 (Tabela 2) gera alguma controvérsia. Segundo MORENO & LANDGRAF (1997), apesar de não se ter casos documentados de infecções por *V. vulnificus* no Brasil, o crescente isolamento desta espécie é preocupante, tendo em vista que além do litoral brasileiro ser extenso, todo ele se encontra em regiões de clima tropical e temperado, com temperaturas propícias ao seu desenvolvimento.

Acrescenta-se ainda a capacidade de produção de diferentes fatores de virulência nessa espécie (RODRIGUES et., 1994) os quais mostram sua relevância em nosso meio.

Quanto às outras espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicas para o homem, ressaltamos os percentuais detectados para *V. furnissii* (3,79%), *V.damsela e V. mimicus* (2,53%) e *V. fluvialis* (1,27%).

A despeito do pequeno número de isolamento de *V. damsela* (duas amostras), esta espécie é um importante patógeno porque pode causar a morte de pessoas acometidas. LANG (1992) reportou caso de bacteremia fatal, na costa de New Jersey, por *V. damsela* em paciente de 40 anos, 48 horas após ter cortado o dedo ao limpar uma enchova contaminada, ressalta-se assim a sua importância à Saúde Pública.

Outra espécie isolada na presente investigação que pode causar doença no homem é o *Vibrio fluvialis*, o qual tem sido envolvido em casos de diarréia e vômito (MACDONEL et al.1982). Esta espécie pouco halofílica caracteriza-se pela presença especialmente em ambientes dulcícolas, sendo carreada pela correnteza para o ambiente marinho. Tem sido incriminada tanto em caso esporádicos quanto em surtos de toxinfecção alimentar em Bangladesh e Japão (KOBAYASHI & OHNABA, 1989).

Entre as consideradas não patogênicas para o homem, reporta-se os maiores percentuais para *V.orientalis* (36,73%), *V. harvey* (34,69%) e *V. anguillarum* (20,41%). Dentre estas, salienta-se a importância do *V. anguillarum* como o principal agente etiológico da vibriose em peixes marinhos e estuarinos, algumas vezes em animais de água doce. Os surtos

determinados por esta espécie , em salmonideos, são caracterizados por lesões necróticas ou furúnculos na musculatura e eritema na base das barbatanas e na boca (BULLOCK, 1987).

Quando relacionamos a distribuição das espécies em função do ecossistema (Tabela 4), verificamos maior prevalência de patógenos do gênero *Vibrio* em peixes de origem costeira (72, 56,25%). Salienta-se que nessas áreas, o nível de salinidade é mais baixo porém, a concentração de nutrientes orgânicos, oriundos de diversas fontes poluidoras é mais alta.

Estudos demonstram que a presença destes microrganismos pode ocorrer em ambientes com salinidade inferior a 0,5%, sendo a osmolaridade compensada pela temperatura elevada da água além da concentração de nutrientes orgânicos (DE PAOLA, 1981; SARKAR et al., 1985).

Espécies de *Vibrio*, incluindo *V. cholerae*, crescem naturalmente em ambientes marinhos e estuarinos; todas são hábeis para sobreviver e multiplicar-se em água contaminada com elevada salinidade e temperatura favorável (MURRAY et al., 1998).

Relacionando as espécies de *Vibrio*, patogênicas ou autóctones, com as de peixe, verificamos que Corvina (*Micropogon furnieri*) e Enchova (*Pomatomus saltatrix*) apresentaram o índice mais elevado de ambas as espécies de *Vibrio*, com evidências sobre ausência de relação parasita-hospedeiro. Do mesmo modo esta não foi estabelecida quando relacionada ao habitat (costeiro ou alto mar).

Ressaltamos ainda na tabela 4, a ocorrência de *V. anguillarum* (1 amostra) em peixe de água doce. (Curimatã - *Prochilahus* sp.). Sua presença pode ser atribuída à contaminação cruzada, proveniente das espécies marinhas, durante a manipulação do pescado exposto à venda ou mesmo, a contaminação primária, pelo fato de que *V. anguillarum* é considerado também, um patógeno de peixe de água doce (BULLOCK, 1987).

Em relação ao gênero *Aeromonas*, foram identificadas 6 espécies em um total de 11 amostras, nos 187 espécimes analisados (Tabela 5), destacando-se *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas trota* (3 cepas, 27,27%), seguindo de *Aeromonas schubertii* e *Aeromonas eucrenophila* (2, 18,18%) e de *Aeromonas veronii* (1 amostra, 9,09%).

Quando confrontamos a freqüência de amostras de *Aeromonas* detectadas, com avaliações semelhantes (NOGUEIRA, 1996), verificou-se elevado percentual por nós detectado. Considerando que os peixes analisados foram obtidos de feiras livres, cuja forma de manutenção e exposição envolve o uso de gelo preparado com água doce (potável ou não) questiona-se sobre a possibilidade de contaminação cruzada para justificar sua prevalência.

O reconhecimento de *Aeromonas* spp. em elementos do ecossistema marinho, está de acordo com as descrições de SAKAZAKI (1971); RAHMAN & WILLOUGHBY (1980) e RODRIGUES (1983), que demonstraram sua ocorrência normal em águas estuarinas e marinhas em regiões de clima tropical.

Aeromonas encontra-se amplamente disseminada no ambiente natural, principalmente na água doce, em peixes, anfíbios, bem como no homem, estando presente ocasionalmente na água marinha, poluída por esgoto ou dejetos animais (KIROV, 1993; MONTEIL & HARF-MONTEIL, 1997). O homem adquire a infecção através de feridas abertas, em contato com águas contaminadas ou pela ingestão de um número suficientemente grande de microrganismos presentes na água e alimentos; SILVA, 1999).

Certos autores consideram que somente *A. hydrophila, A. veronii e A. caviae* são patógenos intestinais (NAMDARI & BOTTONE, 1991; DEODHAR et al., 1991), e em menor grau *A. trota e A. eucrenophila* (SCHUBERT & HEGAZI, 1988; CAMAHAN et al.,1991). Segundo KOKKA et al. (1992), *A.schubertii* apresenta propriedades patogênicas semelhantes às das outras espécies para o homem.

As infecções determinadas por membros deste gênero caracterizam-se por um quadro de doença gastrintestinal com diarréia aquosa e febre moderada ou pela presença de muco e sangue nas fezes. Outras manifestações como septicemia, meningite e infecções de feridas, ouvido, olhos, tratos respiratório e urinário podem ocorrer em indivíduos jovens ou imunocomprometidos (KHARDORI & FAINSTEIN, 1988; JANDA & CLARK, 1995).

A caracterização antigênica das 17 cepas de *Aeromonas* identificadas neste estudo (Tabela 6), revelaram a presença de seis diferentes sorogrupos, O16 (duas amostras), O35 (2), O6 (1), O38 (1), O45 (1) e O54 (1) e sete amostras pertencentes a sorogrupo desconhecido.

Ressalta-se que não foi possível caracterizar duas das 17 amostras de *Aeromonas* spp. pelo fato de que uma se encontrava em fase rugosa e a outra, inviável.

Existem cerca de 90 sorogrupos reconhecidos (SHIMADA, comunicação pessoal) dentro do gênero *Aeromonas*, sendo que a caracterização do sorogrupo não é específica de espécie (THOMAS et al., 1990; SHIMADA & KOSAKO, 1991). A caracterização dos sorogrupos de maior prevalência (O16 e O35) foi também relatada por COELHO et al. (1999) entre amostras de origem humana isoladas em diferentes regiões do Brasil, demonstrando a relevância deste patógeno emergente em nosso meio.

Observou-se diferentes sorogrupos provenientes da mesma área de coleta (Tabela 6), porém não se pode fazer uma correlação entre as espécies de Aeromonas e/ou sorogrupo com tipos de peixes, uma vez que a metodologia não foi estabelecida para esse tipo de estudo porque o objetivo era só estabelecer a ocorrência dessa bactéria e distribuição no pescado oferecido ao consumidor.

Reafirma-se entre nós as observações de MURRAY et al. (1995) da utilidade da sorotipagem deste microrganismo com propósitos epidemiológicos, ou na determinação de relação intramostras de um dado genoma.

No Gráfico 2, Planilha 2 verificou-se a distribuição dos gêneros *Vibrio* e *Aeromonas* em relação ao revestimento dos peixes (couro e escamas). No cômputo geral, observou-se maior ocorrência de *Vibrio*

(81,63%) seguido de *Aeromonas* (6,12%) em peixes com revestimento de couro em relação aqueles com superfície de escamas. Esse fato parece caracterizar um maior índice de ocorrência dessas bactérias em peixes sem escamas, cujos cuidados, então, devem ser maiores durante o processo de manipulação e cozimento para evitar-se contaminação cruzada e ingestão do alimento contaminado.

A presença destas bactérias em peixes com escamas, pode ter como justificativa a capacidade de produção de quitinase por membros dos gêneros *Vibrio* (KOLLY & DAN STROH, 1988). e *Aeromonas* (LJUNG, 1987)

Esta enzima que ataca a quitina, elemento básico do exoesqueleto, escamas e carapaças, permite a fixação desses microrganismos na superfície corpórea desses animais. Desta forma, o ataque e degradação da quitina pelas bactérias produtoras de quitinase resulta em vantagem seletiva sobre outros microrganismos, principalmente em ambientes aquáticos pobres em nutrientes (MONTGOMERY & KIRCHMAN, 1994).

Por outro lado, a maior freqüência observada em peixes revestidos de couro, sugere que, além da quitina, outros fatores poderão estar envolvidos. De qualquer forma, a tentativa de estabelecer qualquer tipo de análise de confrontação desses dados com os apresentados na bibliografia, torna-se limitada pela carência de informações específicas.

No Gráfico 3, Planilha 3, quando detalhamos a freqüência de espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicas para o homem, ou não,

com o tipo de revestimento dos peixes (couro ou escamas), em um total de 128 isolados, verificamos um maior percentual (75,0%) de espécies patogênicas em peixes que possuem envoltório de couro, comparado aos que possuem escamas (55,7%). Esse resultado é bastante significativo em relação a marcante "preferência" dos Víbrios patogênicos em relação aos peixes com couro, visto que a amostragem de peixes com escamas foi o dobro da dos sem escamas. Porém, se considerarmos que é bem mais fácil coletar-se espécimes por meio de "swab" de pescado com couro do que com escamas, sugere-se, para esclarecimento futuro, a utilização das escamas, tetiradas dos peixes e colocadas em meio de transporte, no lugar dos "swabs", para efeito comparativo com a coleta de amostras por "swabs", para efeito comparativo com a coleta de amostras por "swab"de peixes sem escama e, consequentemente, verificar o efeito da metodologia sobre o isolamento de ambos, *Vibrios* e *Aeromonas*.

No peixe de couro, as estruturas semelhantes às escamas são mais curtas, tendo aproximadamente 1 mm de altura, variando de acordo com a espécie e tamanho dos animais, além de se apresentarem separadas umas das outras. Ao friccionar o "swab", obviamente ocorre um contato mais íntimo na pele, couro e sob as escamas. No caso de peixes de escamas, estas se apresentam em tamanho maior e estão parcialmente sobrepostas. Em relação aos vibrios patogênicos, tem se verificado que a porcentagem de freqüência é maior junto à pele, possivelmente em função de maior necessidade de nutrientes por estas espécies. Estudos realizados em criadouros de peixes de água doce (Tilapia) em Minas Gerais

(MURATORI,comunicação pessoal) apontam a maior freqüência de isolamento a partir da fricção dos "swabs" entre as escamas.

Nas amostras classificadas como *Vibrio cholerae* (9), não foi possível detectar, através da análise antigênica, as cepas epidêmicas *V.cholerae* O1 e O139. Entretanto ao avaliarmos a atividade fermentativa visando a biotipificação de Heiberg, no sentido de permitir um melhor rastreamento epidemiológico (Gráfico 4), verificamos que cinco amostras (55,55%) foram enquadradas no Grupo I (Arabinose - Manose + e Sacarose +), isto e, apresentaram caracteristicas idênticas a amostra epidêmica *Vibrio cholerae* O1. As quatro restantes enquadraram-se nos Grupos II e III (2 amostras cada, 22,22%,). Estes dados estão em concordância com os de RIBEIRO (1994) e NOGUEIRA (1996) que obtiveram percentuais de 63,7% e 73,33% das amostras de *Vibrio cholerae* O1 no grupo I de Heiberg. Tal fato caracteriza a importância do ecossistema marinho na manutenção desta espécie, que também é responsabilizada por quadro diarréico do tipo coleriforme ou secretória no homem (KOBAYASHI & HONAKA, 1989).

A presença de fatores enzimáticos possivelmente envolvidos em processo de patogenicidade, foi pesquisada nas amostras pertencentes a *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* e nas espécies de *Aeromonas* (dados não catalogados em tabelas). Destacou-se a presença de uma cepa de *Vibrio parahaemolyticus* revelando atividade hemolítica no Agar Wagatsuma (Kanagawa positiva), sendo também observado, que esta cepa foi originária de espécimens Enchova (*Pomatomus saltatrix).*

Quanto a resposta positiva no teste de Kanagawa em uma cepa de *Vibrio parahaemolyticus*, este fenômeno representa uma exceção às observações realizadas em outras áreas do mundo, principalmente nos países de clima temperado (West,1989), tendo em vista a citação que somente 1% das amostras de ambiente apresentam esta característica (BINTA et al., 1982; SARKAR et al., 1985; HOFER & SILVA, 1986; WEST, 1989; MATTÉ et al.1994).

O teste de Kanagawa é de valor na avaliação da provável enteropatogenicidade de *Vibrio parahaemolyticus*, isolado de pacientes humanos ou de alimentos de origem marinha suspeitos de casos de toxinfecções alimentares, não sendo, aplicável no estudo de Vibrios presentes no ambiente marinho (LEITÃO & ARIMA, 1975). No entanto, o encontro de cepas Kanagawa negativas, isoladas de casos de doença sugere que o fenômeno de Kanagawa não é um indicador absoluto de patogenicidade do *Vibrio parahaemolyticus* (KELLY & STROH, 1989), tendo em vista que duas diferentes enzimas estão envolvidas no mecanismo de patogenicidade (TDH e TRH) sendo esta última de maior prevalência entre amostras Kanagawa negativas, isoladas de pacientes. Nesse caso, as amostras de Vibrios Kanagawa negativas, isoladas de pescado nesse estudo, podem ter repercussão na Saúde Pública.

Talvez este resultado, do mesmo modo que aqueles obtidos por KARUNASAGAR & MOHAMKUMAR (1980) em águas estuarinas, peixes, moluscos e mangues, na Índia, RODRIGUES et al. (1993) em água do mar e alimentos marinhos, RIBEIRO (1994) e NOGUEIRA (1996), em

pescado, Rio de Janeiro, demonstre que existem condições favoráveis para a manutenção deste microrganismo nos diversos ecossistemas aquáticos.

Apontamos para o fato do peixe do qual foi isolado *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivo, Enchova (*Pomatomus saltatrix)* ser de origem oceânica, o que pode sugerir uma maior contaminação do ambiente de origem ou que esta tenha ocorrido durante a manipulação.

De um modo geral é possível verificar que diferentes espécies dos gêneros *Vibrio* e *Aeromonas* são capazes de produzir enzimas extracelulares, envolvidas no processo de agressão (JANDA et al., 1988; RODRIGUES et al., 1993; MONTEIL & HARF-MONTEIL, 1997).

Apesar do fato de que em nosso trabalho, a análise da produção de colagenase e elastase, tenha resultado negativa, ressalta-se a necessidade de investigar outros atributos de virulência, de modo a permitir um efetivo reconhecimento do potencial patogênico das amostras em estudo.

A literatura sugere que a ocorrência de fatores hemolíticos em *Aeromonas* são amplamente disseminados (POPOFF, 1984; HICKMAN-BRENNER et al., 1987; HIRONO & AOKI, 1993). Tem sido proposto a ocorrência de pelo menos duas toxinas hemolíticas em espécies virulentas e que estas toxinas podem contribuir para a diarréia (WONG et al. 1998).

A produção de hemólise em agar sangue de carneiro a 5% foi detectada em apenas uma cepa (5,88%) de *Aeromonas* (*A. hydrophila*.O35)

Percentuais superiores foram obtidos NEVES et al.(1990) e KOKKA et al. (1992) que obtiveram 93% e 64% das cepas de *Aeromona veronii* e *A. schubertii,* respectivamente, produtoras de β-hemolisina em agar

sangue de carneiro a 5%, enquanto COELHO et al.(1999), apontam baixo percentual de cepas de origem humana hemolisina positiva.

Em síntese, considerando-se a ampla distribuição de membros das famílias *Vibrionaceae* e *Aeromonadaceae* em todos os exemplares de peixes analisados, a presença destes microrganismos como autóctones no ambiente aquático, o envolvimento de algumas espécies com doenças do pescado, especialmente em cativeiro, como também em processo de agressão ao homem, torna-se de fundamental importância o controle da qualidade higiênico-sanitária do pescado.

Do mesmo modo, tendo em vista as diversas possibilidades de disseminação desses microrganismos, já no ambiente aquático, ou durante as diferentes etapas de manipulação, desde a captura, transporte, distribuição até o consumo, salienta-se a necessidade de uma extensa e permanente campanha de educação sanitária, visando limitar ou diminuir os fatores de risco e a contaminação cruzada.

Tabela 1: Distribuição numérica de *Vibrio* spp. e *Aeromonas* spp. isoladas de pescado, de 10 feiras livres, no município do Rio de Janeiro.

Grupo*	Feiras livres										
	01	**02**	**03**	**04**	**05**	**06**	**07**	**08**	**09**	**10**	**Total**
A	06	01	0	01	11	02	19	08	08	23	79
B	02	0	0	0	09	07	13	03	04	11	49
C	16	09	13	13	09	15	35	18	12	60	200
D	0	02	0	0	03	02	04	01	01	04	17
Total	24	12	13	14	32	26	71	30	25	98	345

*A- espécies potencialmente patogênicas de *Vibrio* B- espécies não patogênicas de *Vibrio*.
C- *Vibrio* spp (espécies não determinadas) D - *Aeromonas* spp.

Tabela 2: Distribuição das espécies de *Vibrio* e *Aeromonas* de acordo com a origem e época de coleta.

Feira	Data	Microrganismos
01	24/09/98	*V. cholera não O1,V.mimicus, V.harvey, V.mediterranei, Vibrio* spp
02	26/09/98	*V. damsela, Vibrio* spp., *Aeromonas trota, A. veronii*
03	27/09/98	*Vibrio* spp
04	06/10/98	*V.parahaemolyticus Vibrio* spp
05	11/10/98	*V.alginolyticus, V.vulnificus, V.carchariae, V.cincinnatiensis, V.anguillarum, V.harveyi, V.orientalis, Vibrio* spp, *Aeromonas trota, Aeromonas* spp.
06	15/10/98	*V.cincinnatiensis, V.anguillarum, V.harveyi Vibrio* spp, *Aeromonas hydrophila*
07	18/10/98	*V.alginolyticus, V.carchariae, V. cholera não O1, V.mimicus, V.harvey V.parahaemolyticus, V. vulnificus, V. orientalis, V.;meschnikovii, Vibrio* spp, *A. eucrenophila, Aeromonas* spp
08	20/10/98	*V.alginolyticus, V.carchariae, V. cholera não O1, V. damsela, V.fluvialis, V. costicola, V. orientalis, Vibrio* spp., *Aeromonas hydrophila.*
09	03/11/98	*V.alginolyticus, V.carchariae, V. furnissii, V.anguillarum, V. orientalis, Vibrio* spp, *A. schubertii, Aeromonas* spp.
10	03/11/98	*V.alginolyticus, V.carchariae, V.cincinnatiensis, V. metschnikovii, V.parahaemolyticus,V. vulnificus, V. orientalis, V.harvey ,V.aestuarinus, V.furnissii, Vibrio* spp. , *A. schubertii, A. hydrophila, Aeromonas* spp.

Tabela 3. Distribuição das 128 espécies de *Vibrio* (potencialmente patogênicas e não patogênicas) de acordo com a origem, de pescados comercializados em feiras livres, no município do Rio de Janeiro.

Vibrio spp.	Feiras livres										Total
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	
Patogênicos (n=79 / 128)											
V. alginolyticus	-	-	-	-	02	-	02	02	02	11	19 (24,05)
V. carchariae	-	-	-	-	07	-	02	03	04	03	19 (24,05)
V. parahaemolyticus	-	-	-	01	-	-	08	-	-	01	10 (12,66)
V. cholerae não O1	05	-	-	-	-	02	01	01	-	-	09 (11,39)
V. metschinikovii	-	-	-	-	-	-	01	-	-	05	06 (7,59)
V. vulnificus	-	-	-	-	01	-	03	-	-	01	05 (6,33)
V. furnissii	-	-	-	-	-	-	-	-	02	01	03 (3,79)
V. cincinatiensis	-	-	-	-	01	-	01	-	-	01	03 (3,79)
V. damsela	-	01	-	-	-	-	-	01	-	-	02 (2,53)
V. mimicus	01	-	-	-	-	-	01	-	-	-	02 (2,53)
V. fluvialis	-	-	-	-	-	-	-	01	-	-	01 (1,27)
Autóctones (N=49/128)											
V. orientalis	-	-	-	-	06	-	03	01	03	05	18 (36,73)
V. harvey	01	-	-	-	02	01	10	-	-	03	17 (34,69)
V. anguillarum	-	-	-	-	01	06	-	-	01	02	10 (20,41)
V. costicola	-	-	-	-	-	-	-	02	-	-	02 (4,08)
V. aestuarinus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	01 (2,04)
V. mediterranei	01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01 (2,04)

Os percentuais foram calculados sobre o total de *Vibrio* patogênicos (79) e não patogênicos (49)

Tabela 4. Distribuição das 17 espécies de *Vibrio* isoladas de pescado oriundas de 10 feiras livres no município do Rio de Janeiro de acordo com os peixes e seu habitat.

	Vibrio spp.	Alto mar						Costeiro										Água doce	Total
		Dourado	Enchova	Congro rosa	Namorado	Pargo	Batata	Corvina	Corvina de lama	Pescada verdadeira	Pescadinha	Sardinha	Vermelho ciaba	Verm. olho de cão	Cherne	Galo	Xerelete	Curimatã	
PATOGÊNICOS	*V. alginolyticus*	1	3	1	5	0	1	4	0	1	0	0	0	1	0	0	2	0	19
	V. carchariae	0	1	5	4	1	0	3	1	0	1	1	0	0	0	0	2	0	19
	V. parahaemolyticus	0	3	0	0	0	1	3	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	10
	V. cholerae não O1	0	2	1	1	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	9
	V. metschinikovii	0	1	0	0	1	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	6
	V. vulnificus	0	1	0	0	0	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	5
	V. furnissii	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	V. cincinatiensis	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	V. damsela	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2
	V. mimicus	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
	V. fluvialis	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Subtotal	**1**	**12**	**7**	**13**	**2**	**4**	**14**	**5**	**5**	**7**	**2**	**0**	**1**	**0**	**1**	**5**	**0**	**79**
NÃO PATOGÊNICOS	*V. harvey*	0	2	1	1	1	0	4	1	4	1	0	0	0	2	0	0	0	17
	V. anguillarum	0	4	0	0	1	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	10
	V. costicola	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	V. aestuarinus	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	V. mediterranei	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	V. orientalis	2	1	3	1	1	0	5	0	3	1	0	0	1	0	0	0	0	18
	Subtotal	**2**	**8**	**4**	**3**	**3**	**0**	**13**	**1**	**7**	**2**	**0**	**1**	**1**	**2**	**0**	**1**	**1**	**49**
Total		**3**	**20**	**11**	**16**	**5**	**4**	**27**	**6**	**12**	**9**	**2**	**1**	**2**	**2**	**1**	**6**	**1**	**128**

Tabela 5. Distribuição das 11 cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de pescado oriundas de 10 feiras livres no município do Rio de Janeiro de acordo com as espécies de peixe .

Pescado	*A.hydrophila*	*A. trota*	*A. schubertii*	*A. eucrenophila*	*A.veronii*	Total
Congro Rosa	01	01	-	-	-	02
Cherne	-	-	-	01	-	01
Corvina	-	01	01	01	-	03
Dourado	-	01	-	-	-	01
Pescada	-	-	01	-	-	01
V. Siaba	02	-	-	-	-	02
Sardinha	-	-	-	-	01	01
Total*	**03 (27,27%)**	**03 (27,27%)**	**02 (18,18%)**	**02 (18,18%)**	**01 (9,09%)**	**11 (99,99%)**

* % calculado sobre 11 cepas de *Aeromonas*

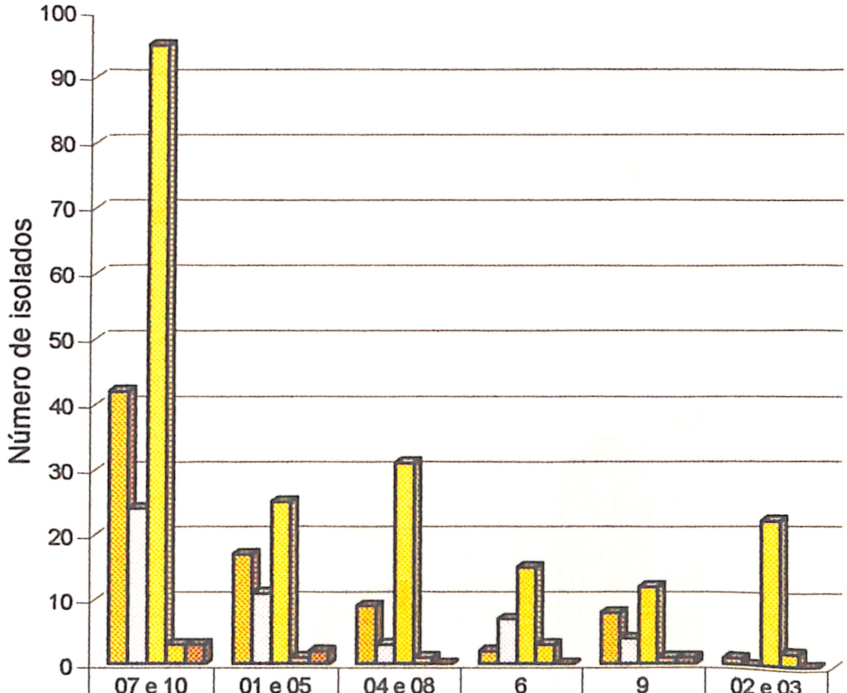
Tabela 6. Perfil sorológico das cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de pescado oriundas de sete feiras livres no município do Rio de Janeiro.

Feira	Peixe	Sorogrupo	*Aeromonas* spp.
02	Dourado	O45	*A. trota*
	Sardinha	O6	*A. veronii*
05	Congro Rosa	ND	*A. trota*
	Curimatã	ND	*Aeromonas* spp.
	Curimatã	ND	*Aeromonas* spp.
06	Ciaba	O35	*A. hydrophila*
	Ciaba	O38	*A. hydrophila*
	Corvina	Rugosa	*A. eucrenophila*
07	Cherne	O35	*A. eucrenophila*
	Xerelete	ND	*Aeromonas* spp.
08	Congro Rosa	O54	*A.hydrophila*
09	Pescada	ND	*A. schubertii*
	Pescada	O16	*Aeromonas* spp.
10	Corvina	Inviável*	*Aeromonas* spp.
	Corvina	O16	*A. schubertii*
	Pargo	ND	*Aeromonas* spp.
	Corvina	ND	*A. trota*

ND = Não determinado

* = Sem crescimento

Gráfico 1, Planilha 1. Distribuição dos isolados de Vibrio spp e Aeromonas spp de acordo com a origem.



	07 e 10	01 e 05	04 e 08	6	9	02 e 03
Vibrio patogênico	42	17	9	2	8	1
Vibrio não patogênico	24	11	3	7	4	0
Vibrio spp	95	25	31	15	12	22
Aeromonas*	3	1	1	3	1	2
Aeromonas spp	3	2	0	0	1	0

* caracterizadas quanto 'a espécie

Gráfico 2, Planilha 2. Freqüência dos gêneros *Vibrio* (espécies patogênicas e não patogênicas) e *Aeromonas* de acordo com o revestimento dos peixes

	Couro	Escama
Total	49	138
Vibrio	40 (81,63%)	88 (63,776%)
Aeromonas	03 (6,12%)	08 (5,79%)

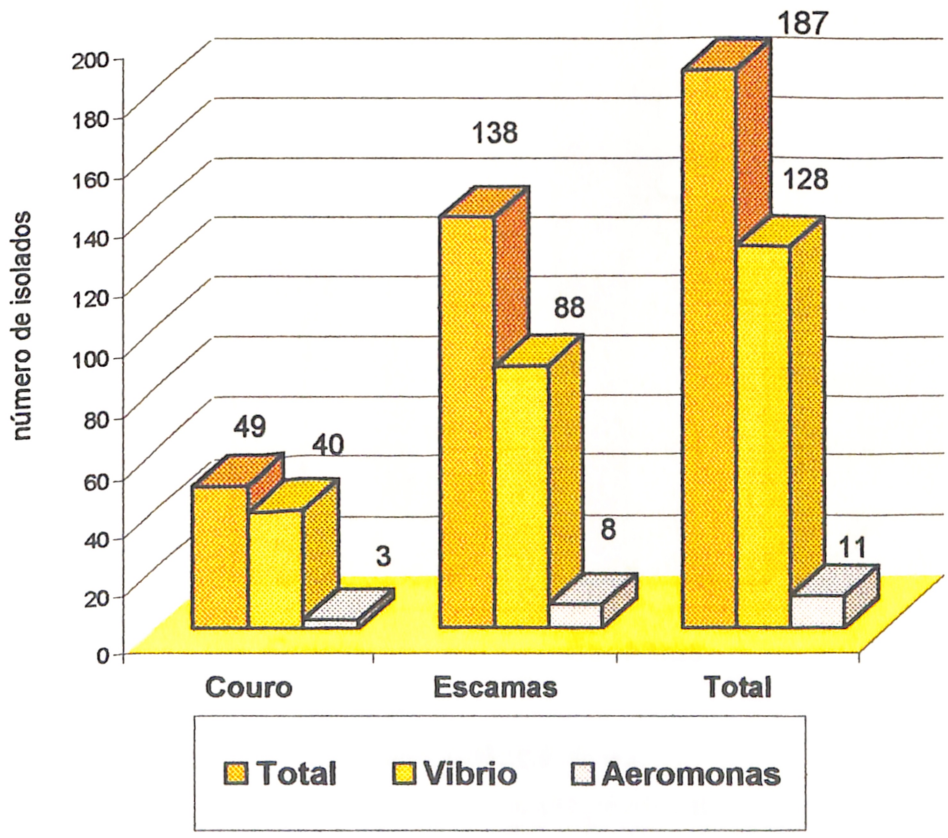


Gráfico 3, Planilha 3. Distribuição das espécies de *Vibrio* patogênicas e não patogênicas, de acordo com o revestimento dos peixes.

	Couro	Escama
Total	40 (100%)	88 (100%)
Vibrio patogênicos	30 (75,0%)	49 (55,7%)
Vibrio não patogênicos	10 (25,0%)	39 (44,3%)

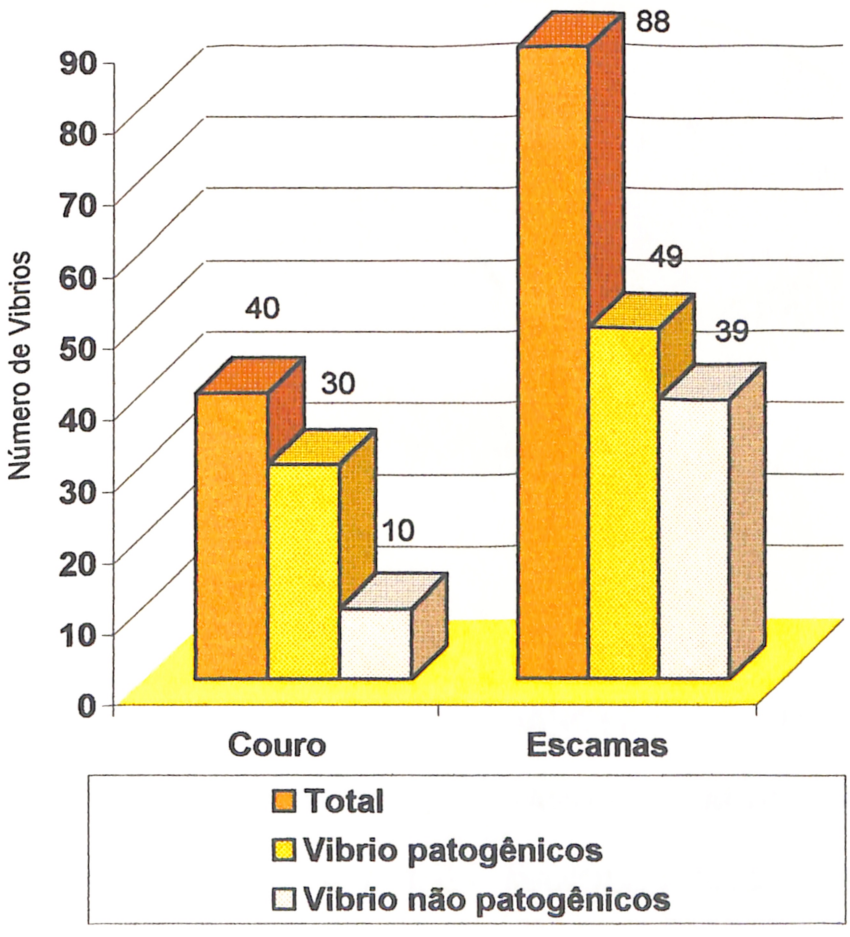
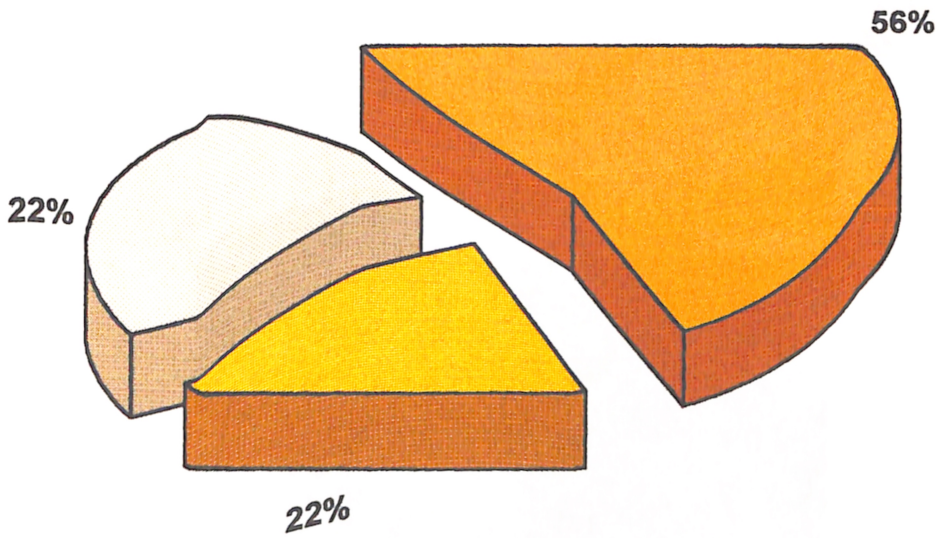
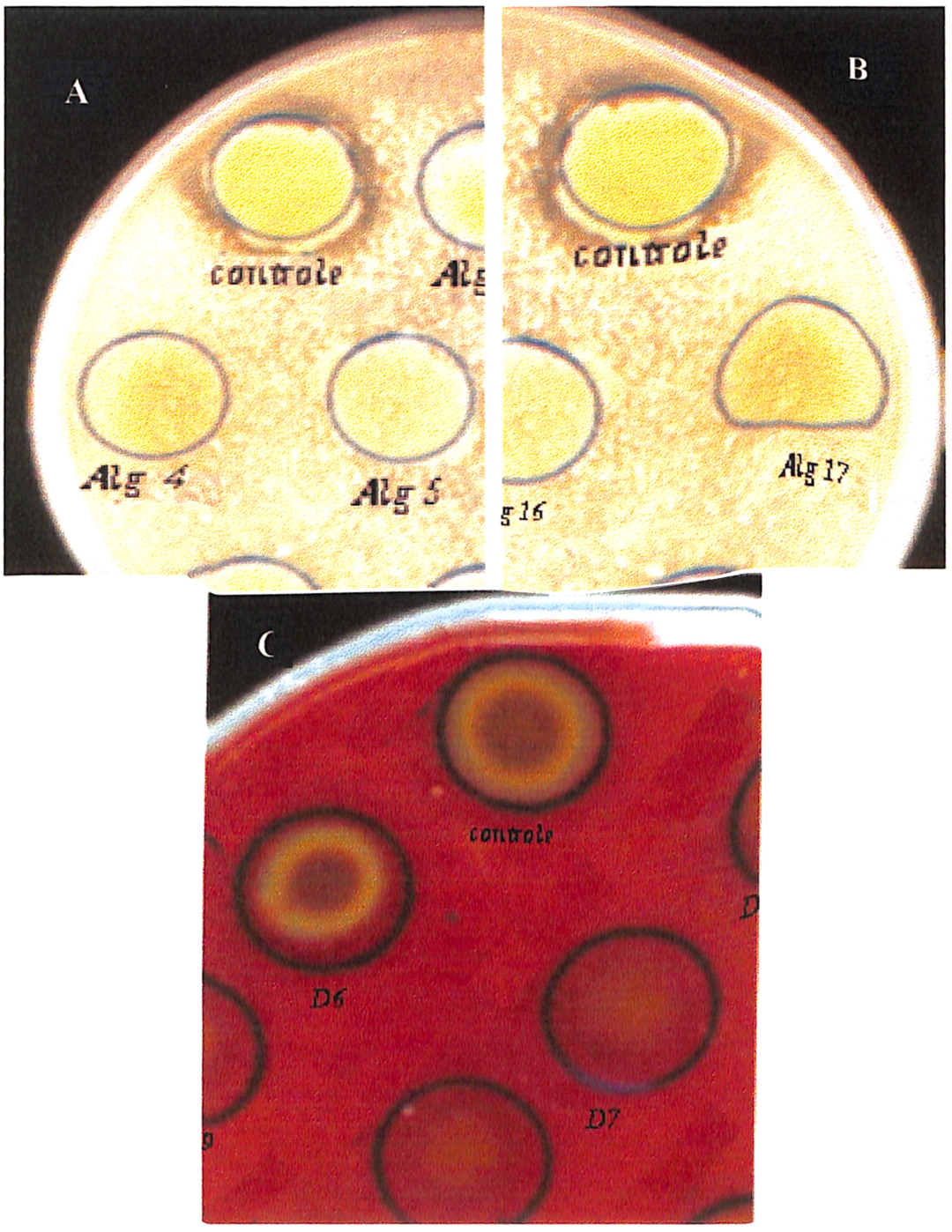


Gráfico 4. Classificação das nove cepas de *V. cholerae* não O1 segundo o esquema de Heiberg





Prancha 1.

A e B - Prova da colagenase (negativa) nas amostras de *V. alginolyticus*

C - *Aeromonas hydrophila* - hemolisina positiva (amostra D6)

5.CONCLUSÕES

A análise dos 187 espécimes de peixes expostos e comercializados em 10 feiras livres, no município do Rio de Janeiro, para a presença de representantes dos gêneros *Vibrio* e *Aeromonas* nos permitiu concluir que:

- Existem elevado número de espécies diferenciadas de *Vibrio* spp e *Aeromonas* spp entre os exemplares de peixe de feiras livres.

- Aponta-se a caracterização de 79/345 cepas de *Vibrio* potencialmente patogênicos para o homem nas amostras estudadas, com prevalência de *V. alginolyticus*, *V. carchariae* e *V.parahaemolyticus*.

- Entre as amostras de *V. cholerae* não O1 a maior ocorrência detectada foi do Grupo I – Heiberg, o qual apresenta características bioquímicas idênticas ao *V. cholerae* O1.

- O tipo de revestimento dos peixes parece ter influenciado no isolamento das bactérias sob estudo.

- As espécies potencialmente patogênicas de *Vibrio*, ocorremram com maior frequência (75%) em peixes com envoltório de couro, do que com escamas (55,7 %).

- Nas espécies de peixes Corvina (*Micropogon furnieri*) e Enchova (*Pomatomus saltatrix*), foi observada elevada ocorrência tanto de espécies de *Vibrio* potencialmente patogênicas ao homem como autóctones.

- O elevado percentual de *Aeromonas* spp. detectado alerta para a possibilidade de contaminação cruzada a partir de água utilizada na refrigeração do pescado.

- O fenômeno de Kanagawa foi detectado em 1 (10%) do total de amostras de *V.parahaemolyticus* isolados.

- Alerta-se para a necessidade de ofertar orientação sob o ponto de vista sanitário para os profissionais que manipulam e comercializam o pescado, e divulgação sobre os cuidados higiênicos ao consumidor, para evitar contaminação cruzada e utilizar somente estes alimentos após cocção adequada.

6. Meios de cultura e reagentes:

Os meios de cultura foram, na sua maior parte, os comercializados sob a forma desidratada. Por isso, no presente tópico, serão descritas apenas as fórmulas dos meios não industrializados.

6. 1. Água Peptonada Alcalina 1% de NaCl, segundo STRAKAS & STOKES (1957):

Composição: Peptona	10,0 g
Cloreto de sódio	10,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Técnica: Juntar os componentes, ajustar o pH a 7,2 +/- 0,2, distribuir em tubos de ensaio (15x150 mm), 10 mL por tubo. Esterilizar em autoclave a 121^{0}C durante 15 minutos.

6.2. Agar Wagatsuma (reação de Kanagawa) - ITAL, 1995:

Composição:		
	Peptona	10 g
	Extrato de levedura	3,0 g
	Fosfato dissódico($Na_2 HPO_4$)	5,0 g
	NaCl	7,0 g
	Manitol	10,0 g
	Cristal violeta(1 ml da sol. aq. 0,1%)	0,001g
	Agar	15,0 g
	Agua destiiada q.s.p.	1000 mL
	pH: 8,0	

Técnica: Dissolver os ingredientes, exceto o agar e o corante, e ajustar o pH em 8,0. Adicionar o ágar e aquecer apenas o tempo necessário para a completa fusão. Não autoclavar. Separadamente, lavar uma amostra de eritrócitos humanos tipo "O" por três vezes em salina fisiológica (0,85%) e reconstituir para o volume de sangue original. Adicionar 2 mL dos eritrócitos lavados a cada 100 mL do meio resfriado a 50^0 C e verter em placas imediatamente.

6. 3. Meio base para a fermentação de carboidratos, segundo COSTA & HOFER, 1972:

Composição:		
	Peptona	10,0g
	Extrato de carne	3,0 g
	Cloreto de sódio	5,0 g
	Indicador de Andrade	10,0 mL
	Água destilada q.s.p.	1000 mL

Técnica: Ajustar o pH a 7,2. Distribuir em tubos, volumes de 5 ml, e esterilizar em autoclave a 121^{0}C por 15 minutos. Os substratos fermentáveis como a glicose, manita, lactose e sacarose são incorporados ao meio na concentração final de 1%. A arabinose e a manose são esterilizadas por filtração em filtros de Seitz e distribuídos 1 mL em tubos.

A presença de ácidos no meio, em função do metabolismo dos microrganismos, é revelada através da viragem do indicador de Andrade para uma coloração vermelha.

Indicador de Andrade

fucsina ácida	0,5 g
água destilada	100,0 mL
NaOH 1N	16,0 mL

Técnica: dissolver a fucsina ácida em água destilada. Ajustar o pH (7,0 - 7,2) com NaOH.

6. 4. Agar mCPC -

Combinação de duas soluções:

Solução 01:

Bacto-Peptona	10,0 g
Extrato de Carne	5,0 g
NaCl	20,0 g
Azul de Bromotimol	40,0 mg
Vermelho de Cresol	40,0 mg

Ágar	15,0 g
Água destilada q.s.p.	900 mL

Técnica: Ajustar o pH em 7,6

Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

Esfriar até 55°C.

Solução 02 :

Cellobiose	15,0g
Colistina1,	36 x 10^6 U
Polimixina B	10^5 U
Água destilada q.s.p.	100 mL

Esterilizar por filtração

Adicionar a solução 02 a solução 01 resfriada a 55°C

Cor do meio : Verde oliva a marrom claro.

6. 5. Teste de halofilismo (crescimento em 0, 3, 6, 8 e 10% de NaCl)

Base:

Bacto tryptone (Difco)	10,0 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Ajustar o pH a 7,0 e adicionar o cloreto de sódio, de acordo com a concentração desejada:

3g de NaCl/100 mL da base

6g de NaCl/100 mL da base

8g de NaCl/100 mL da base

10g de NaCl/100 mL da base

Inocular uma alçada de cada cultura em tubos de Caldo triptona 1% suplementado com a quantidade adequada de NaCl e incubar a 37^0C por 24 horas e observar se há crescimento (turvação do meio). Cada espécie de víbrio tem um comportamento frente ao requerimento de sal o que permite diferenciá-las e caracterizá-las em paralelo com outras provas bioquímicas.

6. 6. Confecção dos discos para o teste de sensibilidade ao composto O/129 (2,4 diamino-6,7-di-isopropil – pteridine, Sigma) – WEST & COLWELL, 1984.

Discos:

Os discos com 6 mm devem ser preparados usando papel Whatmenn n° 3. Esterilizar a 121° C por 15 minutos e secar na estufa.

Soluções:

1- Discos com 10mcg de concentração: solução de 5mg de O129 em 10 mL de água destilada estéril.

2- Discos com 150mcg de concentração: solução de 75mg de O129 em 10 mL de água destilada estéril.

Impregnação dos discos:

Embeber os discos individualmente com 0,02 mL da solução. Secar em estufa a 37°C e conservar em geladeira até o momento do uso.

7.REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ABBOT, S.L., JANDA, J.M. 1994. Severe gastroenteritis associated with *Vibrio hollisae* infection: report of two cases and review. Clinical Infectious Diseases. **18**: 310-2

ALBERT, M. J.; KABIR, I.; NEOGI, P. K. B. & KIBRIYA, A. K. M. G. 1992.*Vibrio mimicus* bacteremia in a child. J. Diarrheal Dis. Res. **10**: 39-40.

ALBERT, M.J. 1994. Vibrio cholerae O139 Bengal. J.Clin. Micriobiol. **32**: 2345-2349.

ALDOVA, E., LAZNICKOVA, K., STERPANKOVA, E. & LIETAVA, J. 1968. Isolation of non agglutinable vibrios from na enteritis outbreak in Czechoslovakia. Journal of Infectious Diseases. 118:25-31.

ALVES, D. C. C.; THEOPHILO, G. N. D.; DIAS,J. C. A . R.; DUQUE, S.S. ; NOGUEIRA,M.S.; ERNANDEZ, D.; RODRIGUES D.P.; NOGUEIRA, J. M. R. & RIBEIRO, R.V. 1997. Características de *Aeromonas spp.* de origem humana. XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia.:42

ALVES, D.C.C.; MAGALHÃES H.; LÁZARO N.S.; LIBERAL M.H.T.; V.M.GONÇALVES; M.R.N. ZAMORA; F.B.RANGEL FO; RODRIGUES D.P. & HOFER E.1997. Características de virulência em *Aeromonas* spp. isoladas de diferentes fontes. XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia.: 111.

ARNAU, A.; AMARO, C.; PUJALTE, M. J. & GARAY, E.1988. The annual cycle of zooplankton associated with Vibrio cholerae and related vibrios in Albufera lake and its coastal surrounding waters Valencia, Spain. Microbiol. Sociedad Espnañola de Microbiologia. 5: 45-49.

AUSTIN, B. & ALLEN-AUSTIN, D. 1985. A review. Bacterial pathogens of fish. J. Appl. Bacteriol. 58: 483-506.

BADDOUR, I. M. & BASEESEL, V. S. 1988 .Pneumonia due to *A.hydrophila* complex epidemiologic, clinical microbiological, features. South. Med. J. 81: 461-3.

BAHEMAN,I.U.R. P.SERAMPEER, M.OUNHA, B. A.1988. *A.hydrophila* cellulitis and wound infections caused by waterbone organisms Heart & Lung. 17:99-102.

BARROS, G.C. & VIANNI, M.C.E. 1980. *Vibrio parahaemolyticus*, isolamento e identificação em águas da Baía da Guanabara. Revista Latinoamericana de Microbiologia.22 :163-9.

BERGEY's 1994. Manual of Determinative Bacteriology, 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins.

BINTA, M.G.; NYAGA, P.N. 1982. The distribution of Vibrio parahaemolyticus serotypes in Kenyan seafish, shellfish, marine water and sediments. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 76:497-9.

BLAKE, P.A., WEAVER, R. E. & HOLLIS, D. G. 1980. Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. Annual review of microbiology. 34:341-367.

BOCKEMUHL, J., ROCH, K., WOHLERS, B., ALEKSIC, V. ALEKSIC, E. , WOKATSCH, R. 1986. Seasonal distribution of facultatively

enteropathogenic vibrios (*Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus*) in the freshwater of the Elba River at Hamburg. *Journal of Applied Bacteriology*. 60: 435-42.

BOIKO, A.V.; POGORELOBA, N.P.; ZHIGAREVA, T.M. 1994. Ecological and epidemiological aspects of the spread of *Vibrio parahemolyticus* in freshwater region. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 3: 49-51.

BRASIL, 1994. Ministério da Saúde, Comissão Nacional de Prevenção da Cólera. Manual Integrado de Prevenção e Controle da Cólera Brasília.

BUCK, J. D.& MCCARTHY, S.A.1994. Occurrence of non-O1 *Vibrio cholerae* in Texas Gulf Coast dolphins (Tursiops truncatus). Lett. Appl. Microbiol. 18: 45-46.

BULLOCK, G. L. 1987. Revision of fish disease leaflet 77, Vibriosis in fish. United States Department of the interior, Fish and Wildlife Service, Division of Fisheries and Wetlands Research, Washington.

CARDONHA, A. M. S. ; CASIMIRO, A. R. S. & VIEIRA, R.H.S.F. 1994. Identificação de bactérias psicotróficas em caudas de lagosta, durante processo industrial com tripolifosfato de sódio. Higiene Alimentar. 8:29-34.

CARNAHAN, A.M.; CHAKRABORTY, T.; FANNING, G. R.; VERRNA, D.; ALI, A.; JANDA, J. M. & JOSEPH, S. W. 1991. *Aeromonas trota* sp nov, ampicillin susceptible species isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 29:1206-10.

CARNAHAN, A.M.; HARDING, J. WASTKY, D.; HANSMAN, S. 1994.Identification of Vibrio hollisae associated with severe gastroenteritis after consumption of raw oysters. Journal of Clinical Microbiology.32: 1805-6.

CASTILHO, L. E.; WINSLOW, D. L. & PANKEY, G. A. 1981. Wound ingection an septic shock due to *Vibrio vulnificus*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 30: 844-848.

CERUTTI, R.L., BARBOSA, T.C.P.1991. Flora bacteriana heterotrófica em ostras, (Crassostrea rhizophorae) e águas da baia norte, ilha de Santa Catarina, Brasil. Revista de Microbiologia. 22,4: 330-4.

CHALLAPAIIL, M.; HSS,R. R.; CUNNINGHAM, D. G.; CHOPRA,A. K. & HOUSTON, C. W. 1988. *Aeromonas* associated diarheae in children .Pediatric. Infect. Dis.7:693-8.

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

COELHO, B. A., MELLO, D. M. & RODRIGUES, D. P. 1999. Características de *Aeromonas* spp. isoladas de fonte humana no período de 1998 à 1999. XX Congresso Brasileiro de Microbiologia.:125.

COLLINS M. D.; MARINEZ-MURCIA A. J. ; CAI, J. 1993. *Aeromonas enteropelogenes* and *Aeromonas ichthiosma* are identical to *Aeromonas trota* and *Aeromonas veronii* respectively as revealed by small-subunit rRNA sequence analysis. Int. J. Sys. Bacteriol. **43**:855-6.

COLWELL, R. R.; LOBELACE, T. E.; WAN, L.; KANEKO, T.; STALEY, T., CHEN, P. K. & TUBIASH, H. 1973. *Vibrio paraemolyticus* isolation, identification, clasification, and ecology. J. Milk Food Technol. **36**: 202-213.

COLWELL,R. R. ; MACDONELL, M. T. & DE LEY, J. 1986. Proposal to Recognize the Family *Aeromonadaceae* fam. Nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **36** : 473-477.

CONSTANTINIDO, G. 1994. A saúde do pescado depende diretamente da saúde do ambiente. Higiene alimentar,(apresentado no 1° Seminário de Vigilância Sanitária Pesqueira: Qualidade dos Pescados, São Paulo. **8**: 5-6.

COOK, D.W. & RUPLE, A.D. 1989. Indicator bacteria and Vibrionaceae multiplication in Post-Harvest Shellstock Oysters. Journal of Food Protection 52: 343-9.

COOK, D.W. 1997. Refrigeration of oyster shellstock: conditions wich minimize the outgrowth of *Vibrio vulnificus*. Journal of Food Protection.**60**:349-52.

COSTA, G.A. & HOFER, E. 1972. Isolamento e Identificação de enterobactérias. Instituto Oswaldo Cruz. 120.

DALSGAARD, A. & HOI, L. 1997. Prevalence and characterization of *Vibrio vulnificus* isolated from shrimp products imported into Denmark. Journal of Food Protection.**60**:1132-5.

DE PAOLA, A. 1981 *Vibrio* cholerae in marine foods and environmental waters: a literature review. J. FoodSci. **46**:66-70.

DEODHAR, L. P.,SARAWATHI, K., VARUDKAR, A.1991. *Aeromonas* spp and their association with human diarrheal disease. J. Clin. Microbiol. **29**:853-6.

DePAOLA, A., CAPERS, G.M., ALEXANDER, D. 1994 .Densities of *Vibrio vulnificus* in the intestines of fish from U.S. Gulf Coast. Applied and Environmental Microbiology.**60**: 984-8.

DOYLE, M.P. 1992. A new generation of foodborne pathogens. Dairy Food and Environmental Sanitation. **12** :490-3.

DOYLE, M.P. 1994. The emergence of new agents of foodborne disease in 1980s. Food Research International. **27** :219-26.

ESTEVE, C., AMARO, C., BIOSCA, E. G., GARAY, E. 1995. Biochemical and toxigenic properties of Vibrio furnissii isolated from a European eel farm. Aquacult. 132 :81-90.

FARIÑAS, L. B.; BOADA, R.M.; BLANCO, M. G. & VALDIVIESO, S. C. D. 1993. Identificación de bacilos gramnegaticos, anaerobios facultativos, oxidasas positivos. Inst.de Med. Trop. "Pedro Kouri". Rev. Cubana Med. Trop. **45**: 46-48.

FIGUEROA, G.; GALENO, H.; SOTO V.; TRONCOSO,M.; HINRICHSEN, V.& YUDELEVICH, A.1988. Enteropathogenicity of *Aeromonas* species isolated from infants: A colhort study J. Infect. **17**:205-13.

FIORE, A. et al. 1996. Antibodies that react with the capsular polysaccharide of Vibrio vulnificus are detectable in infected patients, and in persons without known exposure to the organism. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 24: 165-167.

FISHBEIN, M. & WENTZ, B. 1973.Vibrio parahaemolyticus methodology for isolation from seafoods and epidemic specimens. Journal of Milk and Food Technology.36:118-23.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION- 1992. Bacteriological Analytical Manual. 7a ed., Cap. 9 :111-40.

FOUZ, B.; BARJA, J. L.; RIVAS, C.; AMARO, C. & TORANZO, A. E.. 1993. Toxicity of the extracellular products of *Vibrio damsela* isolated from diseased fish. Curr. Microbiol. 27: 341-347. RODRIGUES, D. P.; RIBEIRO, R. V. & HOFER, E. 1994. Enterobactérias Patogênicas no Solo de Áreas de Recreação de Cidade do Rio de Janeiro-RJ. R. Bras. Med. Vet., 16: 256-259.

FRANCA, S.M.C., GIBBS, D.L., SAMUELS, P. , JR, N.D.J. 1980. *Vibrio parahaemolyticus* in Brazilian Coastal Waters. Journal of American Medical Association . 244 :587-8.

FRANCO, B.D.G.M. & LANDGRAF, M. 1996. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: Microbiologia dos Alimentos. Ed. Atheneu. :33 - 81.

FUJINO, T. ; OKUNO, Y.; NAKADA, D.; AOYAMA, A.; FUKAI,K.; MUKAI, T. & UENO, T.1953. Med. J. Osaka Univ. 4:299-304.

FUJINO, T.; OKUDO, Y.; NAKADA, D.; AOYAMA, A.; FUKAI, K.; MURAI, K. & UEHO, T. 1951. On the bacteriological examination of shirasu food poisoning. J. Jap. Associ. Infect. Dis.25:11.

GARCIA M.ORENO, M. L.& LANDGRAF, M. 1997. Ocorrência de *Vibrio vulnificus* em Alguns Alimentos de Origem Marinha. Ciência Tecnologia Alimentos. 17: 177-180.

GELLI, D.S., IACHIBANA, T., SILVA, T.M.P. 1975. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras e outros produtos marinhos no litoral de São Paulo, Brasil. Revisão e considerações sobre o risco

potencial para a saúde pública. Revista do Instituto Adolfo Lutz. **35/36** :9-16.

GHOSH, A. R., KOLEY, H., D., GARG, S., BHATTACHARYA, M.K., BHATTACHARYA, S. K., KMANNA, B., NAIR, G. B., SHIMADA, T., TAKEDA, T. 1994. Incidence and toxigenicity of *Vibrio cholerae* in a freshwater lake during the epidemic of cholera caused by serogroup O139 Bengal in Calcutta. India . Fems. Microbiol. Ecol. **14**:285-292.

HACKNEY, C.R. & DICHARRY, A. 1988. Seafood-borne bacterial pathogens of marine origin. Food Technology. **42** :104-9.

HALLY, R.J., RUBIN, R.A., FRAIMOW, H.S., HOFFMAN, M.L.T. 1995. Fatal *Vibrio parahaemolyticus* septicemia in a patient with cirrhosis. A case report and review of the literature. Digestive Disease Science. **40** :1257-60.

HEIBERG, B. 1936.The biochemical reaction of *Vibrios*. J. Hyg., London, **36**:114-117.

HICKMAN-BRENNER, F.W.; MACDONALD, K.L.; SEIGERWALT, A. G.; FANNING,G.R.; BRENNER, D. J. & FARMER III, J. J. 1987. *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase positive species that may cause diarrhea. J. Clin. Microbiol. **25**: 900-6.

HIRONO, I. & AOKI, T. 1993. Cloning and characterization of 3 hemolysin genes from *Aeromonas salmonicida*. Microb. Pathog. **15**: 269-282.

HOFER, E. & SILVA, C. H. D. 1990. Isolamento e identificaçào de *Vibrio parahaemolyticus* de material de peixes de origem marinha. In: Anais V Cong. Bras. Microbiologia, RJ.

HOFER, E. 1974. Métodos de isolamento e identificação de Vibrio cholerae. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 22p.

HOFER, E. 1983. Primeiro isolamento e identificação de Vibrio parahaemolyticus no Brasil de infecção gastrointestinal humana. Revista de Microbiologia. **14**:174-5.

HOFER, E. 1987. *Vibrio cholerae* não O1 associado à infecção entérica humana no estado da Bahia, Brasil. Rev. Microbiol. São Paulo.**18**: 1- 4.

HOFER. E. & ERNANDEZ, D. 1990. Incidência de *Vibrio cholerae* não O1 afluentes de esta'~oes de tratamento de esgotos da cidade do Rio de Janeiro, RJ. Rev. Microbiol. São Paulo. **21**: 31-40.

HOLLIS, D.G., WEAVER, R.E., BAKER, C.N., THORNSBERRY, C. 1976. Halophilic vibrio species isolated from blood cultures. Journal of Clinical Microbiology. **3** :425-31.

HOLMBERG, S. D. & FARMER, J. J. 1986. Aeromonas hydrophila and plesiomonas shigelloides as Causes of Intestinal Infections. Reviews of infectious Diseases. **6**: 633-640.

HUQ, A., HUQ, S.A., GRIMES, D. J., O'BRIEN, M., CHU, K.H. CAPUZZO, J. M., COLWELL, R.R.. 1986. Colonization of the gut of the blue crab (Callinectes sapidus) by *V. cholerae*. Appl. Environ. Microbiol. **52:** 586-588.

HUQ, A.; WEST, P.A.; SMALL, E.B.; HUQ, M.I.; COLWELL, R.R. 1984. Influence of water temperature, salinity, ans pH on survival and growth toxigenic Vibrio cholerae O1 associated with live copepods in laboratory microcosm. Applied and Environmental Microbiology. **48** :420-4.

HUYS, G.; KAMPFER, P.; ALTWEGG, M. et al. 1997. *Aeromonas popoffii* sp. nov. A mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. **47**: 1165-71.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. 1995. Métodos de Analise Microbiológica de Alimentos. Manual Técnico **14:** 113-26.

JANDA, J. M.; GHUTERTZ, L. S.; KOKKA, R. P. & SHIMADA, T.1994. *Aeromonas* Species in Septicemia: Laboratory Characteristics and Clinical Observations. Clin Infect. Dis., **19**: 7-83.

JANDA, J.M. & CLARK, R. B. 1995. *Aeromonas* sepsis in healthy colege student. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **14**:51-3.

JEGATHESAN, M. & PARAMAVISAM, T. 1976. Emergence of *Vibrio parahaemolyticus* as an important cause of diarrhea in Malaysia. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. **25** :201-02.

KANEKO, T. & COLWELL, R. R. 1975. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. Journal of Bacteriology. **113**: 24-32.

KAYSNER, C. A.; ABEYTA, C.JR.; WEKELL, M. M.; DEPAOLA, A. JR.; STOTT, R. F.& LEITCH, J.M. 1987. Virulent strains of *Vibrio vulnificus* isolated from estuaries of the United States west coast. Appl. Environ. Microbiol, **53**: 1349-1351.

KAYSNER, C.A., ABEYTA, J.R.C., STOTT, R.F., KRANE, M.H. WEKELL, M.M. 1990. Enumeration of Vibrio species, including *V.cholerae* from samples of an oyster growing area, grays harbor, Washington. Journal of Food Protection.**53**: 300-1.

KELLY, M. T. & DAN STROH, E. M. 1988. Temporal relationship of *Vibrio paraemolyticus* in patients and the environment. J. Clin. Microbiol. **26**: 1754-1756.

KELLY, M. T. & DAN STROH, E. M. 1989. Urease-positive, Kanagawa negative *Vibrio paraemolyticus* from patients and the environment in the Pacific Northwest. J. Clin. Microbiol.,**27**: 2820-2.

KENYON, J.E.; PIEXOTO, D.R.; AUSTIN, B.& GILLIES, D.C.1984. Seasonal variation in numbers of *Vibrio cholerae* (non O1) isolated from California coastal waters. Appl. Environ. Microbiol.**47**:1243-1245.

KHARDORI, N.& FAINSTEIN V.1988. *Aeromonas* and *Plesiomonas* asetiological agents. Ann. Rev.Microbiol.**42**:395-419.

KIIYUKIA, C.; NAKAJIMA, A.; NAKAI, T.; MUROGA, K.; KAWAKAMI, H. & HASHIMOTO, H. 1992. *Vibrio cholerae* non O1 isolated from ayu fish (*Plecoglossus altivelis*) in Japan. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 3078-3082.

KING, F. G.; WERNER,S. B. & KIZER, K. W. 1992. Epidemiology of *Aeromonas* infections California. Clin. Infect. Dis. **15**: 449-52.

KIROV, S. M. 1993. The public health significance of *Aeromonas* spp in foods. **20**:179-98.

KIROV, SM.; ARDESTANI EK. HAYWARD LJ. 1993. The Growth and expression of virulence factors at refrigeration temperature by *Aeromonas* strains isolated from foods. Int. J. Food Microbiol. **20**: 159-68.

KLONTZ, K.C.; LIEV, S.; SCHRIEVER, M.; JANOWSKI, H. T.; BALDY, L. M. & GUNN, R. A.1988. Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections: cliical and epidemiologic features in Florida cases, 1981-1987. Ann Intern. Med.**109**: 318-323.

KLUYVER, A . F. & VAN NIEL, C. B. 1936. Prospects for a Natural System of Classification of Basteria . Zentralbl. Bakteriol.Parasitenkd. Infectionskr. Hyg. Abt. **94**: 369-403.

KOBAYASHI, L. R. & OHNAKA, T.1989. Food poisoning due to newly recognized pathogens. Appl. Bacteriol. :1-12.

KOKKA, R.P. & JANDA, M. J. 1990. Isolation and identification of autoagglutinating serogroup O:11 *Aeromonas* strain in the clinical laboratory. J. Clin. Microbiol. **28**: 1297-9.

LANDGRAF, M. 1997. Novos patógenos de interesse em alimentos. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. **31** :5-7.

LANDGRAF, M.; LEME, K.B.P.; MORENO, M.L.G. 1996. Occurrence of emerging pathogenic *Vibrio* spp. in seafood consumed in São Paulo City, Brazil. Revista de Microbiologia.: 27 126-30.

LANG, M.L. 1992. Fatal *Vibrio damsela* bacteremia. Clin. Microbiol. Newsl. **14**:166-167.

LEBLANC, M.; DELAGE, G.; ROUSSEAW, E.; DOBRESCU, O. & BONNIN, A. C.B. 1988. Prévalence d'*Aeromonas* spp dans les gatroentérites de l'enfant. CMAJ. **138**: 714-7.

LEDERER, I. 1991. Enciclopédia moderna de higiene alimentar São Paulo; Manole Dois.

LEE, J.V.; SHREAD, P.; FURNISS, A.L.J. & BRYANT, T. N. 1981. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. Nov (synonym Group F *Vibrios*, group EF6). J. Appl. Bacterioi. **50**: 73-94.

LEITÃO, M.F de F. & ARIMA, H.K. 1975. *Vibrio parahaemolyticus* no ambiente marinho do Estado de São Paulo. Ocorrência na água e avaliação da metodologia para isolamento. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos.**6** :149-66.

LEITÃO, M.F.F.; ARUNAM, H. K.& KAI, M. 1976. Vibrio paraemolyticus no ambiente marinho do Estado de São Paulo. II Incidência em peixes, moluscos e crustáceos. Col. Inst. Tecnol. Alim. 7: 181-190.

LIMA, F.C.de. Vibrios marinhos: 1997. *Vibrio parahaemolyticus*. Higiene Alimentar.**11** :14-22.

LJUNG, A. & WADSTROM, T. Aeromonas toxins in: DORNER, F. & DREWS, J. 1986. Pharmacology of bacterial toxin, Pergamon press. New Haven.:289-305.

LJUNG, A. 1987. Aeromonas toxins and other virulence factors. Experientia **43**:367-8.

LOPES, C.A de M., MORENO,G., WATANABE, D.S.A., CONCEIÇÃO, A.H. 1977. Isolamento de *Salmonella* em ostras, mariscos e mexilhões. In Anais do VII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Rio de Janeiro, RJ.

LOPES, C.M.; RABADAO, E.M.; VENTURA, C. CUNHA, S da.; CORTE, R.R.; MELICO, A.A.S. 1993. A case of *Vibrio alginolyticus* bacteremia and probable sphenoiditis following a dive in the sea. Clinical Infectious Diseases. **17** :299-300.

LUCHINI, G. M. & ALTWEGG.M. 1992. rRNA gene restriction patterns as taxonomic tools for the genus *Aeromonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. **42**:384-9.

MACDONELL, M. T.; SINGLETON, F. L.& HOOD, M. A.1982. Diluent composition for use of API 20 E in characterizing marine and estuarine bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **44**:423-427.

MAGALHÀES, M.; MAGALHÀES, V.; ANTAS, M. G. & TATENO, S.1992. *Vibrio cholerae* non O1 islolated from sporadic cases of diarrhea in Recife, Brazil. Rev. Microbiol., São Paulo, **23**: 1-4.

MAGALHÃES, M.; SILVA, G. P.; MAGALHÃES, V.; ANTAS, M. G.; ANDRADE, M. A. & TATENO, S. 1990. *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* associated with infantile diarrhea. Rev. Microbiol., São Paulo, **21**: 295-298.

MARTINS, M. T. 1984. Isolamento de *Vibrio* e *Salmonella* em Moluscos bivalvos e sua Relação com a Qualidade da Água. Higiene Alimentar. **3.**

MASSAD, G. & OLIVER, J.D. 1987 New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. Applied Environmental Microbiology.**53** :2262-4.

MATTÉ, M. H. ; NITRINI, S.M.O.O.& MATTÉ, G. R. 1994. *Aeromonas* relacionadas com infecções no homem: Aspectos epidemiológicos, ecológicos, laboratoriais, de virulência e relativaos à saúde pública.62-4.

MENEZES, N. A. & FIGUEIREDO, J. L. 1980. Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil - II – Teleostei (1). Museu de Zoologia – Univ. de São Paulo. S.P. :110.

MENEZES, N. A. & FIGUEIREDO, J. L. 1980. Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil - III – Teleostei (2). Museu de Zoologia – Univ. de São Paulo. S.P. :90.

MENEZES, N. A. & FIGUEIREDO, J. L. 1980. Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil - V – Teleostei (4). Museu de Zoologia – Univ. de São Paulo. S.P. :140.

MOLLITORIS, E.; JOSEPH, S. W.; KRICHEVSKY, M.I.; SINDHAUARDJA, W. & COLWELL, R. R. 1985. Characterization of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Indonesia. Appl. Environ. Microbiol. **50**: 1388-1394.

MONTEIL, H. & MONTEIL-HARF. C.1997.Les infection à *Aeoromanas*. Institut de Bactériologie, Faculté de médecine, Strasbourg.**26** :1790-8.

MORENO, G. M. L. & LANDGRAF, M. 1997. Ocorrência de *Vibrio vulnificus* em alguns alimentos de origem marinha. Ciênc. Tecnol. Aliment. **17**: 177-180.

MORRIS JR, J. G.& BLACK, R. E. 1985. Cholerae and other vibrioses in the United States. New Engl. J. Med. **312**: 343-350.

MORRIS, J. G.; WILSON, R.; HOLLIS, D.G.; WEAVER, R. E.; MILLER, H. G.; TACKET, C. O.; HICKMAN, F. W. & BLAKE, P. A. 1982. Illness caused by *Vibrio damsela* and *Vibrio hollisae*. Lancet **8282** : 1294-1297.

MORRIS, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S. & PFALLER, M.A. 1998. *Vibrio*, *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: Medical Microbiology. 3th Ed. Mosby.. 245-250.

MOTES, M., DePAOLA, A., GINKEL, S.Z-V., McPEARSON, M. 1994. Occurrence of toxigenic *Vibrio cholerae*-O1 in oysters in Mobile Bay, Alabama: an ecological investigation. Journal of Food Protection. **57** :975-80.

MOYER, N. P. 1987. Clinical significande of *Aeromonas* species isolated from patients with diarrhea. J. Clin.Microbiol. **25**: 347-53/2044-8.

MURATORI. Comunicação pessoal.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J. 1995. Manual of Clinical Microbiology 6 th.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, D.S.; KOBAYSH, G.S. & PFALLER, M.A.1998. *Vibrio*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas*. In: Medical Microbiology. Mosby-Year Book, Inc. : 245-257.

NAIDU, A.J. & YADAV, M. 1997. Influence of iron, growth temperature and plasmids on siderophore production in *Aeromonas hydrophila*. J. Med. Microbiol. **47**: 833-838.

NAMDARI, H. & BOTTONE, E.J. 1991. *Aeromonas* species: pathogens of aquatic inhabitants with a human host range. Clin. Micobiol News. **13**: 113-6.

NEVES, M. S.; NUNES, M. P.; MILHOMEM, A. M. & RICCIARDI, I. D. 1990. Prodution of enterotoxin and cytotoxin by *A. Veronii*. Brazilian J. Med. Biol. Res. **23**: 437-40.

NOGUEIRA, J. M. R. 1996. Caracterização de espécies potencialmente patogênicas, do gênero Vibrio, em peixes comercializados no Estado do Rio de Janeiro., Tese de Mestrado – UFRRJ.:82 p.

OLIVER, J. D. , GUTHRIE, K., PREYER, J., WRIGHT, A ., SIMPSON, L. M. ,SIEBELING, R. & MORRIS, J. G. JR. 1992. Use of Colistin - Polymyxin B – Cellobiose Agar for Isolation of *Vibrio vulnificus* from the Environment. Applied and Environmental Microbiology. :737–739.

OLIVER, J.D. & KAPER, J.B. 1997. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers edited by M.P.Doyle, L.R.Beauchat and T.J. Montville.

OLIVER, J.D., WARNER, R.A., CLELAND, D.R. 1982. Distribution and ecology of and other lactose fermenting marine vibrios in coastal waters of the southeastern United States. Applied and Environmental Microbiology. **44** :1406-14.

OLIVER, J.D.; WARNER, R.A.; CLELAND, D.R 1983. Distribution of Vibrio vulnificus and other lactose-fermenting vibrios in the marine environment. Applied and Environmental Microbiology. **45**:985-98.

O-NEILL, K.R.; JONES, S.H.; GRIMES, D.J. 1992. Seasonal incidence of Vibrio vulnificus in the Great Bay Estuary of New Hampshire and Maine. Applied and Environmental Microbiology 58: 3257-62.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).1975. Higiene del pescado y de los mariscos.Cronica de la OMS. 29: 59-65.

PALUMBO, S. A.; MAXIMO, F.; WILLIAMS, A. C.; BUCHANAN, R. L.& THAYER, D. W.1985. Starch ampicillin agar for the quantitative detection of Aeromonas hydrophila. Applied and Environmental Microbiology, Washington. 50:1027-30.

PAREDES, L. E. 1993. Aspectos Sanitários de cultivo do camarão marinho no Equador. Higiene Alimentar. 7: 8-10.

PATURLE, G.1975. Pesca, Peixes e Pescarias. Ed. Itatiaia :218.

PEFFERS, A.S.R., BAILEY, J., BARROW, G.I., HOBBS, B.C. 1973. Vibrio parahaemolyticus gastroenteritis and international air travel. Lancet.1 :143-45.

POPOFF, M. 1984. Genus III. *Aeromonas* KLUYVER & VAN NIEL 1936,398. In: KRIEG, N. R. & HOLT, J. G. (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.:545-548.

RAHMAM, A.F.M.S. & WILLOUCHBY, J.M.T. 1980. Dysentery-like syndrome associated with *Aeromonas hydrophila*. Br. Med. J. **281**: 976-977.

RIBEIRO, R.V. 1994. Caracterização de perfis enzimáticoas em espécies do gênero Vibrio isoladas do litoral do município do Rio de Janeiro, R.J., Tese de Mestrado – UFRRJ.:67p.

ROBSTON, K. V. I. 1988. Human extraintestinal infections caused by Aeromonas species. J. Diarrhocal Dis. Res. 6: 99-102.

RODRIGUES, D. P. 1983. Detecção de bactérias patogênicas no ecossistema água-ostra da baía de Sepetiba, Rio de Janeiro – RJ. Disertação de mestrado – Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

RODRIGUES, D.P. & HOFER, E. 1986. Vibrio species from the water-oyster ecosystem of Sepetiba Bay in Rio de Janeiro State, Brazil. Rev.Microbiol. 17:332-8.

RODRIGUES, D.P.; RIBEIRO, R. V. & HOFER, E.F. 1994. Enterobactérias patogênicas no solo de áreas de recreação de cidade do Rio de Janeiro-RJ. R. Bras. Med. Vet. 16: 256-259.

RODRIGUES, J.M.F.& HERNÁNDEZ, J. A. P. 1998. Aislamento de Aeromonas hydrophila en trucha Arcoiris.29:117-9.

SAKAZAKI, R. 1973. Recent trends of *Vibrio paraemolyticus* as a causativa agent of food poisoning. In: LEITÃO, M.F.F. & ARIMA H. K. The microbiological Safety of Food. Academic Press, London, England.: 19-30.

SAKAZAKI, R. 1979. Vibrio infections,:173-209. In H. Reimann and F. L. Bryan (ed.), Food borne infections and intoxications, 2nd ed. Academic Press, Inc., New York.

SAKAZAKI, R. IWANAMI, S., FUKUMI, H. 1963. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, Vibrio parahaemolyticus. Jap. J. Med. Sci. Biol. **16**:161-88.

SAKAZAKI, R.; TAMURA, K.; KATO, T.; OBARA, Y.; YAMAI, S. & HOBO, K. 1968. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. III. Enteropathogenicity. Japan J. Med. Sci. Biol. **21**: 325-331.

SAKAZAKI, R.1965. Vibrio parahaemolyticus isolation and identification. Nihon Eiyo Kagaku Co., Ltd., Tokyo Japan. In: Hofer, E. & Silva, C. H. D. An evaluation of the efficiency of enrichment media in the isolation process for *Vibrio parahaemolyticus*. Zbl. Bakt. Hyg. A. **256**: 456-465.

SARKAR, B. L.; NAIR, G. B.; BANERJEE, A. K. & PAL, S. C. 1985. Seasonal distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in freshwater environs and in association with freswater fishes in Calcutta. Appl. Environ. Microbiol. **49**: 132-136.

SCHUBERT, R.H.W. & HEGAZI, M. 1988 *Aeromonas eucrenophila* species nova *Aeromonas caviae* a later and illegitimate synonym of *Aeromonas punctata*. Zentralbl Bakteriol Hyg A. **268**:34-9.

SHIMADA, R. Comunicação pessoal.

SHIMADA, T. & KOSAKO, Y. 1991. Comparison of two O-serogrouping systems for mesophilic mesophilic *Aeromonas* species. . J. Clin. Microbiol.**29**: 197-9.

SILVA, O.W. 1988. A Pesca no Mar. Ed. Ediouro. :32.

SILVA, C. H. D. & HOFER, E. 1977.Peaquisa do fenômeno de Kanagawa em amostras de Vibrio parahaemolyticus. In Anais do VII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Rio de Janeiro, RJ.

SILVA, C.H.P.M. 1994. Vibrio. In: Bacteriologia - um texto ilustrado. Ed. Eventos. : 242- 245.

SILVA, C.H.P.M.1999. *Vibrio*. In: Bacteriologia: um texto ilystrado. Liv. Ed. Eventos. 1ª- Ed. P. 242-245.

SIMPSON, L. M.; WHITE, V. K.; ZANE, S. F.; & OLIVER, J. D 1987. Correlaction between virulence and colony morphology in *Vibrio vulnificus*. Infect. Immun. **55**: 269-272.

SINGLETON, F. L.; ATTWELL, R. W.; JANGI, M. S. & COLWELL, R. R. 1982. Influence of salinity and organic nutrient concentration on survival and growth of *Vibrio cholerae* in aquatic microcosms. Appl. Environ. Microbiol. **43**: 1080-1085.

SUZUKI, C. R. . 1986. Guia de Peixes do Litoral Brasileiro. 2a ed. : 179,260,299,303,308.

TAMPLIN, M. L.; RODRICK, G. E.; BLAKE, N. J. et al. 1982. Isolation and characterization of *Vibrio vulnificus* from two Florida estuaries. Appl. Environm. Microbiol., Washington.**44**:1466-1470.

THOMAS, L.V.; GROSS, R. J.; CHEASTY, T. & ROWE, B. 1990. Extended serogrouping scheme for motile, mesophilic *Aeromonas* species. J. Clin. Microbiol. **28**: 980-4.

TISON, D.L., NISHIBUCHI, J., GREENWOOD,J. D., & SEEIDLER, R. J. 1982. *Vibrio vulnificus* biogroup 2 : new biogroup pathogenic for eels. Appl. Environ, Microbiol. **44**: 640-6.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, 3 ed: Washington. : 1919.

VARADARAJ, M.C. Methods for detection and enumeration of foodborne bacterial pathogens: a critical evaluation. Journal of Food Science and Technology **30**:1-13, 1993.

VEENSTRA, Dr. J. 1992. Infection by na Indole - negative Varinant of *Vibrio vulnificus* Transmitted by Eels. The Journal of Infectious Diseases. **166**: 209–10.

VENKATESWARAM, C. M.; KIYUKIA, M.; TAKAKI, K.; NAKANO, H.; MATSUDA, H.; KAWAKAMI, H. & HASHIMOTO, K.1989. Characterization of toxigenic vibrios isolated from the freshwater environment for Hiroshima, Japan. Appl. Environ. Microbiol. **55**:2613-2618.

VIEIRA, R.H.S.; LARIA S. I. 1993. *Vibrio paraemolyticus* in lobster *Panulirus laevicuda* (La Treille). Rev. Microbiol. **24**: 16-21.

WANG, C. & SILVA, J. L. 1999. Prevalence and characteristics of *Aeromonas* species isolated from processed channel catfish. Journal of Food Protection. **62**: 30-34.

WEST, P. A. & COLWELL, R. R.1983. Identification and classification of Vibrionaceae an overview In COLWELL, R.R.& HAIEN, M. B. Vibrios in the environment. New York, Jonh Wiley Sons. .285-368.

WEST, P.A. & COLWELL, R.R.1984. Identification and classification of Vibrionaceae: an overview. En: Colwell R.R., ed. Vibrios in the environment. Nueva York: Wiley Interscience: 285-363.

WEST, P.A. 1989. The human pathogenic vibrios- A public heath update with environmental perpectives. Epidemiology and Infection **103**: 1-34.

WONG, C. Y. F. HEUZENROEDER, M. W. & FLOWER, R L. P. 1998. Contribution of extracellular factors to the virulence of *Aeromonas hydrophila* in the suckling mouse model. Microbiology. **144**: 291-8.

WONG, H. C.; TING, S.H. & SHIEH, W. R. 1992. Incidence of toxigenic vibrios in foods available in Taiwan. J. Appl. Bacteriol. **73**: 197-202.

WRINGT, A.C., SIMPSON, L. M. & OLIVER J. D. 1981. Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. Infect. Immun. **34**: 503-7.

WRINGT, A.C.; HILL, R. T.; JONHSON, J. A. et al. 1996. Distribution of Vibrio vulnificus in the Chesapeake Bay. Appl. Environm. Microbiol., Washington.**62**: 717-724.

YOSHIDA, S.-I.; OGAWA, M. & MIZUGUCHI, Y. 1985 Relation of capsular materials and colony opacity to virulence of *Vibrio vulnificus*. Infect. Immun, **47**:446-451.

ZICAN, C. A.1994. O Ministério da Agricultura iniciou o controle sanitário através do sistema de pontos críticos. O pescado é o carro-chefe desse sistema. Higiene Alimentar; Primeiro Seminário De Vigilância Sanitária Pesqueira: Qualidade dos Pescados. **8**: 9-10.