

Pesquisa de bactérias do gênero *Vibrio* em feridas cutâneas de pescadores do município de Raposa-MA

Identification of *Vibrio* spp bacteria on skin lesions of fisherman in the county of Raposa-MA

Sther Marie de Aguiar Rodrigues¹, Eloísa da Graça do Rosário Gonçalves¹,
Débora Medeiros Mello², Eurípedes Gomes de Oliveira¹ e Ernesto Hofer²

Resumo O estudo foi realizado com o objetivo de isolar e identificar bactérias do gênero *Vibrio* em feridas cutâneas apresentando processo infeccioso, em pescadores do município de Raposa-MA. O material clínico foi obtido com o emprego de "swab" e mantido em meio de transporte de Cary-Blair. Para o processamento laboratorial foram utilizadas técnicas clássicas de enriquecimento em água peptonada alcalina, isolamento em meio seletivo-indicador (TCBS) e identificação bioquímica das espécies. Participaram do estudo 50 pescadores, com idade variando de 12 a 65 anos, tendo sido reconhecidos 21 indivíduos portadores de *Vibrio*. Houve predomínio da espécie *V. alginolyticus* (66,6%), seguido de *V. parahaemolyticus* (42,8%) e de *V. cholerae* não O₁ (9,5%). As lesões predominaram nos membros inferiores, apresentando hiperemia, edema, secreção, dor. Associados aos vibrios foram isoladas espécies de bacilos gram negativos dos gêneros *Serratia*, *Proteus*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, assim como outras bactérias não-fermentadoras (30,9%) e bactérias gram positivas do gênero *Staphylococcus*.

Palavras-chaves: Pescadores. Feridas cutâneas. *Vibrio*.

Abstract The study was undertaken aiming at identifying bacteria from the county of Raposa in the State of Maranhão. The clinical sample was collected by using a swab and held in a Cary-Blair transport medium. Enrichment in alkaline peptone water, isolation in TCBS selective indicator medium and biochemical coding of species were used for laboratory processing. Fifty fisherman with age varying from 12-65 years took part on the study. *Vibrio* bacteria isolated in 21 subjects had been identified. There was a predominance of *V. alginolyticus* (66.6%) followed by *V. parahaemolyticus* (42.8%), and *V. cholerae* non-O₁ (9.5%). Lesions predominated on lower limbs, presenting hyperemia, swelling, secretion, and pain. Some species of gram-negative bacteria of the *Serratia*, *Proteus*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* associated to the vibrios were isolated, as well as other non-fermenting bacteria (30.9) and gram-positive bacteria of the genus *Staphylococcus*.

Key-words: Fishermen. Cutaneous lesions. *Vibrio*.

Os membros da família *Vibrionaceae* são habitantes naturais de ambientes marinhos e estuários e muitos podem causar infecções em humanos que comumente apresentam quadros clínicos como diarreia, septicemia, otites, infecções de pele e tecidos moles. As infecções são, geralmente, adquiridas por consumo de alimento e água contaminada ou mais raramente, por contaminação direta de feridas cutâneas ocorrida durante o contato com a água do mar ou estuarinas²⁰.

Infecções cutâneas causadas por vibrios instalam-se após exposição a ambientes aquático e as lesões

começam com feridas pequenas, às vezes já preexistentes, ou através de lacerações causadas por acidentes no local de trabalho⁹. Esses processos foram reproduzidos em modelo experimental usando ratos, nos quais feridas foram produzidas e contaminadas artificialmente com água do mar^{5 8 11}. Na experiência destes autores, a virulência das cepas isoladas a partir das amostras ambientais foi comparável àquelas obtidas de fontes clínicas.

Há descrições de casos de lesões sépticas superficiais, cujos pacientes foram expostos ao ambiente marinho ou outras superfícies aquáticas, e

1. Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA. 2. Laboratório de Referência Nacional de Cólera do Instituto Oswaldo Cruz, da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

Apoio financeiro: CNPq

Endereço para correspondência: Dr^a Eloísa da Graça do Rosário Gonçalves. Rua Um, nº 728, Bairro São Francisco, 65076-320 São Luís, MA, Brasil.

Tel: 55 98 227-2798

e-mail: regionalsbmt@elo.com.br

Recebido para publicação em 30/01/2001.

dos quais foram isoladas várias espécies de *Vibrio*, constituindo mais um indício do possível papel patogênico desta bactéria^{9 15}.

Muitas destas lesões cutâneas apresentam infecções mistas, podendo-se esperar que organismos ubíquos (*Enterobacteriaceae*) e comensais associados à pele (*Staphylococcus* e *Streptococcus*) estejam presentes em qualquer ferimento, não importando o local de contaminação⁷.

O interesse em realizar o presente estudo deu-se porque nossa região caracteriza-se por grande riqueza de recursos hídricos, permitindo intensa atividade pesqueira tanto nos estuários, quanto em alto mar.

MATERIAL E MÉTODOS

Características da área de estudo. O município da Raposa possui uma área geográfica de 63,9km². Localiza-se, aproximadamente, a trinta e sete quilômetros da cidade de São Luís, limitando-se ao norte com o Oceano Atlântico e a leste, a oeste e ao sul com o município de Paço do Lumiar. Conta com uma população de 16.057 habitantes¹³.

A Praia da Raposa abriga uma pequena comunidade que tem sua subsistência baseada na pesca e no artesanato, onde pontificam todas as suas atividades direcionadas para a vida marinha.

Obtenção das amostras. Foram estudados 50 indivíduos que tinham como atividade principal a pesca e que apresentavam lesões cutâneas produzidas e contaminadas no exercício desta função. Todos os participantes foram selecionados na colônia de pescadores da Praia da Raposa, no período de setembro de 1998 a julho de 1999, após o esclarecimento dos objetivos da pesquisa. Todos concordaram com o exame e coleta do material.

Os dados referentes à identificação dos participantes, bem como ao aspecto clínico das lesões foram anotados em uma ficha de investigação.

O material analisado foi recolhido da superfície das lesões, utilizando-se swab, e mantido em meio de

Em estudo da flora bacteriana presente em amostras de água recolhidas na Baía de São Marcos que vem sendo desenvolvido no Laboratório de Microbiologia (UFMA), bactérias do gênero *Vibrio* têm sido isoladas com frequência⁴, justificando o desenvolvimento de trabalhos que possam contribuir para o conhecimento do papel destes agentes em processos infecciosos humanos, em nosso meio. Tem como objetivo, isolar e identificar bactérias do gênero *Vibrio* em lesões cutâneas detectadas em pescadores; isolar e identificar outras espécies bacterianas associadas aos vibrios; avaliar o aspecto clínico das feridas; estudar a sensibilidade das bactérias isoladas a antibióticos.

transporte de Cary-Blair à temperatura ambiente, até o processamento laboratorial, que se iniciava em torno de uma hora após a coleta.

Isolamento e identificação de vibrios. Foram empregados os procedimentos clássicos de isolamento e identificação descritos na literatura^{6 10 14 18 19}.

Para os demais bacilos gram negativos, fermentadores ou não, as técnicas de isolamento e identificação obedeceram as orientações de Costa & Hofer³ e Ballows *et al*¹. Para os cocos gram positivos (*Staphylococcus*) recorreu-se ao esquema apresentado por Ballows *et al*³.

A identificação fenotípica das bactérias gram negativas, fermentadoras ou não, foi complementada através do Sistema Crystal (BBL/Becton-Dickinson, USA).

Para o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos recorreu-se ao método de difusão dos discos impregnados, seguindo as recomendações técnicas de Kirby-Bauer e NCCLS (1993)^{2 12}. No controle de qualidade dos discos (CECON) foram utilizadas as amostras de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

RESULTADOS

Dos 50 pescadores, foram isolados e identificados 21 indivíduos portadores de *Vibrio*, com predominância de *V. alginolyticus*, seguido de *V. parahaemolyticus* e de *V. cholerae* não O₁, conforme demonstrado na Tabela 1. Em 5 indivíduos, houve associação entre estas espécies, sendo: *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus* em quatro indivíduos e *V. alginolyticus* e *V. cholerae* não O₁, em um indivíduo.

Bactérias gram negativas, da família *Enterobacteriaceae*, foram isoladas em 35 amostras, representando 70% do total estudado (Tabela 2). Em seis, havia mais de uma espécie. As associações

foram de *P. mirabilis* e *P. vulgaris*; *S. liquefaciens* e *C. freundii*; *S. marcescens* e *E. cloacae*; gram negativos não fermentadores com *S. rubidaea* ou com *S. marcescens*.

Além disso, em 24 indivíduos detectou-se também bactérias gram positivas, representadas por *Staphylococcus epidermidis* (13/54,1%) e *Staphylococcus aureus* (11/45,8%).

Ressalta-se que nas 21 amostras em que foi identificado o gênero *Vibrio*, havia também a presença de outros grupos bacterianos.

As lesões foram em membros inferiores. O quadro clínico caracterizou-se por hiperemia, edema e

secreção na maioria de natureza purulenta. Nenhum indivíduo apresentou repercussões sistêmicas e

necrose (Tabela 3). Testes estatísticos do qui quadrado e de Fisher foram empregados para

Tabela 1- Espécies de *Vibrio* isoladas de lesões cutâneas de 21 pescadores da Praia da Raposa*.

Espécies	Frequência %	Nº de indivíduos
<i>Vibrio alginolyticus</i>	66,6	14
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	42,8	9
<i>Vibrio cholerae</i> não O ₁	9,5	2

* Dos 21 indivíduos, dentre os quais foram isolados *Vibrios*, 5 apresentaram associação de espécie.

determinar o grau de significância no aspecto clínico das feridas dos indivíduos em que foram isolados *Vibrio*, considerando-se significativa, a

probabilidade de erro $\leq 0,05$. Os dados clínicos não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Tabela 2 - Distribuição de frequência das espécies de bactérias gram negativas isoladas em 35 indivíduos*.

Espécies	Frequência %	Nº de indivíduos
<i>Serratia</i> sp	39,02	16
<i>Proteus mirabilis</i>	4,87	2
<i>Proteus vulgaris</i>	2,43	1
<i>Escherichia coli</i>	4,87	2
<i>Citrobacter freundii</i>	4,87	2
<i>Citrobacter diversus</i>	4,87	2
<i>Enterobacter cloacae</i>	2,43	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2,43	1
Gram negativos não fermentadores	34,14	13
		41

* Das 35 amostras, dentre as quais foram isolados membros da família *Enterobacteriaceae*, 6 apresentaram associação de espécie.

A Tabela 4 demonstra a suscetibilidade do *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* não O₁,

à penicilina, aminoglicosídeo, sulfa, polimixina, cloranfenicol, nitrofurano, quinolonas e tetraciclina.

Tabela 3 - Características clínicas das feridas em relação a ocorrência de *Vibrio*.

Sinais clínicos	<i>Vibrio</i>	
	presente	ausente
Hiperemia	8	7
Edema	12	11
Secreção	21	22
Necrose	0	1
Repercussões sistêmicas	0	0

DISCUSSÃO

Das espécies da família *Vibrionaceae* isoladas de lesões cutâneas de pescadores da Praia da Raposa, *Vibrio alginolyticus* foi o representante com maior frequência (66,6%), dentre as 50 amostras estudadas, seguido de *Vibrio parahaemolyticus* (42,8%) e de *Vibrio cholerae* não O₁ (9,5%).

Alguns aspectos na presente investigação merecem ser referidos: o primeiro, a ocorrência apenas de *V. parahaemolyticus* Kanagawa negativos, permitindo relacionar a origem da bactéria ao contato dos ferimentos com água do mar; outro ponto de

referência situa-se na ausência de *V. vulnificus*¹⁶ nos espécimes clínicos pesquisados, assim como de *V. damsela* ou atualmente reconhecido como *Photobacterium damsela*¹⁷.

Janda *et al*⁷ demonstraram em um estudo que *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, e *Vibrio alginolyticus* foram responsáveis por 86% das feridas com infecções, embora todas as outras espécies (exceto *Vibrio cholerae* O₁) também fossem isoladas. Duas espécies estavam particularmente associadas com feridas: 71% de *Vibrio alginolyticus* e 100% de

Tabela 4 - Suscetibilidade aos antimicrobianos das espécies de *Vibrio* isoladas.

Antimicrobianos		<i>Vibrio alginolyticus</i>		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		<i>Vibrio cholerae</i> não O ₁	
		n ^o	%	n ^o	%	n ^o	%
Ácido nalidíxico	S	14	100,0	9	100,0	2	100,0
	I	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	-	-	-
Cloranfenicol	S	14	100,0	9	100,0	2	100,0
	I	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	-	-	-
Gentamicina	S	13	92,8	4	44,4	2	100,0
	I	1	7,1	5	55,5	-	-
	R	-	-	-	-	-	-
Nitrofurantoína	S	13	92,8	6	66,6	1	50,0
	I	-	-	2	22,2	-	-
	R	1	7,1	1	11,1	1	50,0
Penicilina	S	1	7,1	-	-	2	100,0
	I	-	-	-	-	-	-
	R	13	92,8	9	100,0	-	-
Polimixina B	S	13	92,8	1	11,1	2	100,0
	I	-	-	3	33,3	-	-
	R	1	7,1	5	55,5	-	-
Sulfametoxazol-trimetoprim I	S	13	92,8	9	100,0	2	100,0
	R	1	7,1	-	-	-	-
Tetraciclina	S	13	92,8	9	100,0	1	50,0
	I	-	-	-	-	-	-
	R	1	7,1	-	-	1	50,0

S = sensível I = intermediário R = resistente

isolados do *Vibrio damsela* foram destas infecções. Feridas podem conter mais de uma espécie de *Vibrio*, uma consideração importante na determinação da terapia antimicrobiana. Em seus estudos, 8 (4,7%) de 168 feridas com infecções produziram infecções mistas por *Vibrio*, uma das quais teve *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio damsela*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae* não O₁, presente simultaneamente.

No presente trabalho, foram isoladas e identificadas espécies de bactérias gram negativas e gram positivas associadas aos vibrios como demonstrado na Tabela 2.

Estes resultados estão de acordo com Janda et al⁷ ao afirmarem que muitas das infecções são mistas e, conseqüentemente, precisam ser pesquisados microorganismos, tanto aeróbios como anaeróbios facultativos e estrictos. E que finalmente, dever-se-ia esperar organismos ubíquos como os membros da família *Enterobacteriaceae* e comensais associados à pele (estafilococos e estreptococos) estarem presentes em qualquer ferimento, não importando o local de contaminação.

Quanto ao aspecto clínico das lesões estudadas e nas quais foram dos vibrios, 8 apresentaram hiperemia; 12 edema; 21 das lesões tinham secreção;

10 pescadores sentiam dor; nenhum apresentou sinais de necrose ou repercussões sistêmicas.

Estes dados são comparáveis com aqueles encontrados por Mulder et al¹¹, o qual fez um relato de caso em que o paciente com infecção por *Vibrio* apresentou o quadro clínico de dor, inflamação, vermelhidão e inchaço.

Em relação ao estudo da sensibilidade das espécies bacterianas isoladas, chama a atenção o fato do *V. alginolyticus* ser sensível em grande proporção a todos os antibióticos testados, exceto às penicilinas às quais 92,8% das amostras mostraram-se resistentes.

Resultados estes também encontrados por Janda et al⁷, ao afirmarem que a maioria das cepas de *Vibrio* é suscetível ao cloranfenicol, tetraciclina e aminoglicosídeos. Da mesma forma, o resultado do estudo de 1009 vibrios clinicamente significantes recebidos pelo CDC e testados pelo método de difusão do antibiótico em disco tem sido relatado por Farmer et al *apud* Janda et al⁷ onde a maioria das cepas era suscetíveis à tetraciclina, cloranfenicol, gentamicina e ácido nalidíxico, enquanto a suscetibilidade à sulfonamida era variável e o *V. parahaemolyticus*,

V. alginolyticus e *V. furnissii* foram resistentes à ampicilina, carbenicilina e cefalotina.

Ressalta-se que os dados clínicos descritos praticamente não divergem entre os indivíduos de cuja infecção foram isolados vibrios e aqueles em que não houve crescimento deste gênero, o que não permite

assegurar a participação efetiva de algum dos agentes, individualmente, como responsável pelo quadro. Estudos complementares que avaliem os fatores de virulência dos vibrios estão em andamento, visando auxiliar na compreensão do verdadeiro papel desempenhado por eles em processos patogênicos desta natureza.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ballows A, Hausler Jr WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, 1991.
2. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. American Journal Clinical Pathology 45: 493-496, 1966.
3. Costa GA, Hofer E. Isolamento e identificação de enterobactérias. Monografia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 1972.
4. Gonçalves EGR, Saraiva MJ, Oliveira EG, Hofer E. *V. cholerae*: estudo da associação do sorovar O₁ com o zooplâncton de águas estuarinas da Baía de São Marcos-São Luís-MA. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 33(supl 1): 189, 2000.
5. Hlady WG, Klontz KC. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. The Journal of Infectious Diseases 173: 1176-1182, 1996.
6. Hofer E. Métodos utilizados para o isolamento e identificação de *Vibrio cholerae*. Informe de Patologia Clínica 1: 5-18, 1975.
7. Janda JM, Abbott SL, Brenden RA. Overview of the etiology of wound infections with particular emphasis on community-acquired illnesses. European Journal of Clinical Microbiology and Infections Diseases 16: 189-201, 1997.
8. Kueh CSW, Kutarski P, Brunton M. Contaminated marine wounds-the risk of acquiring acute bacterial infection from marine recreational beaches. Journal of Applied Bacteriology 73: 412-420, 1992.
9. Levine WC, Griffin PM. *Vibrio* infections on the Gulf Coast: results of first year of regional Surveillance. The Journal of Infectious Diseases 167: 479-483, 1993.
10. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Prevenção do Cólera. Cólera: manual de diagnóstico laboratorial. Brasília, 1992.
11. Mulder GD, Ries TM, Beaver TR. Nontoxigenic *Vibrio cholerae* wound infection after exposure to contaminated lake water. The Journal of Infectious Diseases 159: 809-811, 1989.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard. NCCLS Publication M2-A5, 1993.
13. Reis JRS. Raposa: seu presente, sua gente, seu futuro. Lithograf, São Luís, 1998.
14. Rocha H, Zuliani ME, Trabulsi LR. Antibiograma. Revista de Microbiologia 3: 51-60, 1972.
15. Ryan WJ. Marine vibrios associated with superficial septic lesions. Journal of Clinical Pathology 29: 1014-1015, 1976.
16. Said R, Volpin G, Grimberg B, Friedenstrom SR, Lefler E, Stahl S. Hand infections due to non-*cholera Vibrio* after injuries from St Peter's fish. (Tilapia Zillu) Journal Hand Surgery 23: 808-810, 1998.
17. Smith SK, Sutton DC, Fuerst JA, Reichelt JL. Evaluation of the genus *Listonella damsela* (Love *et al*) MacDonell and Cowell to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* comb nov with an emended description. International Journal of Systematic Bacteriology 41: 529-534, 1991.
18. Toledo MRF, Fontes CF, Trabulsi LR. MILLI- um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. Revista de Microbiologia 13: 230-235, 1982.
19. Toledo MRF, Fontes CF, Trabulsi LR. EPM- modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. Revista de Microbiologia 13: 309-315, 1982.
20. West PA, Colwell RR. Identification and classification of *Vibrionaceae*-an overview. John Willey, Sons. New York, p. 285-363, 1984.