

OCORRÊNCIA DE *Vibrio vulnificus* EM ALGUNS ALIMENTOS DE ORIGEM MARINHA¹

GARCIA MORENO, Maria Luz² & LANDGRAF, Mariza²

RESUMO

Vibrio vulnificus é uma bactéria Gram-negativa que habita águas marinhas. É patogênica para o homem e a doença está associada ao consumo de frutos do mar, com aproximadamente 60% dos casos sendo fatais em pacientes imunocomprometidos. O objetivo desta pesquisa foi estudar a ocorrência de *V. vulnificus* em amostras de alguns alimentos de origem marinha. As amostras de ostras, mariscos e camarões foram coletadas nos períodos de abril-agosto de 1993, maio-setembro de 1994 e fevereiro de 1995. De 55 amostras de ostras, 36 (65%) foram positivas para *V. vulnificus*; das 19 amostras de mariscos, 8 (42,1%) foram positivas e das 7 amostras de camarão, 1 (4,3%) foi positiva para esta bactéria. Os resultados permitiram-nos concluir que a bactéria foi recuperada durante todos os meses de análise, demonstrando que estes alimentos, principalmente quando consumidos crus, são potencialmente perigosos para os seres humanos na faixa de risco.

ABSTRACT

OCCURRENCE OF *Vibrio vulnificus* IN SEAFOOD. *Vibrio vulnificus* is a Gram-negative bacterium that inhabits sea environments. It is pathogenic for human and the illness is associated with the ingestion of seafood, especially raw oysters. Approximately 60% of the cases are fatal, mainly in immunocompromised patients. The present research was carried out in order to study the presence of *V. vulnificus* in some seafood samples. The oysters, clams and shrimp samples were collected during April-August 1993, May-September 1994 and February 1995. 36% (65%) out of 55 oysters samples were positive for *V. vulnificus*; 8 (42.1%) out of 19 clams samples were positive, and 1 (14.3%) out of 7 shrimp samples harboured this bacterium. The presence of *Vibrio vulnificus* in these samples shows that they are potentially dangerous for human being, especially for those raw seafood consumers and at the risk group.

Key-words: *Vibrio vulnificus*, oysters, seafood.

1 — INTRODUÇÃO

V. vulnificus é um halófilo obrigatório com os pacientes apresentando relatos de consumo de frutos do mar contaminados com a bactéria ou por exposição de feridas à água do mar. KLONTZ *et al.* (13) descreveram os sinais clínicos e a epidemiologia das infecções causadas por *V. vulnificus* – septicemia primária, infecção de feridas e infecção gastrointestinal.

A ocorrência deste microrganismo no ambiente marinho é sempre favorecida por temperaturas acima de 13°C, e por salinidade abaixo de 16‰ (11), sendo que níveis de até 11×10^4 número mais provável por grama (NMP/g) foram encontrados em amostras de ostras durante o verão (26).

¹ Recebido para publicação em 1/12/96. Aceito para publicação em 07/07/97.

² Prof^ª, USP/Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Laboratório de Microbiologia de Alimentos - Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - 05508-900 - São Paulo - SP.

Nos Estados Unidos, *V. vulnificus* foi isolado por TAMPLIN *et al.* (30) da água do mar e de frutos do mar tendo sido detectado, com maior frequência, entre julho e novembro. As contagens encontradas foram inferiores a 0,3NMP/g de *V. vulnificus* por 100mL de água e superiores a 3×10^3 NMP/g de fruto do mar. OLIVER *et al.* (24) isolaram *V. vulnificus* de amostras de água de mar, sedimento, plâncton, caranguejo, pescados e frutos do mar, colhidas durante o verão em 80 pontos compreendidos entre Miami (Flórida) e Portland (Maine). Kaysner *et al.* (10) relataram a presença de *V. vulnificus* em amostras de água, frutos do mar e sedimentos de estuários, na costa oeste do Estados Unidos.

Na África, SCHANDENYL *et al.* (27) isolaram o microrganismo a partir de peixe de águas costeiras de Dakar, Senegal, quando a temperatura era de $24 \pm 3^\circ\text{C}$.

No Brasil, ZEBRAL *et al.* (35) isolaram a bactéria de mexilhões colhidos na baía de Guanabara, Rio de Janeiro. MATTÉ *et al.* (17,18), estudando a distribuição de diferentes espécies de vibrio em mariscos colhidos no litoral do estado de São Paulo, durante um ano, verificaram a presença de *V. vulnificus* em 12% das amostras de ostras analisadas, em concentrações inferiores a 3NMP/100g. LANDGRAF *et al.* (14) em um estudo de 100 amostras, entre ostras, mariscos e camarões, encontraram 51,8% de positividade para a presença desta bactéria em concentração de 3 a $3,5 \times 10^2$ NMP/g.

O isolamento de *V. vulnificus* é dificultado pela enorme variedade de bactérias presentes nos ambientes marinhos e estuários onde são encontrados. Além disso, nem todas estas bactérias já foram caracterizadas fenotipicamente e muitas delas podem ser confundidas com *V. vulnificus*. Segundo OLIVER *et al.*, (22) 50% ou até mais dessas bactérias são vibrios.

Com frequência, na metodologia de isolamento de *V. vulnificus* são utilizados caldos de enriquecimento. SLOAN *et al.* (29), comparando cinco caldos de enriquecimento seletivo utilizando a técnica do Número Mais Provável (NMP), verificaram que a água peptonada alcalina recuperou o maior número de células de *V. vulnificus*.

Em relação aos meios de isolamento utilizados, comumente emprega-se o ágar tiosulfato-citrato-sais biliares-sacarose (TCBS) (17, 18, 23, 24, 30). Entretanto, este meio é capaz de promover o crescimento de muitas outras bactérias além dos vibrios, não permitindo a diferenciação de *V. vulnificus* de outros não fermentadores de sacarose, como por exemplo o *V. parahaemolyticus*. Esse fato levou ao desenvolvimento de novos meios de isolamento, mais seletivos como o ágar dodecil-sulfato de sódio-polimixina B-sacarose (SPS), desenvolvido por KITAURA *et al.*, mencionados por BRYANT *et al.* (2), e o ágar celobiose-ppolimixina B-colistina (ágar CPC) (16). Este último meio sofreu modificações, conforme relatado por ELLIOT *et al.* (4).

Assim como para outros microrganismos causadores de doenças de origem alimentar, a identificação completa de *V. vulnificus* requer vários dias. Na tentativa de sanar este problema, têm sido propostos métodos mais rápidos e específicos de identificação que podem ser aplicados sobre a bactéria isolada ou ainda diretamente no alimento. Estas técnicas incluem métodos imunoenzimáticos (5,25, 28, 31) e métodos moleculares (1, 6, 9, 19, 33, 34).

O objetivo desta pesquisa foi estudar a ocorrência de *V. vulnificus* em alguns alimentos de origem marinha coletados no litoral do Estado de São Paulo, Brasil, utilizando os meios TCBS e mCPC como meios de isolamento.

2 — MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 — Materiais

Foram analisadas 81 amostras de alimentos de origem marinha, agrupadas da seguinte forma:

- 55 amostras de ostras (*Crassostrea gigas*)
- 19 amostras de mexilhão (*Perna perna*)
- 7 amostras de camarão (*Penaeus spp.*)

As amostras de frutos do mar (*in natura*) colhidas nas regiões de Cananéia, Iguape, Ilha Comprida e São Sebastião no litoral do Estado de São Paulo, foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz. As amostras de camarão foram coletadas em uma planta processadora da cidade de Santos, Estado de São Paulo. A coleta das amostras foi realizada nos seguintes períodos: abril-agosto 1993, maio-setembro 1994 e fevereiro de 1995. Todas as amostras foram transportadas até o laboratório de análise em local seco e em temperatura de refrigeração.

2.2 — Métodos

2.2.1 — Amostragem de frutos do mar

A parte externa da concha foi raspada e esfregada com o auxílio de uma escova rígida, sob água corrente tratada. Em seguida, as conchas foram lavadas com água corrente tratada.

Doze ostras foram abertas, assepticamente, com o auxílio de um estilete estéril que era inserido entre as conchas na posição ventral. Em seguida, após a secção do músculo adutor, o líquido e a carne foram coletados em frasco estéril. Este material foi homogeneizado em copo de liquidificador estéril por 60 segundos.

Uma amostra composta de vinte mexilhões recebeu tratamento igual ao das ostras.

2.2.2 — Amostragem de camarão

Os camarões foram lavados com água corrente tratada, colocados em bandeja para secagem e cortados em pequenos pedaços.

2.2.3 — Isolamento e identificação de *V. vulnificus*

Utilizou-se a técnica do número mais provável (NMP), segundo Elliot *et al.* (4). Foram pesados 25g do homogeneizado de ostras ou 25g do homogeneizado de mexilhões ou 25 gramas de camarão. Este material foi transferido, assepticamente, para um frasco contendo 225mL de solução NaCl

2% estéril e, a partir desta primeira diluição 10^{-1} , foram realizadas diluições decimais seriadas até 10^{-5} em solução NaCl 2% estéril. Um mL de cada diluição foi inoculado, em triplicata, em tubos contendo 10,0mL de água peptonada alcalina. Os tubos foram incubados por 12-16 horas a 35°C. A partir de cada tubo positivo, isto é, apresentando turbidez, semeou-se, de maneira a obter colônias isoladas, em placas contendo ágar TCBS e ágar mCPC (ágar colistina polimixina celobiose modificado). As placas foram incubadas por 24h a 35°C e 24h a 40°C, respectivamente.

De 2-3 colônias verdes (microrganismos não fermentadores de sacarose), com bordas regulares, centro mais escuro em ágar TCBS e colônias amarelas (microrganismos fermentadores de celobiose), com 1-2 mm de diâmetro, achatadas e translúcidas em ágar mCPC, foram inoculadas em tubos contendo ágar Kligler e ágar PVP (7). Os tubos foram incubados por 24 horas a 35°C. A colônia cujo crescimento apresentou fermentação da glicose sem produção de gás, não fermentou a lactose e não produziu arginina desidrolase, não produziu H₂S em ágar PVP, foi semeada em placa contendo ágar TSA adicionado de NaCl 2%. Após 24 horas de incubação a 35°C, a cepa foi submetida aos testes de produção de oxidase e motilidade. A cepa produtora de oxidase e móvel foi submetida às provas de halofilia em caldo nutriente com concentrações de cloreto de sódio de 0, 3, 6 e 8%. As colônias com crescimento em 3% e 6%, mas não em 0 e 8% foram identificadas bioquimicamente, com o auxílio do sistema de identificação API 20E (Analytab Products Inc., Plainview, NY), utilizando solução de NaCl 2% como diluente (15).

As cepas com características de *V. vulnificus* foram mantidas à temperatura ambiente em ágar TSA adicionado de NaCl 2%.

3 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos ecológicos demonstram que *V. vulnificus* é uma bactéria normalmente encontrada em ambientes marinhos (3) e a sua presença está determinada por fatores ambientais como salinidade e temperatura (8, 11). *V. vulnificus* tem sido isolado com muita frequência de amostras de moluscos bivalvos (14, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 30, 32).

A presença desta bactéria nas ostras, segundo KETTLER & DINUZZO (12), ocorre através da filtração passiva da água contaminada com esse microrganismo. Muitos microrganismos podem sobreviver a este processo digestivo, entre eles os vibrios. Quando utilizados como alimento e pelo fato de serem consumidos crus e inteiros, os bivalvos convertem-se em vetor para a transmissão de doenças. Portanto, o seu consumo pode representar um importante problema para a saúde pública.

Na presente pesquisa, *V. vulnificus* foi isolado durante todos os meses de amostragem.

A Tabela 1 apresenta a ocorrência de *V. vulnificus* em alimentos de origem marinha, provenientes do litoral do Estado de São Paulo, nos períodos de abril-agosto 1993, maio-setembro 1994 e fevereiro de 1995.

TABELA 1. Ocorrência de *V. vulnificus* em alimentos de origem marinha provenientes do litoral do Estado de São Paulo, Brasil (abril-agosto 1993, maio-setembro 1994 e fevereiro 1995).

Tipo de alimento	Nº de amostras analisadas	Nº (%) de amostras positivas para <i>V. vulnificus</i>
Ostra	55	36 (65,4)
Camarão	7	1 (14,3)
Mariscos	19	8 (42,1)
Total	81	45 (55,5)

Da Tabela 1, observa-se que a maior freqüência de contaminação por esse microrganismo foi encontrada nas amostras de ostras (65,4%). Estes resultados são superiores aos obtidos por O'NEIL *et al.* (21) que encontraram positividade em 37,8% das amostras analisadas, apesar da metodologia ser a mesma nos dois trabalhos. A região de coleta das amostras na pesquisa de O'NEIL *et al.* (21) apresentava temperaturas inferiores a 10°C e salinidade inferior a 5‰ durante os meses de inverno, condições estas desfavoráveis ao crescimento e conseqüente isolamento da bactéria.

Observa-se, também, que a percentagem para a recuperação de *V. vulnificus* de amostras de camarões foi de 14,3% e de 42,1% para as de mariscos.

O maior número de amostras de ostras deve-se ao fato de o laboratório de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz ter recebido durante o período estudado, um maior número de amostras desse alimento.

O'NEIL *et al.* (20) isolaram *V. vulnificus* de 15 amostras (19,2%) de um total de 78 amostras de água e ostras. Dessas, 8 (53,4%) eram de água e 7 (46,6%) eram provenientes de amostras de ostras. Por sua vez, KAYSNER *et al.* (10) isolaram a bactéria em apenas 6,4% das amostras de frutos do mar nas regiões dos estados de Washington, Oregon e Califórnia (USA).

MATTÉ *et al.* (17), estudando a ocorrência de *Vibrio* spp em amostras de ostras comercializadas na cidade de São Paulo, encontraram 12% das amostras positivas para *V. vulnificus*, cerca de 5 vezes menor do que a relatada neste trabalho. Esta diferença nos resultados pode ser explicada pelo uso de diferentes metodologias para o isolamento da bactéria, principalmente no que se refere ao meio de isolamento.

O ágar mCPC apresentou maior percentagem de isolamento de colônias suspeitas de *V. vulnificus* do que o ágar TCBS como pode ser constatado pela Tabela 2 que apresenta o número e a percentagem de amostras de alimentos positivas para *V. vulnificus* em ágar TCBS, ágar mCPC e em ambos os meios.

Apesar da superioridade do ágar mCPC em relação ao ágar TCBS, este último possibilitou o isolamento de uma cepa de *V. vulnificus* de camarões que não foi recuperada em ágar mCPC.

TABELA 2. Número e percentagem de amostras de alimentos positivas para *V. vulnificus* nos meios de isolamento ágar TCBS, ágar mCPC e simultaneamente em ambos os meios (número total de amostras contaminadas = 45).

Tipo de alimento (nº)	Número (%) de amostras positivas		
	meio mCPC*	meio TCBS**	meios mCPC e TCBS
Ostras (36)	30 (83,3)	3 (8,3)	3 (8,3)
Mariscos (8)	6 (75,0)	1 (12,5)	1 (12,5)
Camarões (1)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)
Total (45)	36 (80,0)	5 (11,1)	4 (8,9)

*mCPC - ágar colistina-polimixina B-celobiose modificado

**TCBS - ágar tiosulfato-citrato-bile sacarose

Das colônias típicas no meio mCPC, isto é, as de cor amarela, fermentadoras de celobiose, a maioria foi identificada como *V. vulnificus*. Dentre as colônias amarelas, aquelas não identificadas como *V. vulnificus*, não apresentavam tamanho e características da verdadeira colônia de *V. vulnificus*, isto é, 1-2 mm de diâmetro, achatadas e translúcidas.

Essas colônias atípicas apresentavam-se mucóides.

4 — CONCLUSÕES

- Apesar de não se ter casos documentados de infecções por *V. vulnificus* no Brasil, sua presença em 55,5% das amostras analisadas neste trabalho 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 desenvolvimento dessa bactéria.
- A presença de cepas de *V. vulnificus* em ostras, mariscos e camarões demonstra que esses alimentos são veículos desta bactéria sendo, portanto, potencialmente, perigosos para a saúde pública, principalmente quando ingeridos crus por pessoas consideradas na faixa de risco, isto é, imunocomprometidos, com doença hepática crônica, hemolítica ou renal.

5 — REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) BRAUNS, L.; HUDSON, M.; OLIVER, J. Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.57, n.9, p.2651-2655, 1991.
- (2) BRYANT, R.G.; JARVIS, J.; JANDA, J.M. Use of dodecyl sulfate-polymyxin B-sucrose medium for the isolation of *Vibrio vulnificus* from shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.53, n.7, p. 1556-1559, 1987.
- (3) COLWELL, R.R.; WEST, P.A.; MANEVAL, D. *et al.* Ecology of pathogenic vibrios in Chesapeake bay. In: COLWELL, R.R. ed., *Vibrios in the environment*. New York: John Wiley, 1984. p. 367-387.
- (4) ELLIOT, E.L.; KAYSNER, C.A.; TAMPLIN, M.L. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and other *Vibrio* spp.. In: Food and Drug Administration. *Bacteriological analytical manual*. 7. Arlington: AOAC, 1992. p. 110- 140.

- (5) GRAY, L.D.; KREGER, A.S. Detection of anti-*Vibrio vulnificus* cytolytic antibodies in sera from mice and a human surviving *Vibrio vulnificus* disease. **Infect. Immun.** Washington, v.51, p.964-965, 1986.
- (6) HILL, W.; KEASLE, S.; TRUCKSESS, P. *et al.* Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v.57, n.3, p.707-711, 1991.
- (7) KAPER, J.; REMMERS, E.F.; COLWELL, R.R. A medium for presumptive identification of *Vibrio parahaemolyticus*. **J Food Prot.**, Ames, v.43, p.956-958, 1989.
- (8) KASPAR, C.W.; TAMPLIN, M.L. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v.59, n.8, p. 2425-2429, 1993.
- (9) KAYSNER, C.A.; ABEYTA Jr, C; JINNEMAN, K.C. *et al.* Enumeration and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* by DNA-DNA colony hybridization using the hydrophobic grid membrane filtration technique for isolation. **J. Food Prot.**, Ames, v.57, n.2, p.163-165, 1994.
- (10) KAYSNER, C.A.; ABEYTA Jr, C; WEKELL, M. *et al.* Virulent strain of *Vibrio vulnificus* isolated from estuaries of the United States West coast. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v.53, n.6, p.1349-1351, 1987.
- (11) KELLY, M.T. Effect of temperature and salinity on *Vibrio (Benecke)* *vulnificus* in a Gulf coast environment. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v.44, n.4, p.820-824, 1982.
- (12) KELLY, M.T.; DINUZZO, A. Uptake and clearance of *Vibrio vulnificus* from Gulf coast oysters (*Crassostrea virginica*). **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v.50, n.6, p. 1548-1549, 1985.
- (13) KLONTZ, K.C.; SPENCER, L.; SCHREIBER, M. *et al.* Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections: clinical and epidemiologic features in Florida cases, 1981-1987. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 109, p.318-323, 1988.
- (14) LANDGRAF, M.; LEME, K.B.P.; GARCIA, M. L. Occurrence of emerging pathogenic *Vibrio* spp. in seafood consumed in Sao Paulo city, Brazil. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.27, p.126-130, 1996.
- (15) MacDONELL, M.T.; SINGLETON, F.L.; HOOD, M.A. Diluent composition for use of API 20E in characterizing marine and estuarine bacteria. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v.44, n.2, p.423-427, 1982.
- (16) MASSAD, G.; OLIVER, J.D. New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v.53, n.9, p.2262-2264, 1987.
- (17) MATTÉ, G.R.; MATTÉ, M.H.; SATO, M.I.Z. *et al.* Potentially pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region on the Atlantic coast of Brazil. **J. Appl. Bacteriol.**, Baltimore, v.77, p.281-287, 1994a.
- (18) MATTÉ, G.R.; MATTÉ, M.H.; RIVERA, I.G. *et al.* Distribution of potentially pathogenic vibrios in oysters from a tropical region. **J. Food Prot.**, Ames, v.57, n.10, p.870-873, 1994b.
- (19) MORRIS, J.G.; WRIGHT, A.C.; ROBERTS, D.M. *et al.* Identification of environmental *Vibrio vulnificus* isolates with a DNA probe for the cytotoxin-hemolysin gene. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v.53, n.1, p.193-195, 1987.
- (20) O'NEIL, K.R.; JONES, S.H.; GRIMES, D.J. Incidence of *Vibrio vulnificus* in Northern New England water and shellfish. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.72, p.163-168, 1990.
- (21) O'NEIL, K.R.; JONES, S.H.; GRIMES, D.J. Seasonal incidence of *Vibrio vulnificus* in the Great Bay estuary of New Hampshire and Maine. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v.58, n.10, p.3257-3262, 1992.
- (22) OLIVER, J.D.; GUTHRIE, K.; PREYER, J. *et al.* Use of colistin-polymyxin B-cellobiose agar for isolation of *Vibrio vulnificus* from the environment. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v.58, n.2, p.737-739, 1992.
- (23) OLIVER, J.D.; WARNER, R.A.; CLELAND, D.R. Distribution and ecology of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting marine vibrios in coastal waters of Southeastern United States. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v.44, n.6, p. 1404-1414, 1982.
- (24) OLIVER, J.D.; WARNER, R.A.; CLELAND, D.R. Distribution of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting vibrios in the marine environment. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v.45, n.3, p.985-998, 1983.
- (25) PARKER, R.W.; LEWIS, D.H. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for *Vibrio vulnificus* hemolysin to detect *Vibrio vulnificus* in environmental specimens. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v.61, n.2, p.476-480, 1995.
- (26) RUPLE, A.D.; COOK, D.W. *Vibrio vulnificus* and indicator bacteria in shellstock and commercially processed oysters from the Gulf coast. **J. Food Prot.**, Ames, v.55, n.9, p.667-671, 1992.
- (27) SCHANDEVYL, P.; VAN DICK, E.; PIOT, P. Halophilic vibrio species from seafish in Senegal. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v.48, n.1, p.235-238, 1984.
- (28) SIMONSON, J.; SIEBELING, R.J. Rapid serological identification of *Vibrio vulnificus* by anti-H coagglutination. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v.52, n.6, p.1299-1304, 1986.
- (29) SLOAN, E.M.; HAGEN, C.J.; LANCETTE, G.A. *et al.* Comparison of five selective enrichment broths and two selective agars for recovery of *Vibrio vulnificus* from oysters. **J. Food Prot.**, Ames, v.55, n.5, p.356-359, 1992.
- (30) TAMPLIN, M.L.; RODRICK, G.E.; BLAKE, N.J. *et al.* Isolation and characterization of *Vibrio vulnificus* from two Florida estuaries. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v.44, n.6, p. 1466-1470, 1982.
- (31) TAMPLIN, M.L.; MARTIN, A.L.; RUPLE, A.D. *et al.* Enzyme immunoassay for identification of *Vibrio vulnificus* in seawater, sediment, and oysters. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v.57, n.4, p.1235-1240, 1991.
- (32) WRIGHT, A.C.; HILL, RT.; JOHNSON, J.A. *et al.* Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v.62, n.2, p. 717-724, 1996.
- (33) WRIGHT, A.C.; MICELI, G.A.; LANDRY, W.L. *et al.* Rapid identification of *Vibrio vulnificus* on nonselective media with an alkaline phosphatase-labeled oligonucleotide probe. **Appl. Environm. Microbiol.**, Washington, v.59, n.2, p.541-546, 1993.
- (34) WRIGHT, A.C.; MORRIS, Jr, J.G.; MANEVAL Jr, D.R. *et al.* Cloning of the cytotoxin-hemolysin gene of *Vibrio vulnificus*. **Infect. Immun.**, Washington, v.50, n.3, p.922-924, 1985.
- (35) ZEBRAL, A.A. Isolamento e caracterização de *Vibrio* lactose-positivo de mexilhões da Baía de Guanabara, estado do Rio de Janeiro. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, 16, n.1, p.46-48, 1985.