

VÍBRIOS NÃO COLÉRICOS NA ROTINA ENTEROBACTERIOLÓGICA⁽¹⁾

Vera MAGALHÃES(2), Marcelo MAGALHÃES(3), Roberto A. LIMA(4), Seiki TATENO(3) & Eduardo MAGALHÃES(5)

RESUMO

De 3.250 fezes diarréicas, recebidas para diagnóstico microbiológico em laboratório clínico particular, no Recife, Brasil, isolaram-se 55 (1,7%) linhagens de *Vibrio*. O estudo foi realizado entre maio de 1989 e maio de 1991. Para o isolamento de *Vibrio*, os espécimes fecais foram enriquecidos em água peptonada alcalina suplementada com 2% de NaCl e subcultivados em ágar tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose (TCBS). Das espécies isoladas, *V. parahaemolyticus* foi a mais freqüente (24 cepas), seguida de *V. furnissii* (15 cepas), *V. cholerae* não 01 (6 cepas), *V. alginolyticus* (4 cepas), *V. fluvialis* (2 cepas) e *Vibrio* sp. (1 cepa). Do ponto de vista custo-benefício, a baixa taxa de isolamento de *Vibrio* levanta dúvidas acerca da utilidade do TCBS na rotina enterobacteriológica dos laboratórios clínicos.

UNITERMOS: Víbrios; Diarréia; Coprocultura.

INTRODUÇÃO

Embora o *Vibrio cholerae* 01 fosse descrito por Pacini desde meados do século passado³, somente em 1950 encontrou-se uma outra espécie de vibrio, *V. parahaemolyticus*, associada a gastroenterites humanas^{8,9}. Esta espécie, por sua vez, permaneceu ainda por mais de 20 anos praticamente restrita ao conhecimento dos microbiologistas japoneses, até que, no início dos anos 70, a ocorrência de uma pandemia de cólera estimulou os laboratórios de Saúde Pública, espalhados pelo mundo, à adoção de novas tecnologias visando à rápida detecção do vibrião colérico². Daí em diante, outras espécies pertencentes ao gênero, além do *V. cholerae* 01, passaram a ser identificadas em diversas regiões do globo^{13,14,15}, inclusive no Brasil^{10,11,19,20,21}.

A maioria dos pacientes, dos quais víbrios são isolados, sempre refere recente contacto com o ambiente marinho ou consumo de peixes ou mariscos⁴. Nos países de clima frio ou temperado, as infecções tendem a ocorrer mais freqüentemente

durante o outono e verão quando a temperatura das águas costeiras é mais elevada^{16,22}. No Recife, porém, mesmo no inverno, a temperatura da água sempre está acima dos 20°C e muitos de seus restaurantes localizados na orla marítima, além das precárias condições de higiene, servem preferentemente peixes e mariscos. Portanto, seria de se antecipar grande número de isolamentos de víbrios nessa cidade.

O propósito do presente estudo foi determinar a taxa de isolamento de *Vibrio* em espécimes fecais diarréicos, enviados rotineiramente a um laboratório clínico para esclarecer eventual etiologia infecciosa, como um indicador aproximado da incidência de gastroenterites por víbrios, no Recife.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécimes fecais

Entre maio de 1989 e maio de 1991, selecionaram-se todas as amostras fecais diarréicas (líquidas, semi-líquidas e muco-sanguinolentas) recebi-

(1)Trabalho financiado pela Japan International Cooperation Agency (JICA).

(2)Departamento de Medicina Tropical, CCS/UFPE. Recife, PE, Brasil.

(3)Laboratório Keizo Asami, UFPE. Recife, PE, Brasil.

(4)Departamento de Medicina Clínica, CCS/UFPE. Recife, PE, Brasil.

(5)Centro de Microbiologia e Imunologia. Recife, PE, Brasil.

Endereço para correspondência: Marcelo Magalhães, Laboratório Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, 50730, Brasil.

das para diagnóstico microbiológico, em laboratório particular de patologia clínica no Recife. Não se obtiveram informações sobre a idade dos pacientes, intensidade dos sintomas ou se eles estavam fazendo uso de antimicrobianos ao tempo da coleta das fezes.

Microbiologia

Para o isolamento de *Vibrio*, os espécimes fecais foram enriquecidos em água peptonada alcalina (pH 8,5), suplementada com 2% de cloreto de sódio, durante 8 a 12 h à temperatura ambiente (22 a 26° C), e em seguida plaqueados em ágar tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose (TCBS; Difco Laboratories, Detroit, Mich.). As colônias bacterianas suspeitas de pertencer ao gênero *Vibrio* foram purificadas em ágar sangue e submetidas a uma bateria de testes de identificação para determinação da espécie⁷.

As culturas caracterizadas bioquimicamente como *V. cholerae* foram testadas para aglutinação frente ao antissoro específico 01 polivalente (Denka, Seiken Co., Tokyo).

Outras bactérias enteropatogênicas, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* enteropatogênicas, *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides*, foram isoladas e identificadas, usando-se métodos convencionais¹⁸.

RESULTADOS

Das 3.250 amostras fecais diarreicas cultivadas em ágar TCBS, após enriquecimento em água peptonada alcalina, apenas 55 (1,7%) foram positivas para víbrios. Dentre estes, a espécie mais freqüentemente encontrada foi *V. parahaemolyticus* (24 linhagens), seguida de *V. furnissii*, *V. cholerae* não 01, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis* e *Vibrio* sp. (Tabela 1). Das 24 culturas de *V. parahaemolyticus* detectadas em TCBS, 14 (58,3%) o foram também no meio ágar xilose-lactose-desoxicolato (XLD; Difco).

Nos meses de abril a junho ocorreu a mais elevada incidência de isolamentos, 25 linhagens (45,5%), enquanto nos meses de dezembro a fevereiro a incidência de víbrios foi muito menor, 8 casos (14,5%).

Tabela 1.

Comportamento das linhagens de *Vibrio*, isoladas de 3.250 fezes diarreicas, no teste de identificação

Testes ^a	% de cepas positivas (nº de cepas)					
	<i>V.cho</i> ^b (6)	<i>V.alg</i> ^c (4)	<i>V.flu</i> ^d (2)	<i>V.fur</i> ^e (18)	<i>V.pah</i> ^f (24)	<i>V.sp.</i> (1)
Oxidase	100	100	100	100	100	100
Crescimento em:						
0% NaCl	100	0	0	0	0	0
8% NaCl	0	75	100	100	87	100
Lisina descarboxilase	100	100	0	0	100	0
Arginina desidrolase	0	0	100	100	0	100
Ornitina descarboxilase	100	50	0	0	100	0
ONPG	100	0	100	100	0	100
Voges-Proskauer	100	100	0	0	0	0
Gás no TSI	0	0	0	100	0	0
Ácido da:						
Sacarose	100	100	100	100	0	100
Arabinose	0	50	100	100	87	100
Lactose	0	0	0	0	0	0
Inositol	0	0	0	0	0	0
Manitol	100	100	100	100	100	100
Salicina	0	0	100	0	0	0
Esculina	0	25	50	0	0	0
Beta hemólise ^g	100	25	100	100	0	100

^a Realizados em meio de cultura contendo 1% de NaCl. Exceto ONPG e oxidase, os testes foram lidos após 48 h; ^b *V. cholerae*. ^c *V. alginolyticus*. ^d *V. fluvialis*. ^e *V. furnissii*. ^f *V. parahaemolyticus*. ^g Observada em ágar sangue de carneiro.

Nenhuma das seis linhagens de *V. cholerae* recuperadas aglutinou com o soro anti-*V. cholerae* polivalente 01; portanto, foram classificadas com *V. cholerae* não 01.

Do ponto de vista dos testes de identificação empregados, observou-se notável uniformidade de comportamento entre as várias linhagens pertencentes às diferentes espécies de *Vibrio* reconhecidas; um dos isolados, entretanto, não pôde ser classificado (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Diferentemente do que se supôs inicialmente, os vibrios foram muito menos comuns que outras bactérias enteropatogênicas detectadas durante o período dessa investigação. Assim, por exemplo, eles foram 7 vezes menos freqüentes que as shigelas e 5 vezes menos que as salmonelas que foram encontradas em 12 e 9% das fezes analisadas, respectivamente. Por outra parte, eles foram mais freqüentes que outros gêneros bacterianos oxidase-positivos, *Aeromonas* e *Plesiomonas*.

Na realidade, levando-se em consideração as condições climáticas do Recife, sua precária situação sanitária e o hábito de muitos dos seus habitantes de consumir pescados, o número de isolamento de vibrios, de espécimes fecais diarréicos, foi menor do que o esperado. Todavia, nossa amostragem foi viciada e poderia não refletir a correta prevalência das vibrioses intestinais. Somente pacientes de clínica privada e provavelmente apenas aqueles que apresentaram gastroenterites severas procuraram cuidados médicos. Adicionalmente, muitos deles, por indicação médica ou iniciativa própria, poderiam estar usando drogas antibacterianas capazes de abortar a doença, o que propiciaria um número maior ainda de coproculturas negativas para vibrios. Realmente, as linhagens de *Vibrio*, ocorrentes no Recife, são muito mais susceptíveis às drogas do que as linhagens de *Shigella* (observações não publicadas). Além disso, a elevada incidência de shigelas corrobora essa hipótese uma vez que a maioria dos pacientes que submeteram fezes à cultura seriam os portadores de sintomatologia mais acentuada, traduzida por cólicas, tenesmo e eliminação de fezes mucosanguinolentas. Em recente trabalho, observou-se que o *V. parahaemolyticus*, o vibrio mais encontrado agora, apenas foi isolado de fezes aquosas²¹. Ademais, a auto-resolução é uma constante nas infecções intestinais associadas ao *V.*

*parahaemolyticus*¹. Portanto, os portadores de gastroenterites de curta duração poderiam não ter submetido suas fezes à cultura.

Apesar dessas ponderações, a incidência de vibrios, observada nesse estudo (1,7%), foi muito mais alta do que a verificada em inquérito realizado em comunidade norte-americana na Baía de Chesapeake (< 0,1%)¹², local considerado como de risco para vibrioses nos Estados Unidos. Evidentemente, tal diferença seria muito mais acentuada se nosso inquérito houvesse sido também realizado a nível de comunidade, onde os pacientes são recrutados para o estudo sem a interferência de qualquer fator seletivo, ao acaso.

No que concerne à freqüência das variadas espécies isoladas, o grande número de linhagens de *V. furnissii* foi um achado surpreendente. No Laboratório de Doenças Microbianas da Califórnia, por exemplo, apenas uma cepa de *V. furnissii* foi identificada no decorrer de 8 anos de trabalho contra 40 de *V. parahaemolyticus* e 58 de *V. cholerae* não 01¹⁵. *Vibrio furnissii*, quando de sua descrição original, foi considerado como microrganismo de ambientes marinhos¹⁷, e só raramente é citado como envolvido na etiologia das diarréias humanas^{5,19}. A possibilidade das cepas existentes no Nordeste do Brasil possuírem características de virulência próprias está sob investigação.

A incidência relativamente baixa de vibrios, observada nesse trabalho, levanta dúvidas sobre a utilidade da inclusão de métodos adicionais na rotina enterobacteriológica dos laboratórios clínicos. O TCBS é um meio caro e o pequeno número de cepas de vibrios, em espécimes fecais não selecionados, sugere que, do ponto de vista do custo-benefício, talvez não houvesse vantagem em se gastar mais recursos em exame já muito dispendioso, como é a coprocultura, apenas para diminuir em 1,7% o número de casos de gastroenterites infecciosas não elucidadas etiologicamente. Ademais, a espécie mais comum, *V. parahaemolyticus*, foi em 58,3% dos casos também isolada no meio XLD. Neste meio, as colônias de *V. parahaemolyticus* são facilmente reconhecidas por serem róseas e exibir o fenômeno "string" quando tocadas com a agulha bacteriológica. Por outro lado, como atualmente há perspectivas de eventual surto de cólera no Brasil, seria aconselhável a manutenção do TCBS, indiscutivelmente o meio de cultivo de escolha para o isolamento de vibrios.

Não obstante os *vibrios* ocorrerem esporadicamente durante todos os meses do ano, e de se haver isolado pequeno número de linhagens, o que impossibilitou avaliar-se sazonalidade, verificou-se maior incidência de *vibrios* no início da estação chuvosa e menor nos meses de verão. Portanto, nas regiões tropicais, parece acontecer o inverso do observado nas regiões frias, onde os *vibrios* são mais freqüentes no verão. Provavelmente, nos trópicos, a ocorrência de *vibrios* depende mais da salinidade das águas costeiras, onde os mariscos são apanhados, do que da temperatura. Realmente, baixa e alta salinidade são fatores restritivos ao *V. parahaemolyticus*⁶, a espécie mais encontrada no Recife.

SUMMARY

Non-cholera *Vibrios* in Enterobacteriologic Routine

Of 3250 diarrheal stools received for microbiologic diagnosis at a private clinical laboratory in Recife, Brazil, strains of *Vibrio* were isolated from 55 (1.7%). The study was carried out from May 1989 through May 1991. For recovering *Vibrio*, fecal samples were enriched in alkaline peptone water supplemented with 2% NaCl and subcultured on thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar (TCBS). Of the recovered species, *V. parahaemolyticus* was most commonly found (24 strains), followed by *V. furnissii* (15 strains), *V. cholerae* non-01 (6 strains), *V. alginolyticus* (4 strains), *V. fluvialis* (2 strains), and *Vibrio* sp. (1 strain). The low isolation rate of *Vibrio* raises doubts about the cost-effectiveness of the use of TCBS in the routine enterobacteriologic workup of clinical laboratories.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARKER Jr., W.H. - *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks in the United States. *Lancet*, 1:551-554, 1974.
2. BARKER Jr., W. H.; WEAVER, R.E.; MORRIS, G.K. & MARTIN, W.T. - Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* infection in humans. In: SCHLESSINGER, D. ed. *Microbiology - 1974*. Washington, American Society for Microbiology, 1975. p. 257-262.
3. BAUMANN, P.; FURNISS, A.L. & LEE, J.V. - Genus I. *Vibrio* Pacine 854. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams and Wilkins, 1984. p. 518-538.
4. BONNER, J.R.; COKER, A.S.; BERRYMAN, C.R. & POLLOC, H.M. - Spectrum of *Vibrio* infections in a Gulf coast community. *Ann. intern. Med.*, 99:464-469, 1983.
5. CENTER FOR DISEASE CONTROL - An outbreak of acute gastroenteritis during a tour of the Orient-Alaska. *M.M.W.R.*, 18:150, 1969.
6. COWELL, R.R. - Occurrence and biology of *Vibrio parahaemolyticus*. In: SCHLESSINGER, D., ed. *Microbiology - 1974*. Washington, American Society for Microbiology, 1975. p. 230-240.
7. FARMER III, J.J.; HICKMAN-BRENNER, F.W. & KELLY, M.T. - *Vibrio*. In: LENNETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER Jr., W.J. & SHADOMY, H.J., ed. *Manual of Clinical Microbiology*. 4. ed. Washington, American Society for Microbiology, 1985. p. 282-301.
8. FUJINO, T.; OKUNO, Y.; NAKADA, D.; AOYAMA, A.; FUKAI, K.; MUKAI, T. & UEHO, T. - On the bacteriological examination of shirasu food poisoning. *Med. J. Osaka Univ.*, 4:299-304, 1953.
9. FUJINO, T.; SAKAZAKI, R. & TAMURA, K. - Designation of the type strain of *Vibrio parahaemolyticus* and description of 200 strains of the species. *Int. J. system. Bact.*, 24:447-449, 1974.
10. HOFER, E. - Primeiro isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* no Brasil de infecção gastrointestinal humana. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 14:174-175, 1983.
11. HOFER, E. - *Vibrio cholerae* não 01 associado a infecção entérica humana no estado da Bahia, Brasil. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 18:1-4, 1987.
12. HOGE, C.W.; WATSKY, D.; PEELER, R.N.; LIBONATI, J.P.; ISRAEL, E. & MORRIS Jr., J.G. - Epidemiology and spectrum of vibrio infections in a Chesapeake Bay community. *J. infect. Dis.*, 160:985-993, 1989.
13. HUGHES, J.M.; HOLLIS, D.G.; GANGAROSA, E.J. & WEAVER, R.E. - Non-cholera vibrio infections in the United States. *Ann. intern. Med.*, 88:602-606, 1978.
14. HUQ, M.I.; ALAM, A.K.M.J.; BRENNER, D.J. & MORRIS, G.K. - Isolation of *Vibrio* -like group, EF-6, from patients with diarrhea. *J. clin. Microbiol.*, 11:621-624, 1980.
15. JANDA, J.M.; POWERS, C.; BRYANT, R.G. & ABBOTT, S.L. - Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1:245-267, 1988.
16. KELLY, M.T.; HICKMAN-BRENNER, F.W. & FARMER III, J.J. - *Vibrio*. In: BALOWS, A.; HAUSLER Jr., W.J.; HERRMANN, K.L.; ISENBERG, H.D. & SHADOMY, H.J., ed. *Manual of Clinical Microbiology*. 5. ed. Washington, American Society for Microbiology, 1991. p. 384-395.
17. LEE, J.V.; SHREAD, P.; FURNISS, A.L. & BRYANT, T.N. - Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp.

- nov. (synonym group F vibrios, group EF6). *J. appl. Bact.*, 50:73-94, 1981.
18. LENNETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER Jr., W.J. & SHADOMY, H.J. - *Manual of Clinical Microbiology*. 4. ed. Washington, American Society for Microbiology, 1985.
19. MAGALHÃES, M.; SILVA, G.P da; MAGALHÃES, V.; ANTAS, M.G.; ANDRADE, M.A. & TATENO, S. - *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* associated with infantile diarrhea. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 21:295-298, 1990.
20. MAGALHÃES, V.; LIMA, R.A.; MAGALHÃES, E. & MAGALHÃES, M. - Gastreenterite humana associada a *Vibrio fluvialis* no Recife. *Arq. Gastroent. (S. Paulo)*, 27:141-143, 1990.
21. MAGALHÃES, V.; LIMA, A.R.; TATENO, S. & MAGALHÃES, M. - Gastroenterites humanas associadas a *Vibrio parahaemolyticus* no Recife, Brasil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 33:64-68, 1991.
22. MORRIS Jr., J.G. & BLACK, R.E. - Cholera and other vibriosis in the United States. *New. Engl. J. Med.*, 312:343-350, 1985.

Recebido para publicação em 22/8/1991.

Aceito para publicação em 27/12/1991.